

# Maturation des cellules dendritiques dans un objectif d'essai thérapeutique anti-tumoral

Clarisse Panterne

► **To cite this version:**

Clarisse Panterne. Maturation des cellules dendritiques dans un objectif d'essai thérapeutique anti-tumoral. Cancer. 2011. <hal-01478858>

**HAL Id: hal-01478858**

**<https://hal-ephe.archives-ouvertes.fr/hal-01478858>**

Submitted on 28 Feb 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES  
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE  
présenté  
par

**Clarisse PANTERNE**

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

## **Maturation des cellules dendritiques dans un objectif d'essai thérapeutique anti-tumoral**

*Soutenu le vendredi 16 Décembre 2011, devant le jury suivant :*

Dr Betty GARDIE	– Président
Dr Marc GREGOIRE	– Tuteur scientifique
Dr Jean-François JEANNIN	– Tuteur pédagogique
Pr Bernard BONNOTTE	– Rapporteur
Dr Jean-François FONTENEAU	– Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

**Marc GREGOIRE**, Laboratoire de Recherche INSERM U892 – Équipe 4  
marc.gregoire@nantes.inserm.fr  
IRTun – 3<sup>ème</sup> étage  
8, quai Moncousu  
44007 Nantes

Et de

**Jean-François JEANNIN**, Laboratoire de Recherche INSERM U866  
Jean-francois.Jeannin@u-bourgogne.fr  
Faculté de Médecine  
7 Bd Jeanne D'Arc  
BP 87900  
21079 Dijon Cedex

ÉCOLE PRATIQUES DES HAUTES ÉTUDES  
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

# Maturation des cellules dendritiques dans un objectif d'essai thérapeutique anti-tumoral

Clarisse PANTERNE

*Le vendredi 16 Décembre 2011*

## RÉSUMÉ

L'immunothérapie des cancers utilisant les cellules dendritiques (DC) est une approche thérapeutique qui, depuis plusieurs années, a été évaluée dans de nombreux essais cliniques. Cette stratégie de vaccination anti-tumorale est basée sur les propriétés particulières des DC décrites comme étant les meilleures cellules présentatrices d'antigènes et activatrices de réponses immunitaires innées ou acquises. Cependant, l'efficacité thérapeutique anti-tumorale de ces cellules est très loin de répondre aux espoirs suscités. Une critique des protocoles d'immunothérapie serait alors nécessaire, afin d'améliorer et de standardiser la manipulation *ex vivo* des DC, avant d'être réinjectées au patient.

Au cours de mon travail, j'ai tout d'abord évalué et comparé différents protocoles de production de DC, issues de monocytes humains, dans le cadre de leur utilisation en clinique. La technique de purification sélectionnée est l'élutriation, qui permet la purification des monocytes par centrifugation dans un flux liquide à contre-courant. A partir de ces cellules purifiées, j'ai ensuite testé plusieurs conditions d'activation et de maturation de ces cellules, paramètres d'importance pour la bonne efficacité thérapeutique. J'ai ainsi sélectionné un milieu de grade « clinique », le RPMI-2% AH, et un cocktail d'agents pour la maturation des DC (Poly I:C/TNF $\alpha$ /IL-1 $\beta$ ). Dans la seconde partie de mon travail, j'ai adapté deux protocoles d'induction de mort de cellules tumorales en vue d'un chargement des DC en antigènes de tumeur pour induire une réponse lymphocytaire T spécifique. En effet, il est maintenant reconnu que l'apoptose est capable de générer différentes réponses selon le mode d'induction de cette mort particulière. J'ai ainsi comparé deux protocoles, développés au sein de l'équipe de recherche, l'un par traitement de cellules tumorales par des inhibiteurs d'histone déacétylase, l'autre par infection par le vaccin contre la rougeole. Dans un premier temps, j'ai adapté la culture et la mort des cellules tumorales dans un milieu appauvri en sérum de veau fœtal (SVF), milieu protéique animal qui n'est pas adapté ni validé pour la thérapie chez l'homme. J'ai ensuite testé le rôle de l'apoptose selon les deux modes d'induction possibles, sur le comportement et la maturation des DC. Une maturation spontanée mais partielle des DC a été observée avec le protocole d'induction de mort par infection virale, caractérisée par l'expression du CD83 et l'augmentation de l'expression du CD80 et du CD86. J'ai également mis en évidence la capacité de migration des DC ainsi que leur capacité d'activation des lymphocytes T CD4 $^{+}$  naïfs. Cependant, aucune augmentation de l'expression du CD40 ni de sécrétion d'IL-10 et d'IL-12, ne sont observées. L'immunothérapie par DC sera probablement utilisée prochainement en routine en clinique, cependant un meilleur contrôle de la manipulation des cellules *ex vivo* et l'élimination totale du SVF, semblent indispensables au préalable.

**MOTS-CLÉS** : cellules dendritiques - apoptose immunogène - maturation - normes cliniques - vaccination anti-tumorale

## TABLE DES MATIÈRES

<u>ABRÉVIATIONS</u> .....	
<u>INTRODUCTION</u> .....	
<b>1. <u>Biologie des Cellules Dendritiques (DC)</u></b> .....	7
<b>1.1. <u>Historique et sous-populations des DC chez l'Homme</u></b> .....	7
<b>1.2. <u>DC : de l'internalisation de l'antigène dans les tissus à la migration dans les ganglions lymphatiques</u></b> .....	8
<b>1.2.1. <u>Internalisation et apprêtement des antigènes</u></b> .....	8
<b>1.2.1.1. <u>L'internalisation des antigènes</u></b> .....	9
<b>1.2.1.2. <u>L'apprêtement et la présentation des antigènes</u></b> .....	10
<b>1.2.2. <u>Maturation des DC</u></b> .....	12
<b>1.2.3. <u>Migration des DC vers les ganglions lymphatiques</u></b> .....	14
<b>1.3. <u>DC : Activation du système immunitaire dans les ganglions lymphatiques</u></b> .....	15
<b>1.3.1. <u>Interaction DC/Lymphocytes T</u></b> .....	15
<b>1.3.2. <u>Autres interactions</u></b> .....	18
<b>2. <u>L'immunothérapie</u></b> .....	20
<b>2.1. <u>Découverte de la réponse immunitaire anti-tumorale et définition de l'Immunothérapie</u></b> .....	20
<b>2.2. <u>L'immunothérapie anti-tumorale</u></b> .....	21
<b>2.2.1. <u>L'immunothérapie non spécifique</u></b> .....	21
<b>2.2.2. <u>L'immunothérapie spécifique passive</u></b> .....	22
<b>2.2.3. <u>L'immunothérapie spécifique active</u></b> .....	23
<b>2.3. <u>Les DC et la vaccination anti-tumorale</u></b> .....	24
<b>2.3.1. <u>Préparation des DC</u></b> .....	24
<b>2.3.1.1. <u>Sous-population de DC utilisées</u></b> .....	24
<b>2.3.1.2. <u>Maturation des DC</u></b> .....	26
<b>2.3.2. <u>Chargement en antigènes des DC</u></b> .....	27
<b>2.3.3. <u>Essais cliniques utilisant les DC</u></b> .....	29
<u>OBJECTIFS</u> .....	
<u>BIBLIOGRAPHIE</u> .....	

## ABRÉVIATIONS

### A

5-AZA	5-Aza-2'-deoxycytidine
ADCC	Antibody-Dependant Cell-mediated Cytotoxicity
AH	Albumine Humaine
ATP	Adénosine Tri-Phosphate

### B

BCG	Bacille de Calmette-Guerin
BCR	B Cell Receptor
BFA	Bréfeldine-A
BSA	Bovin Serum Albumin

### C

CDC	Complement Dependant Cytotoxicity
cDNA	ADN complémentaire
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CLR	C-type Lectine Receptors
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
CTA	Cancer Testis Antigen

### D

DAMP	Damage-Associated Molecular Patterns
DC	Cellule Dendritique
DCim	Cellule Dendritique immature
DCm	Cellule Dendritique mature
dNTP	déoxyribonucléotides triphosphates
DTC	Développement et Transfert à la Clinique

### E

ERAAP	Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase Associated with Antigen Processing (ou ERAP-1)
-------	---

### F

FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FMG	Fusogenic Membran Glycoprotein

### G

GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor
GMP	Good Manufacturing Practice
Gp	Glycoprotéine

### H

HMGB1	High-Mobility Group Box-1
HRP	Horseradish Peroxydase
HSP	Heat Shock Protein

## I

iDNMT	inhibiteur de DNA Méthyl Transférase
IDO	Indoléamine 2,3-dioxygénase
IFN- <sub>α</sub>	Interféron alpha
iHDAC	inhibiteur d'Histone Déacétylase
IP	Iodure de Propidium

## L

LAK	Lymphokine Activated Killer
LAM	Leucémie Aigu Myéloblastique
LRR	Leucin-Rich-Repeat

## M

MCM	Monocyte-Conditioned Medium
MDS	Médicaments Dérivés du Sang
MFI	Moyenne d'Intensité de Fluorescence
MLR	Mixed-Lymphocyte Reaction
MMP	Matrix Metalloproteinase
MMR	Macrophage Mannose Receptors
MoDC	Monocytes derived Dendritic Cell
MOI	Multiplicity Of Infection
MPM	Mésothéliome Pleural Malin
MUC1	Mucine 1
MV	Measles Virus

## N

NO	Monoxyde d'azote
NY-ESO-1	New York esophageal antigen 1

## P

PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PAP	Prostatic Antigen Phosphatase
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR	Polymerisation Chain Reaction
pDC	plasmacytoïd Dendritic Cell
PE	Phycoérythrine
PFA	Paraformaldéhyde
PGE2	Prostaglandine E2
PMA	Phorbol Myristate Acétate
PRR	Pattern Recognition Receptors

## R

RE	Réticulum Endoplasmique
RMFI	Relative Mean Fluorescence Intensity
RPLPO	Large Ribosomal Protein

## S

SAHA	Suberoylanilide Hydroxamic Acid
SH	Sérum Humain
SI	Système Immunitaire
SRA	Scavenger Receptor-A
SVF	Sérum de Veau Foetal

## T

TCR	T Cell Receptor
TCID <sub>50</sub>	Tissue Culture Infectious Dose 50 %
TIL	Tumor Infiltrating Lymphocyte
TIR	Toll/IL-1R homology domain
TLR	Toll Like Receptors
TMB	Tétraméthylbenzidine

# INTRODUCTION

## 1. Biologie des Cellules Dendritiques (DC)

### 1.1. Historique et sous-populations des DC chez l'Homme

Les cellules dendritiques (DC) ont été décrites pour la première fois en 1868 par Paul Langerhans, qui donnera par la suite son nom à un sous-type des DC, présentes dans la peau, même s'il pense observer des cellules impliquées dans le système nerveux. Plusieurs années ont été nécessaires à la découverte de leur origine, de leur rôle ainsi que de leur fonction. C'est en 1973, que leur implication dans la présentation antigénique fût mise en évidence (Steinman and Cohn 1973) et en 1979 que leur origine hématopoïétique fut établie (Katz, Tamaki et al. 1979).

Les DC ont tout d'abord été assimilées à des cellules nerveuses de par la présence de prolongements cytoplasmiques, appelés aujourd'hui dendrites. Mais leur localisation particulière (peau, muqueuses et tissus lymphoïdes secondaires) et leur fonction ont permis de les différencier des neurones. En effet, à l'heure actuelle les DC sont décrites comme étant les cellules présentatrices d'antigène (CPA) professionnelles les plus efficaces pour initier une réponse immunitaire.

On distingue actuellement deux populations de DC qui diffèrent selon leur origine, qui peut être lymphoïde ou myéloïde. Dérivant d'un progéniteur hématopoïétique commun (CD34+), à l'origine de deux grands types majeurs de précurseurs sanguins, les sous-populations ne sont pas toutes bien définies. Pourtant, ces différents types peuvent se différencier les uns des autres de par la localisation ou encore le phénotype des DC. Une étude démontre en 2002, que les DC interstitielles du derme et les cellules de Langerhans de la peau et des muqueuses dérivent d'un progéniteur commun aux caractéristiques myéloïdes (CD11c+) (Luft, Jefford et al. 2002). Elles pourraient donc également dériver des monocytes du sang qui sont des cellules myéloïdes (CD14+ et CD11c+). Les cellules de Langerhans, qui se caractérisent par l'expression spécifique de la Langerine, ainsi que par les granules de Birbeck, forment avec les DC interstitielles ce que l'on nomme les DC conventionnelles.



Les DC lymphoïdes, nommées DC plasmacytoïdes (pDC), dérivent d'un progéniteur CD14<sup>-</sup> CD11c<sup>-</sup> et CD123<sup>+</sup>, sous l'effet de l'IL-3 et du CD40L. Ces cellules plasmacytoïdes sont notamment caractérisées par leur forte sécrétion d'interférons de type I en réponse aux virus. Un autre type de DC, soumis à controverse, met en évidence un troisième précurseur CD14<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> encore non décrit auparavant.

Les DC sont retrouvées en faible pourcentage dans le sang (1 à 2%). En effet, les DC résident principalement dans les tissus périphériques, tels que la peau ou les muqueuses, à l'état immature ; et se logent plutôt dans les ganglions lymphatiques ou encore la rate et le thymus lorsqu'elles sont matures, présentant ainsi des antigènes à leur surface après migration.

**Dans des conditions physiologiques normales**, les DC sont plutôt sous forme immatures. Elles sont présentes dans les tissus périphériques et les organes lymphoïdes secondaires et joueraient un rôle dans la tolérance aux antigènes du soi. Elles transporteraient ainsi des auto-antigènes de la périphérie vers les ganglions lymphatiques afin de maintenir la tolérance vis-à-vis de ces auto-antigènes.

**Dans des conditions physiologiques anormales**, comme la présence de pathogènes, les DC vont alors mûrir, transporter les antigènes de pathogènes vers les organes lymphoïdes secondaires afin d'induire une réponse immunitaire contre ces pathogènes.

## **1.2. DC : de l'internalisation de l'antigène dans les tissus à la migration dans les ganglions lymphatiques**

Les DC ont deux fonctions principales. Premièrement, elles sont responsables du déclenchement de la réponse immunitaire adaptative, via les lymphocytes T et B qui sont les deux effecteurs primordiaux. Deuxièmement, elles participent au maintien de la tolérance au « soi » où elles sont impliquées dans la sélection négative des lymphocytes T au niveau du thymus et dans la tolérance périphérique au niveau des ganglions lymphatiques. Leur première fonction s'organise en plusieurs étapes, et commence tout d'abord par la reconnaissance et l'internalisation de l'antigène.

### **1.2.1. Internalisation et apprêtement des antigènes**

Lors d'une agression, les DC sont recrutées au niveau des tissus périphériques via l'action des chimiokines inflammatoires libérées par les cellules du tissu lésé. Pour atteindre le site de l'inflammation, les DC sécrètent activement des « matrix metalloproteinase » (MMP), notamment MMP-9, qui est impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire permettant ainsi une bonne

migration. Une fois parvenues sur le site de l'infection, leur processus de maturation est engagé et les DC se chargeront de l'internalisation des antigènes.

### **1.2.1.1. L'internalisation des antigènes**

L'internalisation des antigènes repose sur la capacité d'ingestion des DC, faisant intervenir différents récepteurs. On dénombre plusieurs mécanismes cellulaires d'internalisation, qui dépendent de la nature du matériel immunogène.

#### **La phagocytose**

C'est un processus dépendant de l'actine permettant l'internalisation de particules assez larges ( $>1 \mu\text{m}$ ) et de nature très variée. Les DC peuvent également phagocyter des cellules nécrotiques ou apoptotiques via des récepteurs du complément (Fraser, Laust et al. 2009), la molécule de surface CD14 (Wright, Ramos et al. 1990), ou encore les « scavenger » récepteurs comme CD36 (Febbraio, Hajjar et al. 2001). Elles ont aussi la capacité de phagocyter des complexes immuns ou des agents pathogènes. Dans le cas d'une bactérie, une réponse inflammatoire sera engagée, via la stimulation des Pattern Recognition Receptors (PRR), notamment les Toll like Receptors. Ces derniers peuvent réguler la phagocytose par mobilisation des filaments d'actine, induisant ainsi l'augmentation de la vitesse de phagocytose (West, Wallin et al. 2004).

#### **L'endocytose**

Ce mécanisme d'internalisation d'antigènes agit via des récepteurs spécifiques, tels que les récepteurs aux fragments Fc, les « scavenger » récepteurs ou encore les lectines de type C.

Les récepteurs « scavenger » (récepteurs « d'épuration ») ont pour fonction première, de lier et de phagocyter des structures polyanioniques. Ils participent à l'élimination des déchets dans le corps veillant ainsi à l'homéostasie lipidique. La voie humorale de l'immunité innée est représentée par deux types d'effecteurs, qui sont les anticorps et les molécules du complément jouant un rôle dans l'opsonisation des antigènes. Ces derniers vont alors être pris en charge par des récepteurs au fragment Fc des anticorps ou encore des récepteurs au complément (C1q), facilitant ainsi la phagocytose de l'antigène.

Dans les récepteurs d'endocytose, on retrouve également les C-type Lectine receptors (CLR), qui sont un ensemble de récepteurs qui reconnaissent de manière spécifique les motifs glycosylés des antigènes. Les CLR se caractérisent par un ou plusieurs « carbohydrate recognition domain » (CRD), qui permet la reconnaissance spécifique des sucres de type mannose, fucose ou encore galactose, de manière calcium dépendante. Les TLR étant impliqués dans la reconnaissance des agents pathogènes,

il y a une réelle coopération entre les TLR et les CLR (Calugaru, Cremer et al. 2009). Actuellement, on distingue 4 types de CLR. On perçoit parmi eux, les récepteurs transmembranaires de type I, faisant partie de la famille des « macrophage mannose receptors » (MMR) ; les récepteurs de type II, dont le plus étudié est la molécule DC-SIGN, ou la Langerine, uniquement présente sur les cellules de Langerhans ; les collectines et les récepteurs de la famille des « NK receptors ». Les CLR peuvent aussi représenter une voie d'échappement pour certains pathogènes au système immunitaire. De cette manière, les CLR symbolisent une porte d'entrée pour les virus, tels le HIV qui cible la molécule DC-SIGN pour infecter les DC qui le transporteront ensuite jusqu'aux lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques (Geijtenbeek, Kwon et al. 2000).

Après reconnaissance et internalisation de l'antigène, on observe la formation de vésicules, entourées d'un réseau de clathrine. Les antigènes sont par la suite dégradés dans les lysosomes pour être présentés à la surface des CPA.

### La macropinocytose

C'est un mécanisme d'internalisation des antigènes solubles, dépendant de l'actine. La formation de vésicules intracellulaires va permettre de concentrer les antigènes permettant ensuite l'apprêtement de ces derniers pour la présentation antigénique.

#### **1.2.1.2. L'apprêtement et la présentation des antigènes**

Les antigènes ne sont pas présentés sous leur forme native, mais doivent subir des modifications physico-chimiques. Ce phénomène d'apprêtement (« processing » de l'antigène) permet d'obtenir des fragments peptidiques antigéniques et la présentation de ceux-ci par les molécules du CMH.

### La présentation des peptides antigéniques par le CMH de classe I

Cette voie représente la voie cytosolique. En effet, elle permet de présenter des molécules intracellulaires, qu'il s'agisse de constituants naturels de la cellule ou des protéines virales. Dans le cas des protéines cellulaires, cette voie participe au maintien de la tolérance au « soi ».

Des protéines endogènes sont tout d'abord ubiquitinilées, puis acheminées vers le protéasome où elles seront dégradées, aboutissant ainsi à la formation de différents peptides. Ces derniers sont alors transportés jusqu'à la lumière du réticulum endoplasmique (RE) par les protéines TAP, dépendantes de l'ATP. En effet, ces transporteurs agissent comme un filtre, au niveau de la membrane du RE, en sélectionnant les peptides selon leur taille et leur conformation. Là, ils sont pris en charge par des molécules chaperonnes comme Gp96, et clivés par la protéine ERAAP (Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase Associated with Antigen Processing ou ERAP-1) en peptides de 10 acides aminés en

moyenne, pour être apprêtés sur les molécules du CMH I. Les complexes CMH I-peptides ainsi formés sont exportés à la membrane cellulaire et présentés aux lymphocytes T CD8.

Le CMH de classe I est spécialisé dans la présentation des antigènes endogènes. Cependant, les DC ont la capacité unique de présenter des peptides exogènes via les molécules du CMH de classe I, grâce au processus de présentation croisée. En effet, cette voie exclusive est très importante chez les DC et est essentielle pour générer une réponse lymphocytaire T CD8 contre les infections virales. De plus, ce mécanisme est également fondamental pour l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale. Cependant, la machinerie cellulaire responsable de cette spécificité des DC est encore peu connue, mais très étudiée. Récemment, une équipe française a publié un bilan sur ces dernières années de recherche traitant sur les mécanismes intracellulaires régulant la présentation croisée des DC (Amigorena and Savina 2010).

### La présentation des peptides antigéniques par le CMH de classe II

La molécule du CMH de classe II permet la présentation des protéines extracellulaires, que ce soit des protéines exogènes ou des protéines sécrétées par la cellule, internalisées par phagocytose ou par endocytose. Les vésicules d'internalisation vont alors s'acidifier et permettre la dégradation enzymatique des protéines en peptides antigéniques. Ensuite, on observe la fusion entre ces vésicules et les compartiments MIIC (CMH II compartiment) où a lieu la fixation des peptides sur les molécules du CMH de classe II. En effet, c'est dans ces compartiments MIIC que s'accumulent les molécules du CMH II après association de ses différentes chaînes ( $\alpha$ ,  $\beta$  et la chaîne invariante Ii) dans le RE puis passage dans l'appareil de Golgi, pour la glycosylation des chaînes. Une fois dans les compartiments acides, la chaîne Ii va être clivée, laissant place aux peptides antigéniques générés dans ces compartiments. Le complexe CMH II-peptide est alors transporté à la membrane de la cellule par une vésicule de sécrétion et présenté aux lymphocytes T CD4.

### La présentation des peptides antigéniques par les molécules CD1

Outre la présentation classique via les molécules du CMH, on peut observer chez les DC une autre présentation restreinte au molécule CD1 (Boes, Stoppelenburg et al. 2009). Les molécules de la famille CD1 ont une structure assez proche de celle du CMH de classe I, comprenant une chaîne lourde s'associant également avec la  $\beta$ -2 microglobuline. La voie de présentation antigénique via les molécules CD1 est un argument supplémentaire pour affirmer la place des DC à l'interface entre la réponse innée, via l'activation des cellules NK, et la réponse adaptative via l'activation des lymphocytes T spécifiques. Les molécules CD1 se chargent de présenter des motifs lipidiques aussi bien endogènes qu'exogènes. La molécule CD1, localisée dans le RE, va alors fixer des molécules lipidiques, puis ces complexes vont être externalisés à la membrane plasmique et présentés aux autres cellules immunitaires.

### **1.2.2. Maturation des DC**

Lorsque les DC sont stimulées par un agent pathogène ou par un contexte cytokinique et chimiokinique, elles engagent leur processus de maturation. La reconnaissance des pathogènes par les DC peut se faire via des récepteurs présents à leur surface, regroupés sous le nom de Pattern Recognition Receptors (PRR). Ces récepteurs permettent ainsi la détection de motifs moléculaires conservés entre les différents agents pathogènes, nommés alors les Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) ou encore des signaux de dangers émis par des cellules lésées, nommés les Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs), ce qui induit la maturation des DC.

#### **Les PRRs**

Parmi les PRR, les plus étudiés sont les Toll-like receptors (TLR). Ils sont très conservés chez les espèces et jouent un rôle important dans l'immunité innée, notamment dans la défense contre les agents pathogènes. Les TLR sont des récepteurs apparentés à la protéine Toll, initialement identifiée chez la drosophile en 1985 par l'équipe de C. Nüsslein-Volhard (Anderson, Bokla et al. 1985).

Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires qui sont caractérisées par un domaine extracellulaire. En effet, celui-ci comporte des motifs riches en leucine nommés LRR (Leucin-Rich-Repeat), qui interviennent dans l'interaction avec les agents pathogènes ; et un segment intracytoplasmique, comportant une région conservée appelée TIR (Toll/IL-1R homology domain), responsable de la transmission du signal.

Les TLR sont surtout exprimés dans les tissus lymphoïdes comme la rate ou sur les cellules ayant une activité présentatrice d'antigène, comme les cellules dendritiques. On dénombre à l'heure actuelle, treize TLR identifiés chez les mammifères dont dix qui sont exprimés par les DC humaines. Les TLR extracellulaires (TLR 1, 2, 4, 5 et 6) reconnaissent des pathogènes extracellulaires et les TLR intracellulaires endosomaux (TLR 3, 7, 8 et 9) reconnaissent les motifs des pathogènes intracellulaires (principalement les acides nucléiques). Chaque TLR semble avoir une spécificité de reconnaissance. Par exemples, le TLR2 reconnaît plus spécialement les lipoprotéines bactériennes, les peptidoglycane et surtout les acides lipoteichoïques, et le TLR4 est tout particulièrement activé par le LPS bactérien. Ainsi, la plupart des TLR (TLR 1, 2, 4, 5 et 6) sont exprimés à la surface des DC, et leur expression peut varier selon l'état de maturation de celles-ci.

Cependant, les autres TLR, localisés dans les compartiments intracellulaires, peuvent également avoir des effets sur la maturation des DC lorsqu'ils sont activés. Une étude récente, démontre que l'activation du TLR7 ou 8 emprunte les mêmes voies de signalisation mais joue un rôle différent sur la maturation des DC (Larange, Antonios et al. 2009). De cette façon, la stimulation des TLR joue un rôle dans la capture des antigènes en induisant, de manière très rapide, une mobilisation des filaments d'actine (West, Wallin et al. 2004). Selon les TLR activés, les DC vont engager une maturation

finement adaptée au pathogène rencontré et vont initier et orienter une réponse immunitaire en fonction de ce pathogène, en intégrant également les signaux de dangers reçus.

### Les DAMPs

Certaines molécules sécrétées par une cellule en état de stress ou en voie de mort sont susceptibles d'activer les DC via les PRR (Jeannin, Jaillon et al. 2008). Ainsi, l'acide urique, HMGB1 (High-Mobility Group Box-1), les protéines de la famille HSP (Heat Shock Protein), et bien d'autres molécules de danger participent à l'activation des DC.

En effet certains facteurs cellulaires présentent des propriétés pro-inflammatoires lorsqu'ils sont libérés dans l'environnement. C'est le cas de l'acide urique qui, lorsqu'il est libéré lors de lésions cellulaires, peut induire une maturation des DC et avoir même un effet positif sur le rejet tumoral (Hu, Moore et al. 2004). L'ATP (adénosine tri-phosphate) qui peut aussi être libéré dans des conditions de stress, peut activer les DC via des récepteurs purinergiques, comme le récepteur P2X7. D'ailleurs l'activation de l'inflammasome via la liaison de l'ATP au P2X7 aboutirait à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1<sub>β</sub> et l'IL-18 (Rock, Latz et al. 2010).

Les HSP sont des protéines habituellement intracellulaires, jouant le rôle de chaperonnes pour les autres protéines. Elles sont libérées en cas de lésions cellulaires ou peuvent être transloquées à la membrane après un stress infectieux. Les protéines HSP représentent un puissant signal de danger pour les DC. Le principal récepteur mis en jeu dans la reconnaissance des HSP est LOX-1, récepteur « lectin-like » mais également classé dans les récepteurs « scavenger ». L'activation des DC passerait également par la fixation des HSP à d'autres récepteurs, tels que TLR2 (Vabulas, Ahmad-Nejad et al. 2001), TLR4 (Bulut, Faure et al. 2002) ou encore CCR5 (Whittall, Wang et al. 2006).

La protéine HMGB-1 peut être activement sécrétée par certaines cellules de l'immunité mais aussi libérée par des cellules endommagées. Ainsi, elle peut agir comme un « signal de danger » et activer notamment les DC myéloïdes (Messmer, Yang et al. 2004), alors qu'elle est impliquée dans une boucle autocrine lors de la maturation des DC plasmacytoïdes (Dumitriu, Baruah et al. 2005).

La calréticuline est une autre protéine chaperonne, qui interagit avec le Scavenger Receptor-A (SRA) présent à la surface des DC (Berwin, Hart et al. 2003). Cette protéine a été décrite comme un « eat me signal », ce qui signifie que la reconnaissance de la calréticuline par la DC à la surface des cellules mortes « autorise » son internalisation. La calréticuline partage également des récepteurs en commun avec certaines protéines de la famille HSP, comme le récepteur CD91/LRP, lui permettant d'être reconnue par les CPA (Basu, Binder et al. 2001). Ces signaux sont exprimés par les cellules en nécrose, mais peuvent également être exprimés par des cellules subissant une forme d'apoptose immunogène : la « pyroptosis » caractérisée par l'activation de l'inflammasome et de la caspase 1 qui

vont transformer la pro-IL-1<sub>β</sub> et la pro-IL-18 en IL-1<sub>β</sub> et en IL-18, qui sont des cytokines pro-inflammatoires (Ichinohe and Iwasaki 2009).

Les DC sont aussi sensibles à des signaux de danger tels que les cytokines qui peuvent être sécrétées à la suite d'une infection ou encore par les DC matures elles-mêmes (Matzinger 2002). C'est le cas du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  qui sont considérés comme des signaux de dangers primaires et de « feedback » positif. On peut également noter que les DC sont sensibles aux signaux de danger fournis par d'autres cellules de l'immunité. L'IFN- $\gamma$ , produit par les macrophages activés, les cellules NK ou encore les lymphocytes activés, interagit avec son récepteur présent à la surface des DC. La maturation des DC va alors se caractériser notamment par la perte des capacités de phagocytose, la migration vers les organes lymphoïdes et l'expression de molécules membranaires ainsi que la sécrétion de cytokines.

Le phénotype des DC immatures et des DC matures sont différents. En effet, après maturation des DC, on observe notamment l'apparition du CCR7, du CD83 ainsi que DC-LAMP et l'augmentation du CD40, CD80, CD86, CMH I et CMH II. On observe aussi la sécrétion de cytokines, telles que, entre autres, l'IL-10 et l'IL-12 dans des proportions différentes qui vont orienter la réponse immune.

### **1.2.3. Migration des DC vers les ganglions lymphatiques**

Après la rencontre avec l'antigène, sa reconnaissance et son internalisation, les DC engagent leur processus de maturation. Ceci va engendrer l'apprêtement de l'antigène ainsi que la migration des DC vers les ganglions lymphatiques où elles pourront présenter les antigènes peptidiques aux lymphocytes T. En effet, la migration se fait grâce à de petites molécules, nommées chimiokines, principalement solubles dont leur fonction première est le chimiotactisme et le contrôle de l'activation des acteurs cellulaires de l'immunité. Ces petites protéines de 8 à 14 kDa, sont caractérisées par la présence de 4 résidus cystéine dont la position est conservée, ce qui leur confère leur structure tridimensionnelle. On distingue alors 4 sous-familles qui ont été déterminées selon la position des résidus cystéine dans la protéine mature : la famille C, la famille CC, mais encore les chimiokines CXC et les CX3C.

La sécrétion de chimiokines est dépendante de l'état de maturation des DC et peut être pro-inflammatoire ou constitutive. MIP-1 $\alpha$  (CCL3) et MIP-1 $\beta$  (CCL4) sont des chimiokines inflammatoires sécrétées précocement par les DC, tout comme MCP-1 (CCL2) et RANTES (CCL5). Possédant le même récepteur, CCR5, elles sont impliquées dans l'attraction des lymphocytes T (Kim, Tsai et al. 1999), mais aussi dans le recrutement des monocytes et des polynucléaires neutrophiles au site de l'infection (McColl 2002). Les DC immatures sécrètent également CXCL8 (IL-8), qui est impliquée dans la migration des neutrophiles (Scimone, Lutzky et al. 2005) et CXCL10 (IP-10), qui favorise le recrutement et l'activation des cellules NK (Trifilo, Montalto-Morrison et al. 2004).

Au cours de la maturation, on observe une modification du profil d'expression des récepteurs aux chimiokines. Ainsi une augmentation de l'expression du CCR7 est accompagnée par la diminution de l'expression de CCR1, CCR5 et de CCR6. De nombreuses études montrent également un défaut de la migration chez les modèles murins transgéniques CCR7<sup>-/-</sup> (Martín-Fontecha, Sebastiani et al. 2003; Olmos, Stukes et al. 2010). L'expression du récepteur CCR7 est donc nécessaire à la migration des DC vers les tissus lymphoïdes. Celui-ci possède deux ligands, les chimiokines CCL19 et CCL21, sécrétées par les cellules stromales des zones T dans les ganglions lymphatiques. Par chimiotactisme, les DC matures (CCR7<sup>+</sup>) vont ainsi migrer vers ces régions T où aura lieu la rencontre avec les lymphocytes et la présentation antigénique.

Pour atteindre ce site de rencontre, les DC mettent en jeu de nombreuses autres molécules. En effet, les métalloprotéases (MMP), notamment MMP-9, sont responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire (Yen, Khayrullina et al. 2008). Ensuite, certaines intégrines sont nécessaires pour l'adhésion aux endothéliums vasculaires et la transmigration des DC afin d'atteindre la circulation lymphatique et les organes lymphoïdes secondaires.

Il existe divers régulateurs de la migration des DC vers les ganglions lymphatiques. En effet, la prostaglandine E2 (PGE2) augmenterait l'expression du CCR7 à la surface des DC matures ainsi que la migration (Legler, Krause et al. 2006). Il en serait de même pour les leucotriènes (Del Prete, Shao et al. 2007). Par ailleurs, la molécule HMGB1, via une boucle autocrine-paracrine, permettrait l'augmentation de l'expression de CCR7 à la surface des DC matures (Dumitriu, Bianchi et al. 2007). La production de monoxyde d'azote (NO) dans le milieu environnant serait aussi un facteur favorable à cette migration vers les ganglions lymphatiques (Giordano, Magaletti et al. 2006).

### **1.3. DC : Activation du système immunitaire dans les ganglions lymphatiques**

A l'issue de la migration, les DC arrivent dans les aires paracorticales des ganglions lymphatiques où elles vont interagir avec les lymphocytes. Pour cela, les DC matures produisent d'autres chimiokines, telles que TARC (CCL17), DC-CK1 (CCL18) ou encore MDC (CCL22) qui sont impliquées dans l'attraction des lymphocytes T et B (Imai, Nagira et al. 1999). La sécrétion de ces chimiokines aurait une importance capitale dans la formation de la synapse immunologique (Bromley, Peterson et al. 2000).

#### **1.3.1. Interaction DC/Lymphocytes T**



L'interaction entre la DC et le lymphocyte T se traduit par un échange de signaux d'activation ou d'inhibition via la synapse immunologique. Elle conduit au « priming » des lymphocytes T et au déclenchement d'une réaction immunitaire ou à leur inactivation. L'activation efficace et fonctionnelle des lymphocytes T naifs aboutit à une expansion clonale ainsi qu'à leur différenciation en cellules mémoires ou effectrices et sécrétrices de cytokines. L'activation lymphocytaire est un phénomène dépendant de nombreux facteurs comme la concentration en antigène à la surface des DC, l'affinité du TCR pour le complexe CMH-peptide ou encore l'état de maturation des DC. L'interaction entre DC et lymphocytes T est un processus complexe qui fait intervenir 3 signaux d'activation responsables de l'orientation de la réponse immune.

**Le signal 1** correspond à la présentation de l'antigène sur les molécules du CMH au TCR du lymphocyte T. Ce signal ne suffit pas à l'activation du lymphocyte. En plus de cette stimulation, les lymphocytes nécessitent des signaux supplémentaires pour aboutir à une activation complète.

**Le signal 2** représente des signaux apportés par l'interaction entre des récepteurs et des ligands présents à la surface des DC matures et des lymphocytes. Ce signal correspond à l'ensemble de molécules de costimulation, présent sur les lymphocytes T et les DC, qui vont réguler la réponse immunitaire. On distingue plusieurs familles de molécules de costimulation, notamment la famille des molécules B7 et la famille de TNF, présentes chez les DC.

*Dans la famille des molécules BZ*, les molécules les plus étudiées sont le CD80 (B7-1) et le CD86 (B7-2). Ces deux ligands du CD28, présents sur les lymphocytes T, amplifient le signal obtenu par l'activation via le TCR de celui-ci. Cette costimulation induit la production d'IL-2 et l'expression de certaines molécules, telles que le CD40L et ICOS à la surface des cellules T CD4. Un homologue de CD28, nommé CTLA-4, induit des signaux opposés après fixation des molécules CD80/86, à la costimulation avec le CD28. En effet, CTLA-4 apparaît comme un moyen de régulation de l'activation T, puisque cette costimulation avec CD80/86 augmente la mobilité des lymphocytes T réduisant ainsi la durée d'existence de la synapse immunologique.

*Dans la famille de TNF*, le CD40 est un des récepteurs des DC le plus étudié et le plus décrit. La stimulation de celui-ci par son ligand, CD40L (CD154) notamment présent sur les lymphocytes T, est impliquée dans la maturation des DC en induisant l'expression des molécules de costimulation CD80/86. En 2000, l'équipe de Banchereau décrit les effets qui dérivent d'une costimulation CD40-CD40L entre une CPA et un lymphocyte T CD4 activé (van Kooten and Banchereau 2000). Cette interaction moléculaire est aussi très importante pour l'activation des lymphocytes B (Ma and Clark 2009). En effet, l'interaction CD40-CD40L est impliquée dans de nombreux mécanismes : la sécrétion d'IL-12, la présentation antigénique ainsi que la génération des lymphocytes T cytotoxiques (CTL).

*D'autres molécules* ont été également décrites chez les DC, notamment le CD83 qui est le marqueur caractéristique des DC matures (Zhou and Tedder 1995). Il est membre de la superfamille des Immunoglobulines et est également exprimé sur les lymphocytes T activés. En outre, il n'est pas présent chez les DC immatures et son expression est induite au cours de la maturation, tout comme les molécules de costimulation. Sa fonction a longtemps été mal connue et ses ligands restent encore indéterminés. Cependant, il semblerait qu'il joue un rôle dans le développement des lymphocytes T CD4+ dans le thymus (Fujimoto, Tu et al. 2002), ainsi que dans la régulation de l'interaction entre les DC et les populations lymphocytaires T (Aerts-Toegaert, Heirman et al. 2007). Il existe une forme soluble de cette molécule. Cependant, celle-ci aurait un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules T (Dudziak, Nimmerjahn et al. 2005). Plus récemment, une étude montre que le CD83 augmente l'expression du CMH II et de la molécule de costimulation CD86 en inhibant l'effet de l'IL-10 sur MARCH1 (Tze, Horikawa et al. 2011). La molécule CD83 est très étudiée lors du phénotypage des DC car elle indique l'état de leur maturation : absence de CD83 : DC immatures, présence de CD83 : DC matures.

**Le signal 3** correspond à la sécrétion de cytokines par les DC, en réponse aux deux signaux précédents, qui vont aboutir à l'orientation de la réponse immunitaire et à l'activation finale du lymphocyte T.

L'orientation de la réponse immunitaire va donc être induite en fonction du profil de cytokines produites par les DC matures. En effet, les lymphocytes T CD4 peuvent être orientés vers un profil Th1 caractérisé par la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  favorisant ainsi la différenciation des lymphocytes T CD8 en lymphocytes T cytotoxiques capables d'éliminer les cellules cibles présentant l'antigène. La rencontre entre DC et lymphocytes T serait une rencontre en série, où les DC jouent le rôle de « pont temporel » entre les lymphocytes T CD4 et les lymphocytes T CD8. Selon cette théorie, lors de la génération d'une réponse immunitaire de type cellulaire, les DC interagissent tout d'abord avec les lymphocytes T CD4, induisant leur différenciation en lymphocytes T helpers de type I, qui à leur tour conditionnent les DC afin qu'elles puissent activer les lymphocytes T CD8 en CTL effecteurs ; ce phénomène est appelé la « licence to kill » (Lanzavecchia 1998). Par ailleurs, le priming des lymphocytes T CD4 serait nécessaire à l'induction de lymphocytes T CD8 mémoires (Summers deLuca, Ng et al. 2011), qui jouent un rôle très important dans la réponse anti-tumorale (mémoire immunitaire).

Lors de la génération d'une réponse immunitaire de type humorale, les lymphocytes T CD4 peuvent également être orientés vers un profil Th2 se caractérisant par la sécrétion de cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5 ou encore l'IL-13, assurant une réponse des lymphocytes B caractérisée par la production d'anticorps contre les pathogènes extracellulaires. Le choix du type de réponse immunitaire est plutôt un équilibre entre Th1 et Th2, plutôt qu'un phénomène de tout ou rien.

Cependant l'orientation de la réponse immune dépend aussi de nombreux autres paramètres comme le type de DC impliquées, la concentration en antigène lors du chargement des DC, le ratio entre les DC et les lymphocytes T ou encore la cinétique de la maturation. En effet, les DC en début de maturation seraient plutôt pro-Th1, tandis que dans un état de maturation plus tardif voire « exhausted », elles seraient plutôt pro-Th2. Par ailleurs, l'IL-12, élément majeur de la polarisation Th1, atteint son maximum de sécrétion entre 10 et 18h après induction de la maturation, ce qui correspond à une maturation précoce (Langenkamp, Messi et al. 2000). En outre, la présence du marqueur OX40L (Akiba, Miyahira et al. 2000) ou alors la forte expression, par les DC, de la molécule CD86 par rapport à CD80 (Kuchroo, Das et al. 1995), sont des inducteurs de la réponse Th2.

La réponse immune peut également s'orienter vers un profil régulateur avec la génération de lymphocytes T CD4 ou T CD8 régulateurs. En effet, les DC matures peuvent aussi participer au processus de tolérance, notamment grâce à l'IL-10, au TGF- $\beta$  et surtout àIDO (Indoléamine 2,3-dioxygénase), qui sont des molécules qui peuvent orienter la réponse immune vers un profil régulateur (Hill, Tanguy-Royer et al. 2007).

### **1.3.2. Autres interactions**

#### **Interaction DC-lymphocyte B**

Les DC peuvent également interagir avec les lymphocytes B. Ces derniers sont sensibles aux antigènes solubles, qui peuvent se retrouver liés à la membrane des DC. La présentation des antigènes aux lymphocytes B par les DC nécessite alors la formation de synapses moléculaires constituées de complexes BCR-antigènes regroupés et entourés d'un anneau de LFA1-ICAM-1, où le CD45 et le CD43 sont exclus de la synapse. L'activation des lymphocytes B en plasmocytes s'accompagne d'une commutation isotypique des anticorps sécrétés. Cette activation participe aussi au processus de mutation somatique des BCR afin d'augmenter l'affinité des anticorps produits. Les DC jouent alors un rôle important dans cette activation, via la présentation d'antigènes opsonisés mais aussi parce qu'elles sont à l'origine de la différenciation Th2 des lymphocytes T helpers qui apportent aux lymphocytes B des signaux complémentaires, via le CD40L et l'IL-4. Cette activation est très importante pour la commutation isotypique. Les DC sont également à l'origine de l'activation CD40-indépendante des lymphocytes B par la sécrétion de facteurs solubles activateurs.

#### **Interaction DC-cellules NK**

Les cellules NK appartiennent à la première ligne de défense contre les infections bactériennes ou virales, ou encore à la suite d'une invasion tumorale. Ils reconnaissent leur cible grâce à un panel de récepteurs activateurs ou inhibiteurs. En effet, les cellules NK expriment le CD16 et le CD56 qui sont des récepteurs aux fragments Fc des Immunoglobulines et qui leur permettent de lyser des cibles

opsonisées par des IgG (mécanisme d'ADCC, Antibody-Dependant Cell-mediated Cytotoxicity). Elles expriment aussi certains TLR qui leur permettent de reconnaître différents pathogènes ou encore la molécule KIR dont les ligands sont les molécules CMH de classe I, qui bloque leur cytotoxicité. Lorsque des cellules, par exemple infectées par des virus, perdent l'expression des molécules du CMH de classe I et donc leur capacité de présenter les antigènes viraux, elles sont lysées par les cellules NK. C'est donc la balance de ces différents signaux qui déterminera l'activité des NK. Ces cellules activées peuvent sécréter différentes cytokines comme le GM-CSF ou le TNF- $\alpha$  ou encore des chimiokines, telles que CCL3 ou CCL5.

Les DC peuvent interagir avec les cellules NK par la sécrétion de diverses cytokines, telles que les cytokines de la famille de l'IL-12, qui vont induire la sécrétion d'IFN- $\gamma$ . Réciproquement, les NK sont capables d'induire la maturation des DC via la sécrétion de cytokines, telles que le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ . Par la sécrétion de cytokines, les NK peuvent alors orienter les lymphocytes vers un profil Th1 (Agaugue, Marcenaro et al. 2008).

Les DC sont ainsi capables d'interagir avec différentes populations lymphocytaires et d'induire l'orientation de la réponse immune. Leur propriété activatrice des autres cellules immunitaires dépend cependant de leur état de maturation (Ip and Lau 2004). En effet, les DC immatures seraient moins efficaces que les DC matures pour induire une réponse immunitaire contre la tumeur. De plus, la maturation des DC réalisée *in vitro* est très souvent incomplète et induit donc une réponse anti-tumorale insuffisante pour induire le rejet tumoral (Castiello, Sabatino et al. 2011). L'immunothérapie représente ainsi un espoir face aux traitements anti-tumoraux conventionnels, souvent très lourds. Cependant, ne faut-il pas améliorer la maturation des DC pour obtenir une réponse immunitaire clinique objective, lors de prochains essais thérapeutiques.

## **2. L'immunothérapie**

### **2.1. Découverte de la réponse immunitaire anti-tumorale et définition de l'Immunothérapie**

Dés 1909, Paul Ehrlich a suggéré que la prolifération anormale des cellules cancéreuses puisse être contrôlée par notre système immunitaire. Cependant, à l'époque, cette idée fut rejetée et ce n'est qu'en 1950 que Frank M. Burnet et Lewis Thomas ont proposé la théorie de l'immunosurveillance des cancers. D'après cette théorie, tout au long de notre vie le système immunitaire élimine constamment des cellules cancéreuses. Cette interaction entre le système immunitaire et la tumeur se déroulerait selon trois phases : premièrement la phase d'élimination, où la tumeur est détruite ; deuxièmement la phase d'équilibre, où la tumeur est contrôlée mais non détruite ; et pour finir la phase d'échappement où les cellules tumorales passent au travers du contrôle exercé par les cellules immunitaires et prolifèrent. Après des années de controverses, cette théorie a été confirmée par l'équipe de Robert Schreiber (Dunn, Bruce et al. 2002), on parle alors de théorie des 3 E (Elimination, Equilibre et Echappement). Dans les années 1990, l'identification de nombreux antigènes de tumeurs reconnus par les lymphocytes T et B de patients, a confirmé l'existence d'une immunité spontanée vis-à-vis de la tumeur. L'équipe de Thierry Boon met en évidence le premier antigène spécifique du mélanome reconnu par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, nommé MAGE-1, non exprimé dans les cellules saines (van der Bruggen, Traversari et al. 1991).

A l'heure actuelle, l'immunothérapie anti-tumorale fait l'objet d'une recherche extrêmement active afin d'améliorer la prise en charge thérapeutique du cancer. En effet, le traitement du cancer fait classiquement appel à 3 types de traitement, qui sont diversement associés en fonction des caractéristiques de la tumeur : la chirurgie qui consiste en l'ablation ou en la réduction de la masse tumorale, la radiothérapie et la chimiothérapie. Ces deux dernières techniques ont le même objectif, qui consiste en l'élimination des cellules cancéreuses à proximité de la tumeur ou dispersées dans l'organisme. La première se fait par le biais de rayonnements ciblés sur la tumeur et la seconde par le biais de molécules cytotoxiques. Cependant, ces traitements aux effets secondaires parfois très lourds, ne suffisent pas toujours à l'obtention de la rémission, aboutissant à une impasse thérapeutique pour les patients. Ainsi, il se fait sentir un besoin urgent de nouvelles approches thérapeutiques ; l'immunothérapie semble être une de ces approches.

En effet, si elle est bien insuffisante à elle seule, elle prend une place de plus en plus importante aux côtés des traitements conventionnels. Cette approche consiste à amplifier la réponse immunitaire anti-

tumorale spontanée ou à en déclencher de nouvelles, afin de provoquer le rejet des cellules tumorales par les cellules du système immunitaire.

## **2.2. L'immunothérapie anti-tumorale**

L'immunothérapie anti-tumorale regroupe un ensemble de stratégies thérapeutiques très différentes, qui a débouché sur trois approches principales : l'immunothérapie non spécifique (n'utilisant pas d'antigène), l'immunothérapie spécifique passive et l'immunothérapie spécifique active (toutes deux spécifiques de l'antigène). Ces approches reposent sur des procédés bien distincts.

### **2.2.1. L'immunothérapie non spécifique**

Cette approche est la première à avoir été développée, avant même l'identification des premiers antigènes de tumeurs. Différentes thérapies ont alors été utilisées dans le cadre de l'immunothérapie non spécifique. L'une d'entre elle, la BCG thérapie, repose sur l'utilisation du Bacille de Calmette-Guerin (BCG). En effet, en plus de son utilisation comme vaccin contre la tuberculose, il est utilisé en routine dans la prise en charge thérapeutique du carcinome urothélial de la vessie. Comme d'autres approches, les mécanismes à travers lesquels le BCG génère des réponses anti-cancéreuses n'ont pas été élucidés. Cependant, des équipes ont tout de même proposé des modes d'action pour la BCG thérapie (Kresowik and Griffith 2009).

Les essais d'immunothérapie non spécifique ont aussi fait appel à l'utilisation de certaines cytokines possédant une activité anti-tumorale. Ainsi, pour stimuler l'activation des cellules immunitaires, l'IFN- $\alpha$  (interféron alpha) peut être utilisé et de nombreuses équipes se sont intéressées à son utilisation dans l'immunothérapie non spécifique des cancers (Canil, Hotte et al. 2010). On peut noter aussi que l'IL-2 est très utilisée dans l'immunothérapie contre le mélanome et le carcinome du rein, pour son rôle dans la prolifération des lymphocytes T et NK. Récemment, l'équipe de Murakami (Jin, Hirano et al. 2008) a démontré que le complexe immunitaire IL-2/anti-IL-2 est plus efficace dans son rôle anti-tumoral que la cytokine seule.

L'IL-2 est aussi utilisée dans le cadre de thérapie cellulaire non spécifique, avec les premiers essais concernant les LAK (Lymphokine Activated Killer). Celles-ci sont des cellules lymphocytaires activées *in vitro* par des fortes doses d'IL-2 et qui développent des activités cytotoxiques contre les cellules tumorales. L'équipe de Rosenberg a fait des essais cliniques chez l'humain avec des taux de succès chez 30% des patients, mais ces résultats n'ont pas été reproduits par d'autres équipes par la suite (Rosenberg, Lotze et al. 1987). Quatre ans plus tard, il a également montré les effets toxiques de

l'IL-2 (Sherry, Rosenberg et al. 1991) ce qui a conduit à d'autres stratégies plus spécifiques, comme l'utilisation des TIL (Tumor Infiltrating Lymphocyte).

### **2.2.2. L'immunothérapie spécifique passive**

L'immunothérapie passive ne vise pas à activer le système immunitaire de manière systématique *in situ*, mais fait appel à des effecteurs de l'immunité qui reconnaissent spécifiquement des antigènes de tumeurs, et qui sont isolés et activés *in vitro* avant leur réinjection. L'immunothérapie passive se pratique selon deux modalités principales : les anticorps monoclonaux et le transfert adoptif des cellules T.

#### **Les anticorps monoclonaux**

En 1975, Kohler et Milstein publient la production d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de tumeur par des hybridomes, résultats de la fusion de lymphocytes B de souris avec des cellules de myélome (Kohler and Milstein 1975). Les anticorps monoclonaux exploitent des mécanismes immunitaires comme l'ADCC ou le CDC (Complement Dependant Cytotoxicity). Ils peuvent aussi induire le processus d'apoptose ou altérer des voies de transduction impliquées dans la prolifération cellulaire. Après des premiers résultats cliniques très décevants, une nouvelle ingénierie de production a été établie, avec notamment la mise en place d'anticorps humanisés. Aujourd'hui, des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes spécifiques ou associés aux tumeurs, sont actuellement utilisés en routine dans de nombreux cancers et sont connus sous le nom de « thérapie ciblée ». Le trastuzumab, anticorps anti-HER2, est utilisé dans le traitement du cancer du sein (Vogel, Cobleigh et al. 2002); le rituximab, anticorps anti-CD20, dans celui du lymphome non hodgkinien (Colombat, Salles et al. 2001). Dernièrement, des anticorps monoclonaux couplés à des particules radioactives ou à des toxines ont été développés afin d'améliorer l'induction de la mort des cellules ciblées (Sharkey and Goldenberg 2008).

#### **Les lymphocytes (transfert adoptif)**

Les années 80 et 90 ont vu le développement de l'immunothérapie adoptive, basée sur l'injection de lymphocytes. Les premiers essais, qui étaient plus du domaine de l'immunothérapie non spécifique de l'antigène, concernant les LAK, ont rapidement trouvé leur limite de part leur complexité de production et leurs effets secondaires importants. D'autres stratégies, plus spécifiques de la tumeur, sont alors envisagées, comme l'utilisation des TIL (Rosenberg, Yannelli et al. 1994). En effet, ces lymphocytes ont une spécificité accrue pour leur cible, puisqu'ils sont isolés à partir de biopsies tumorales et amplifiés *in vitro* avec de faibles doses d'IL-2. Cette stratégie a notamment été développée à Nantes dans le cadre de traitement des mélanomes, qui représente un excellent modèle, où des résultats extrêmement encourageants ont été montrés (Dreno, Nguyen et al. 2002; Labarriere,

Pandolfino et al. 2002). Egalement dans un modèle de mélanome, des lymphocytes spécifiques de tumeurs générés *in vitro* à partir de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) de patients ont pu être utilisés (Vignard, Lemerrier et al. 2005).

### **2.2.3. L'immunothérapie spécifique active**

L'immunothérapie spécifique active, également appelée vaccination thérapeutique (par opposition à la vaccination prophylactique), consiste à injecter l'antigène dans un contexte idéal de stimulation, de manière à générer chez le patient une réponse T anti-tumorale. Cette stratégie est fondée sur la capacité du système immunitaire du receveur à répondre à la vaccination. Par conséquent, les patients inscrits dans ces essais doivent être immunocompétents. Les vaccins anti-tumoraux sont basés généralement sur l'utilisation d'antigènes de tumeurs, de cellules tumorales autologues ou allogéniques ou bien de DC présentant des antigènes de tumeurs. Cette vaccination permet ainsi l'induction de la réponse immunitaire contre ces antigènes, voire le développement d'une mémoire immunitaire à long terme afin de protéger les patients de récurrences éventuelles.

#### **La vaccination par injection d'antigènes de tumeur**

Cette stratégie vaccinale dépend naturellement de la connaissance préalable des antigènes de tumeurs exprimés par les cellules cancéreuses du patient. Les antigènes sont injectés avec des adjuvants (Gregoriadis 1999; Jerome, Graser et al. 2006), sous différentes formes : peptides, protéines entières, ARN ou ADN « nu », ou codé dans des vecteurs d'expression (Moingeon 2001; Lonchay, van der Bruggen et al. 2004). L'utilisation d'IFN- $\gamma$  et la combinaison de plusieurs antigènes de tumeur permettent de maintenir l'expression des molécules du CMH par les cellules tumorales et de limiter les phénomènes d'évasions de variants antigéniques (Yannelli and Wroblewski 2004; Qin, Zhou et al. 2006).

#### **La vaccination par injection de cellules tumorales**

Dans l'idéal, cette vaccination est réalisée avec des cellules tumorales autologues, généralement sous forme de lysat ou irradiées. Dans ce cas, le patient est alors théoriquement immunisé contre tous les antigènes exprimés par sa propre tumeur. Cette méthode est toutefois limitée par la quantité de cellules tumorales disponibles et elle n'est, bien entendu, pas réalisable chez les patients dont la tumeur n'est pas accessible. Une alternative peut être apportée par l'établissement d'une lignée tumorale autologue ; mais encore une fois, cela n'est pas applicable à tous les patients. Dans une étude concernant 695 patients atteints de différents types de cancers métastatiques, les auteurs ont pu établir des lignées cellulaires à court terme chez seulement 43% des patients (Dillman, Beutel et al. 2002).



Devant ces difficultés, l'utilisation de lignées tumorales allogéniques partageant des antigènes de tumeur avec les cellules du patient a été développée. Ces lignées présentent l'avantage d'être parfaitement disponibles.

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

### **La vaccination par injection de cellules dendritiques (DC)**

Depuis le premier essai clinique réalisé en 1996 (Hsu, Benike et al. 1996), cette dernière approche s'est considérablement développée. Aujourd'hui, on dénombre plus de 200 essais qui sont recensés sur le site <http://www.clinicaltrials.gov/ct>. Dans le cadre de cette vaccination, les cellules dendritiques sont souvent préparées *ex vivo* par chargement avec des antigènes tumoraux ou des cellules tumorales mortes. Cette stratégie dépend de nombreux paramètres liés à la préparation *in vitro* des cellules tels que : le mode de chargement et la nature des antigènes tumoraux, la production et l'état d'activation des DC au moment du traitement ou encore le micro-environnement tumoral qui peut participer à l'inhibition de la réponse immunitaire (Lesimple, Neidhard et al. 2006).

## **2.3. Les DC et la vaccination anti-tumorale**

Les vaccins anti-tumoraux à base de DC sont souvent testés en dernière ligne de traitement sur des tumeurs déjà réfractaires à toutes les approches thérapeutiques classiques, ce qui limite leur efficacité thérapeutique. Pourtant, du point de vue de la réponse anti-tumorale les premiers essais cliniques rapportent des résultats tout à fait intéressants, même à des stades avancés de la maladie. Le groupe de Schuler décrit des régressions de métastases chez 6 patients sur 11 atteints de mélanome métastatique de stade IV (Turner, Haendle et al. 1999). De plus la toxicité de la vaccination par DC semble extrêmement limitée, puisque les effets secondaires observés se limitent à des fièvres et à des réactions cutanées pour le plus souvent.

### **2.3.1. Préparation des DC**

La production de DC dans le cadre d'un protocole clinique nécessite l'utilisation de réactifs de grade clinique encore appelés GMP (Good Manufacturing Practice). Ces protocoles sont réalisés dans des conditions standardisées et reproductibles avec une traçabilité de tous les consommables utilisés.

#### **2.3.1.1. Sous-population de DC utilisées**

La production de DC peut se faire à partir de plusieurs types cellulaires. Les DC majoritairement utilisées dans le cadre de protocoles d'immunothérapie anti-tumorale sont celles produites à partir de monocytes (MoDC). Cette méthode de production de DC fut décrite en premier par *Sallusto F. et al* et à révolutionner l'étude des DC ainsi que leur utilisation dans des essais cliniques (Sallusto and Lanzavecchia 1994). Cependant, certains protocoles utilisent des DC myéloïdes circulantes, des DC dérivées des précurseurs CD34+ ou encore de cellules tumorales dans le cadre de la leucémie myéloïde aigue.

Aujourd'hui, le mode de production de DC le plus exploité en immunothérapie anti-tumorale est celui à partir des monocytes du sang. Cette stratégie permet d'obtenir assez facilement une grande quantité de cellules. Il existe plusieurs techniques pour purifier les monocytes à partir du sang périphérique : par adhérence sur plastique, par élutriation (centrifugation à contre-courant) et par tri avec des billes magnétiques.

La technique par adhérence sur plastique est la plus simple à réaliser et la moins couteuse. Cependant, elle possède l'inconvénient d'avoir un rendement faible et très variable d'un donneur à l'autre, ainsi que la présence importante de contaminants lymphocytaires. L'élutriation en revanche, est une technique reproductible qui permet d'obtenir, quelque soit le donneur, une population monocyttaire pure à 95% en moyenne. Cette méthode aboutit à l'obtention de DC avec des capacités allostimulatrices équivalentes à celles obtenues avec la technique par adhérence (Berger, Strasser et al. 2005). C'est essentiellement sur des critères de pureté et de rendement cellulaire ainsi que de reproductibilité, que ces deux techniques se différencient. La dernière approche, le tri sur billes magnétiques, peut comporter également des problèmes de rendement cellulaire. De plus, l'une des limites de cette technique est la présence résiduelle de billes à la surface des DC obtenues après un tri positif.

Les monocytes ainsi purifiés sont ensuite cultivés pendant 4 à 6 jours à 37°C, en présence de GM-CSF et d'IL-4, qui est le cocktail le plus utilisé. Il existe d'autres cocktails utilisés, conservant toujours le GM-CSF, où l'IL-4 est remplacé par l'IFN- $\gamma$ , l'IL-13 ou encore l'IL-15. Les monocytes sont alors différenciés en DC de phénotype immature avec une expression relativement faible des molécules de costimulation.

Les trois autres méthodes utilisées en immunothérapie anti-tumorale (purification de DC à partir du sang, différenciation à partir des CD34+ ou de cellules tumorales) pour isoler les DC sont des techniques relativement plus complexes et qui comportent des désavantages, tels que : la faible quantité de cellules obtenues à partir des DC circulantes ou encore la longueur du protocole (2 semaines de culture en présence de GM-CSF et de TNF- $\alpha$ ) pour l'obtention de DC à partir des précurseurs CD34+. En ce qui concerne l'obtention de DC à partir de cellules tumorales, cette

stratégie est le plus couramment utilisée dans le cadre de la LAM (leucémie aigu myéloblastique) où les cellules tumorales dérivent de cellules immunitaires capables de se différencier en DC. Malgré la pratique de ces dernières stratégies dans quelques protocoles d'essais cliniques, ces méthodes restent aujourd'hui très marginales.

### **2.3.1.2. Maturation des DC**

Les premiers essais cliniques ont été réalisés avec des DC immatures. Les MoDC immatures sont ainsi utilisées dans 42% des essais cliniques. Cependant, on a remarqué une accumulation de celles-ci au site d'injection, due à une faible capacité de migration vers les ganglions lymphatiques. En plus, les DC immatures auraient plutôt des propriétés tolérogènes (Dhodapkar, Steinman et al. 2001). Depuis une dizaine d'années, la majorité des essais cliniques utilisent maintenant des DC matures. La supériorité des DC matures par rapport à celle des DC immatures pour l'induction d'une réponse anti-tumorale a été confirmée.

Pour induire la maturation des DC, de nombreuses molécules ont été utilisées dans les essais cliniques au cours de ces dernières années. Ces molécules doivent être de grade clinique. Les premiers essais, ainsi que de nombreux autres, ont été réalisés avec le TNF- $\alpha$ , car c'est le premier stimulus de maturation mis en évidence pour les DC issues de monocytes (Sallusto and Lanzavecchia 1994). Des agents de maturation plus complexes ont aussi été mis au point, comme le MCM (Monocyte-Conditioned Medium), obtenu par culture de monocytes activés par des immunoglobulines immobilisées. Il a notamment été employé par l'équipe de Schuler dans le cadre de la production de DC matures pour une utilisation clinique (Thurner, Roder et al. 1999). Au bout de 24h de maturation avec le MCM, les auteurs observent notamment 85% de cellules CD83 positives, dites « matures ». Pour des problèmes de standardisation de production, le MCM a été remplacé par un cocktail de maturation composé de cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6 +/- PGE2) (Jonuleit, Kuhn et al. 1997). L'ajout de la PGE2 induirait par ailleurs, une meilleure migration et l'obtention d'un meilleur rendement et d'une meilleure qualité des cellules obtenues, mais diminuerait la production d'IL-12p70, nécessaire à l'induction de la réponse immunitaire cellulaire Th1.

Le TNF- $\alpha$  peut toutefois être substitué par de l'IFN. En effet, les IFN de type I peuvent être utilisés pour la différenciation et l'activation des DC, dans le but d'améliorer les stratégies anti-tumorales (Santini, Lapenta et al. 2009).

La production de cytokines ainsi que l'apparition ou l'augmentation de molécules de surface est transitoire et maximale à un instant donné. De nombreuses équipes choisissent alors une maturation moyenne de 24h. Cependant, à un stade tardif de la maturation, les DC sont qualifiées d'« épuisées »

(exhausted), puisqu'elles ont perdu leur pouvoir sécrétoire. Une courte activation des DC serait alors recommandée pour avoir une meilleure expression des molécules de surface, une meilleure sécrétion des cytokines et une meilleure migration. Des travaux chez un modèle murin vont dans ce sens, démontrant la prépondérance des DC activées pendant un temps court (3h) dans le rejet tumoral (Watanabe, Kagamu et al. 2003). Il semblerait donc favorable, à l'heure actuelle, de diminuer le temps de maturation des DC dans le cadre d'une production pour un usage clinique.

### **2.3.2. Chargement en antigènes des DC**

Le chargement en antigènes des DC peut être physiologique, via la présentation antigénique après internalisation des antigènes de tumeur, ou artificielle en exploitant les techniques d'électroporation ou de fusion. On obtient alors la présentation des antigènes par les molécules de présentation : le CMH-I et le CMH-II. Plusieurs méthodes sont utilisées dans les essais cliniques, telles que l'utilisation de peptides, les cellules mortes, les protéines ou encore l'ADN ou l'ARN.

#### **Les peptides**

Le mode de chargement utilisant des peptides est largement utilisé en immunothérapie anti-tumorale. Les peptides utilisés dérivent d'antigènes de tumeur et comportent entre 9 et 11 acides aminés. Cette stratégie est relativement simple à mettre en place, mais nécessite l'identification préalable des épitopes tumoraux ce qui représente une limite majeure à l'utilisation des peptides. De plus, seuls les patients exprimant l'allèle HLA qui présente le peptide sont éligibles à cette approche. Ainsi, la majorité des essais cliniques avec des DC chargées en peptides ont été réalisés chez des patients HLA-A2+, qui est l'allèle du CMH de classe I le plus fréquent dans la population caucasienne (environ 50% de la population).

Enfin, la stabilité du complexe CMH-peptide après chargement peut être problématique. En effet, les peptides synthétiques peuvent avoir une faible affinité pour les molécules du CMH entraînant ainsi des problèmes d'immunogénicité. Actuellement, les protocoles cliniques s'orientent vers le chargement des DC avec plusieurs peptides (Banchereau, Palucka et al. 2001), ce qui permettrait de limiter l'échappement tumoral.

#### **Les cellules tumorales mortes**

Ce procédé repose sur la capacité d'internalisation physiologique des DC. L'utilisation des cellules tumorales mortes ne nécessite pas la caractérisation des antigènes exprimés par la tumeur. En effet, grâce à la phagocytose, les cellules sont « digérées » et potentiellement tous les peptides antigéniques ont ainsi accès aux voies de présentation antigénique par le CMH-I ou le CMH-II, permettant le déploiement d'une réaction immune variée (Gauvrit, Brandler et al. 2008). De plus, la restriction HLA

n'est plus un problème comme avec les peptides et tous les patients peuvent alors bénéficier de cette approche.

### Les protéines

Cette stratégie repose sur la capacité des DC à internaliser des protéines solubles, puis de présenter les épitopes antigéniques générés via le CMH-I ou le CMH-II. Malheureusement, dans la pratique cette technique s'avère peu efficace. En effet, la capture de protéines solubles est relativement inefficace et est améliorée si les protéines sont associées à du matériel cellulaire ou sous forme de complexes immuns (Larsson, Fonteneau et al. 2001). Toutefois, la présentation des antigènes peut être augmentée par l'utilisation d'adjuvants (Chen, Jackson et al. 2004).

### Les ADN et les ARN

Cette stratégie est souvent effectuée par co-transfection de l'ADN ou de l'ARN codant pour les antigènes de tumeurs avec des gènes codants pour des molécules de co-stimulation ou des cytokines (Chen, Yao et al. 2010). En immunothérapie, on utilise principalement les vecteurs viraux pour la transfection avec une bonne efficacité, même si elle peut être limitée par d'éventuelles réactions dirigées contre les antigènes viraux. Les autres stratégies de transfection non virale sont également possibles (la lipofection, l'électroporation ou l'utilisation de microparticules phagocytibles). Cependant leur efficacité est généralement inférieure à celle des vecteurs viraux.

La transfection des DC avec de l'ARN sera préférée car celui-ci est facile à produire. Pratique à extraire d'un prélèvement tumoral, puis amplifiable par PCR (Polymerase Chain Reaction), celui-ci est alors potentiellement disponible en quantité infinie.

### La fusion

Cette technique consiste en la fusion de DC et de cellules tumorales par traitement électrique, chimique (traitement au Poly-Ethylène Glycol) ou encore après transfection des cellules tumorales avec le gène codant pour la protéine virale FMG (Fusogenic Membran Glycoprotein). Les hybrides obtenus présentent alors les capacités de présentation et d'activation des DC ainsi que l'expression d'antigènes tumoraux (Koido, Hara et al. 2009). Cependant, l'utilisation de cette technique reste limitée de part l'efficacité même de la fusion qui est faible et de la difficulté de caractériser et de standardiser les hybrides obtenus.

### Les exosomes de DC (DEX) et les exosomes de cellules tumorales (TEX)

Les DC peuvent sécréter de petites vésicules très immunogènes, appelées « exosomes » qui ont la capacité de démultiplier la réponse immunitaire T anti-tumorale. Les exosomes issus de DC (DEX) sont alors obtenus à partir des DC de patients cultivées *ex vivo* en milieu enrichi par des antigènes tumoraux. Ils ont ainsi de grandes capacités à activer les lymphocytes T et les cellules NK pour induire une réponse immunitaire anti-tumorale efficace. La préparation de DEX chargés avec différents

antigènes tumoraux a été mise au point et évaluée dans deux essais cliniques de phase I sur des patients atteints de mélanome métastatiques et des patients atteints de cancer bronchique avancé (Viaud, Thery et al. 2010). Ces essais cliniques ont permis d'observer l'absence de la toxicité des DEX (à la dose utilisée) et des réponses cliniques objectives chez certains patients.

Les cellules tumorales peuvent également sécréter des exosomes (TEX). Ceux-ci pourraient représenter de nouveaux outils thérapeutiques anti-tumoraux (Iero, Valenti et al. 2008).

### **2.3.3. Essais cliniques utilisant les DC**

Depuis ces dernières années, les DC sont très utilisées dans les essais cliniques de vaccination anti-tumorale. Depuis le premier essai clinique en 1996, de nombreuses équipes se sont mobilisées afin d'alimenter les connaissances sur l'immunothérapie. En effet, l'équipe de Nestle a recensé un nombre conséquent d'équipes ayant publié des essais cliniques innovants, portant tant sur les tumeurs solides : mélanome, cancer du rein ou de la prostate, que sur les hémopathies malignes : myélome multiple, lymphome non hodgkinien. Dans plus de 75% de ces essais une réponse immune spécifique de l'antigène utilisé pour le chargement des DC, a été observée (Nestle 2000). Cette même équipe, a d'ailleurs réalisé un essai clinique sur des patients atteints de mélanome avec des résultats très prometteurs. En effet, une réponse objective était observée chez 5 patients sur 16 traités (Nestle, Alijagic et al. 1998).

Après les années 2000, les essais cliniques se sont multipliés. En 2003, une équipe mène une étude sur la vaccination par DC chargées avec un lysat de protéines tumorales chez des patients atteints de lymphome T (Maier, Tun-Kyi et al. 2003). Les auteurs observent alors une réponse objective chez 50% des patients. Dans les années suivantes, deux essais de phase III randomisés ont été rapportés. Le groupe de Schuler a comparé chez des patients atteints de mélanome de stade IV, le traitement par chimiothérapie (dacarbazine) et la vaccination par DC dérivées de monocytes et chargées en antigènes de tumeur (Schadendorf, Ugurel et al. 2006). Cette étude devait initialement montrer la supériorité de la vaccination par rapport à la chimiothérapie. Celle-ci a pourtant été arrêtée avant son terme, devant l'absence de succès du traitement par DC (3,8% de réponses objectives après la vaccination par DC contre 5,5% après la chimiothérapie).

Une autre équipe a réalisé une étude comparant la vaccination utilisant les DC contre un placebo, chez des patients atteints de cancer de la prostate métastatique réfractaire à l'hormonothérapie (Small, Schellhammer et al. 2006). Les DC utilisées sont purifiées à partir de prélèvements sanguins et sont chargées avec l'antigène PAP (Prostatic Antigen Phosphatase) couplé au GM-CSF. Dans cette étude, 82 patients sont traités avec les DC et 45 reçoivent un placebo. Les auteurs n'ont observé aucune différence significative sur la progression tumorale ; par contre la vaccination semble apporter un

bénéfice sur la survie globale des patients (à 36 mois, la survie dans le bras DC est de 34% contre 11% dans le bras placebo). Cette étude a conduit à l'homologation par la Food and Drug Administration (FDA) du premier vaccin thérapeutique à base de DC pour le traitement du cancer de la prostate : le Provenge (Sipuleucel-T).

Par ailleurs, en 2010 une équipe démontre l'importance de la vaccination par DC réalisée avant un traitement classique, dans l'obtention d'une réponse clinique objective (Ridolfi, Petrini et al. 2010). La vaccination est réalisée chez 24 patients atteints de mélanome de stade IV. La réponse globale de la vaccination est de 37,5%. Parmi ces patients, 11 ont subi d'autres traitements conventionnels après la vaccination. On observe dans ce cas, une réponse globale de 63,6%. La médiane de survie est également augmentée puisqu'elle évolue de 15 à 34 mois.

Le consensus actuel sur l'immunothérapie à base de DC est qu'elle est capable de générer des réponses immunitaires anti-tumorales, qui ne sont pas très efficaces pour obtenir des réponses cliniques chez les patients. Cette approche doit alors être améliorée pour augmenter l'efficacité clinique des réponses immunitaires anti-tumorales.

## OBJECTIFS

L'immunothérapie des cancers utilisant les cellules dendritiques (DC) est une approche thérapeutique qui, depuis plusieurs années, a été évaluée dans de nombreux essais cliniques. Cette stratégie de vaccination anti-tumorale est basée sur les propriétés particulières des DC décrites comme étant les meilleures cellules présentatrices d'antigènes et activatrices de réponses immunitaires innées ou acquises. Cependant l'efficacité thérapeutique anti-tumorale est très loin de répondre aux espoirs suscités. En effet, si dans les essais cliniques réalisés, la vaccination par DC génère une réponse immune, cette dernière semble insuffisante pour induire le rejet tumoral. Aujourd'hui, l'efficacité clinique de la vaccination par DC et sa place dans la prise en charge thérapeutique du cancer restent donc à définir. Une critique des protocoles d'immunothérapie serait donc nécessaire, de la production des DC jusqu'à la vaccination anti-tumorale elle-même.

C'est dans cette optique que notre équipe a développé deux protocoles d'induction de mort des cellules tumorales, qui pourraient servir de source d'antigène pour une immunothérapie par DC. Le premier protocole utilise la souche vaccinale du virus de la rougeole (Schwarz) qui infecte et induit la mort des cellules tumorales avec un rejet important de molécules de danger (DAMP). Le second est basé sur l'utilisation de drogues épigénétiques ayant la capacité de tuer les cellules tumorales et de provoquer chez elles, l'expression d'antigènes de tumeur. Les cellules tumorales tuées par ces deux approches pourront alors servir de sources d'antigènes pour les DC. De plus, le laboratoire possède une bio-collection de lignées tumorales de mésothéliome, nous offrant un large choix de modèles expérimentaux.

Afin de développer un protocole de vaccination par des DC chargées en cellules tumorales mortes, j'ai tout d'abord étudié la production de ces cellules dans l'objectif de leur utilisation dans un cadre clinique, en immunothérapie. La première partie de mon travail a donc consisté à mettre en place une production de DC standard dans les conditions d'utilisation clinique. Dans un second temps, j'ai analysé les modalités d'induction de mort des cellules tumorales utilisées au laboratoire, afin de les adapter à notre travail clinique. En effet, mon projet requiert l'utilisation de produits de grade clinique, dans l'objectif de valider cette étude pour un essai thérapeutique. Pour finir, j'ai observé l'état de maturation des DC lors de co-culture avec les cellules tumorales tuées, en étudiant leur phénotype et leurs capacités de sécrétion, de migration et d'activation lymphocytaire.



## BIBLIOGRAPHIE

- Aerts-Toegaert, C., C. Heirman, et al. (2007). "CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses." Eur J Immunol **37**(3): 686-695.
- Agaugue, S., E. Marcenaro, et al. (2008). "Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells." Blood **112**(5): 1776-1783.
- Akiba, H., Y. Miyahira, et al. (2000). "Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis." J Exp Med **191**(2): 375-380.
- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
- Amigorena, S. and A. Savina (2010). "Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells." Curr Opin Immunol **22**(1): 109-117.
- Anderson, K. V., L. Bokla, et al. (1985). "Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product." Cell **42**(3): 791-798.
- Bajor, A., S. Tischer, et al. (2011). "Modulatory role of calreticulin as chaperokine for dendritic cell-based immunotherapy." Clin Exp Immunol **165**(2): 220-234.
- Banchereau, J. and A. K. Palucka (2005). "Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer." Nat Rev Immunol **5**(4): 296-306.
- Banchereau, J., A. K. Palucka, et al. (2001). "Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine." Cancer Res **61**(17): 6451-6458.
- Basu, S., R. J. Binder, et al. (2001). "CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin." Immunity **14**(3): 303-313.
- Berger, T. G., E. Strasser, et al. (2005). "Efficient elutriation of monocytes within a closed system (Elutra) for clinical-scale generation of dendritic cells." J Immunol Methods **298**(1-2): 61-72.
- Berwin, B., J. P. Hart, et al. (2003). "Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells." EMBO J **22**(22): 6127-6136.
- Boes, M., A. J. Stoppelenburg, et al. (2009). "Endosomal processing for antigen presentation mediated by CD1 and Class I major histocompatibility complex: roads to display or destruction." Immunology **127**(2): 163-170.
- Bolt, G. (2001). "The measles virus (MV) glycoproteins interact with cellular chaperones in the endoplasmic reticulum and MV infection upregulates chaperone expression." Arch Virol **146**(11): 2055-2068.
- Bromley, S. K., D. A. Peterson, et al. (2000). "Cutting edge: hierarchy of chemokine receptor and TCR signals regulating T cell migration and proliferation." J Immunol **165**(1): 15-19.
- Bulut, Y., E. Faure, et al. (2002). "Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway." J Immunol **168**(3): 1435-1440.
- Calugaru, A., L. Cremer, et al. (2009). "Recognition and modulation of Dectin-1 and TLR-2 receptors by curdlan derivatives and purified natural extracts." Roum Arch Microbiol Immunol **68**(3): 119-124.
- Canil, C., S. Hotte, et al. (2010). "Interferon-alfa in the treatment of patients with inoperable locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: a systematic review." Can Urol Assoc J **4**(3): 201-208.
- Castiello, L., M. Sabatino, et al. (2011). "Monocyte-derived DC maturation strategies and related pathways: a transcriptional view." Cancer Immunol Immunother **60**(4): 457-466.

- Chen, Q., H. Jackson, et al. (2004). "Immunodominant CD4+ responses identified in a patient vaccinated with full-length NY-ESO-1 formulated with ISCOMATRIX adjuvant." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(25): 9363-9368.
- Chen, Y. Z., X. L. Yao, et al. (2010). "Gene carriers and transfection systems used in the recombination of dendritic cells for effective cancer immunotherapy." Clin Dev Immunol **2010**: 565643.
- Choi, G. S., J. M. Kang, et al. (2000). "Analysis of methods for the generation of dendritic cells from human peripheral blood monocytes." Yonsei Med J **41**(5): 642-650.
- Colombat, P., G. Salles, et al. (2001). "Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as single first-line therapy for patients with follicular lymphoma with a low tumor burden: clinical and molecular evaluation." Blood **97**(1): 101-106.
- Cravens, P. D. and P. E. Lipsky (2002). "Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases." Immunol Cell Biol **80**(5): 497-505.
- Del Prete, A., W. H. Shao, et al. (2007). "Regulation of dendritic cell migration and adaptive immune response by leukotriene B4 receptors: a role for LTB4 in up-regulation of CCR7 expression and function." Blood **109**(2): 626-631.
- Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, et al. (2001). "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells." J Exp Med **193**(2): 233-238.
- Dillman, R. O., L. D. Beutel, et al. (2002). "Irradiated cells from autologous tumor cell lines as patient-specific vaccine therapy in 125 patients with metastatic cancer: induction of delayed-type hypersensitivity to autologous tumor is associated with improved survival." Cancer Biother Radiopharm **17**(1): 51-66.
- Dreno, B., J. M. Nguyen, et al. (2002). "Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma." Cancer Immunol Immunother **51**(10): 539-546.
- Dudziak, D., F. Nimmerjahn, et al. (2005). "Alternative splicing generates putative soluble CD83 proteins that inhibit T cell proliferation." J Immunol **174**(11): 6672-6676.
- Dumitriu, I. E., P. Baruah, et al. (2005). "Requirement of HMGB1 and RAGE for the maturation of human plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol **35**(7): 2184-2190.
- Dumitriu, I. E., M. E. Bianchi, et al. (2007). "The secretion of HMGB1 is required for the migration of maturing dendritic cells." J Leukoc Biol **81**(1): 84-91.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, et al. (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." Nat Immunol **3**(11): 991-998.
- Febbraio, M., D. P. Hajjar, et al. (2001). "CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism." J Clin Invest **108**(6): 785-791.
- Figdor, C. G., I. J. de Vries, et al. (2004). "Dendritic cell immunotherapy: mapping the way." Nat Med **10**(5): 475-480.
- Figdor, C. G., Y. van Kooyk, et al. (2002). "C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells." Nat Rev Immunol **2**(2): 77-84.
- Fraser, D. A., A. K. Laust, et al. (2009). "C1q differentially modulates phagocytosis and cytokine responses during ingestion of apoptotic cells by human monocytes, macrophages, and dendritic cells." J Immunol **183**(10): 6175-6185.
- Fujimoto, Y., L. Tu, et al. (2002). "CD83 expression influences CD4+ T cell development in the thymus." Cell **108**(6): 755-767.
- Gauvrit, A., S. Brandler, et al. (2008). "Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response." Cancer Res **68**(12): 4882-4892.
- Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, et al. (2000). "DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells." Cell **100**(5): 587-597.
- Giordano, D., D. M. Magaletti, et al. (2006). "Nitric oxide and cGMP protein kinase (cGK) regulate dendritic-cell migration toward the lymph-node-directing chemokine CCL19." Blood **107**(4): 1537-1545.
- Gregoriadis, G. (1999). "DNA vaccines: a role for liposomes." Curr Opin Mol Ther **1**(1): 39-42.

- Guillot, F., B. Boutin, et al. (2011). "Vaccination with epigenetically treated mesothelioma cells induces immunisation and blocks tumour growth." *Vaccine* **29**(33): 5534-5543.
- Hill, M., S. Tanguy-Royer, et al. (2007). "IDO expands human CD4+CD25high regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells." *Eur J Immunol* **37**(11): 3054-3062.
- Hsu, F. J., C. Benike, et al. (1996). "Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells." *Nat Med* **2**(1): 52-58.
- Hu, D. E., A. M. Moore, et al. (2004). "Uric acid promotes tumor immune rejection." *Cancer Res* **64**(15): 5059-5062.
- Huppa, J. B. and M. M. Davis (2003). "T-cell-antigen recognition and the immunological synapse." *Nat Rev Immunol* **3**(12): 973-983.
- Ichinohe, T. and A. Iwasaki (2009). "[Inflammasomes in viral infection]." *Uirusu* **59**(1): 13-21.
- Iero, M., R. Valenti, et al. (2008). "Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity." *Cell Death Differ* **15**(1): 80-88.
- Imai, T., M. Nagira, et al. (1999). "Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine." *Int Immunol* **11**(1): 81-88.
- Ip, W. K. and Y. L. Lau (2004). "Distinct maturation of, but not migration between, human monocyte-derived dendritic cells upon ingestion of apoptotic cells of early or late phases." *J Immunol* **173**(1): 189-196.
- Jeannin, P., S. Jaillon, et al. (2008). "Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells." *Curr Opin Immunol* **20**(5): 530-537.
- Jerome, V., A. Graser, et al. (2006). "Cytotoxic T lymphocytes responding to low dose TRP2 antigen are induced against B16 melanoma by liposome-encapsulated TRP2 peptide and CpG DNA adjuvant." *J Immunother* **29**(3): 294-305.
- Jin, G. H., T. Hirano, et al. (2008). "Combination treatment with IL-2 and anti-IL-2 mAbs reduces tumor metastasis via NK cell activation." *Int Immunol* **20**(6): 783-789.
- Jongmans, W., D. M. Tiemessen, et al. (2005). "Th1-polarizing capacity of clinical-grade dendritic cells is triggered by Ribomunyl but is compromised by PGE2: the importance of maturation cocktails." *J Immunother* **28**(5): 480-487.
- Jonuleit, H., U. Kuhn, et al. (1997). "Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions." *Eur J Immunol* **27**(12): 3135-3142.
- Kapsenberg, M. L. (2003). "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization." *Nat Rev Immunol* **3**(12): 984-993.
- Katz, S. I., K. Tamaki, et al. (1979). "Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow." *Nature* **282**(5736): 324-326.
- Kim, J. J., A. Tsai, et al. (1999). "Intracellular adhesion molecule-1 modulates beta-chemokines and directly costimulates T cells in vivo." *J Clin Invest* **103**(6): 869-877.
- Kohler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* **256**(5517): 495-497.
- Koido, S., E. Hara, et al. (2009). "Cancer vaccine by fusions of dendritic and cancer cells." *Clin Dev Immunol* **2009**: 657369.
- Kresowik, T. P. and T. S. Griffith (2009). "Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder." *Immunotherapy* **1**(2): 281-288.
- Kuchroo, V. K., M. P. Das, et al. (1995). "B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy." *Cell* **80**(5): 707-718.
- Labarriere, N., M. C. Pandolfino, et al. (2002). "Therapeutic efficacy of melanoma-reactive TIL injected in stage III melanoma patients." *Cancer Immunol Immunother* **51**(10): 532-538.
- Langenkamp, A., M. Messi, et al. (2000). "Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells." *Nat Immunol* **1**(4): 311-316.
- Lanzavecchia, A. (1998). "Immunology. Licence to kill." *Nature* **393**(6684): 413-414.
- Larange, A., D. Antonios, et al. (2009). "TLR7 and TLR8 agonists trigger different signaling pathways for human dendritic cell maturation." *J Leukoc Biol* **85**(4): 673-683.

- Larsson, M., J. F. Fonteneau, et al. (2001). "Dendritic cells resurrect antigens from dead cells." Trends Immunol **22**(3): 141-148.
- Leclercq, S., F. Gueugnon, et al. (2011). "5-aza-2'-deoxycytidine/valproate combination induces CTL response against mesothelioma." Eur Respir J.
- Legler, D. F., P. Krause, et al. (2006). "Prostaglandin E2 is generally required for human dendritic cell migration and exerts its effect via EP2 and EP4 receptors." J Immunol **176**(2): 966-973.
- Lesimple, T., E. M. Neidhard, et al. (2006). "Immunologic and clinical effects of injecting mature peptide-loaded dendritic cells by intralymphatic and intranodal routes in metastatic melanoma patients." Clin Cancer Res **12**(24): 7380-7388.
- Lonchay, C., P. van der Bruggen, et al. (2004). "Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma patients vaccinated with a MAGE antigen." Proc Natl Acad Sci U S A **101 Suppl 2**: 14631-14638.
- Luft, T., M. Jefford, et al. (2002). "Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets." Blood **100**(4): 1362-1372.
- Ma, D. Y. and E. A. Clark (2009). "The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells." Semin Immunol **21**(5): 265-272.
- Maier, T., A. Tun-Kyi, et al. (2003). "Vaccination of patients with cutaneous T-cell lymphoma using intranodal injection of autologous tumor-lysate-pulsed dendritic cells." Blood **102**(7): 2338-2344.
- Maio, M., E. Fonsatti, et al. (2002). "Vaccination of stage IV patients with allogeneic IL-4- or IL-2-gene-transduced melanoma cells generates functional antibodies against vaccinating and autologous melanoma cells." Cancer Immunol Immunother **51**(1): 9-14.
- Martin-Fontecha, A., S. Sebastiani, et al. (2003). "Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming." J Exp Med **198**(4): 615-621.
- Matzinger, P. (2002). "The danger model: a renewed sense of self." Science **296**(5566): 301-305.
- McColl, S. R. (2002). "Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance." Immunol Cell Biol **80**(5): 489-496.
- Messmer, D., H. Yang, et al. (2004). "High mobility group protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization." J Immunol **173**(1): 307-313.
- Moingeon, P. (2001). "Cancer vaccines." Vaccine **19**(11-12): 1305-1326.
- Nestle, F. O. (2000). "Dendritic cell vaccination for cancer therapy." Oncogene **19**(56): 6673-6679.
- Nestle, F. O., S. Alijagic, et al. (1998). "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells." Nat Med **4**(3): 328-332.
- Nestle, F. O., A. Farkas, et al. (2005). "Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer." Curr Opin Immunol **17**(2): 163-169.
- Olmos, S., S. Stukes, et al. (2010). "Ectopic activation of Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ T cells in lungs of CCR7<sup>-/-</sup> mice." J Immunol **184**(2): 895-901.
- Peng, J. R. and X. S. Leng (2008). "[NY-ESO-1 and cancer immunotherapy]." Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao **30**(4): 371-377.
- Qin, H., C. Zhou, et al. (2006). "Enhancement of antitumour immunity by a novel chemotactic antigen DNA vaccine encoding chemokines and multiepitopes of prostate-tumour-associated antigens." Immunology **117**(3): 419-430.
- Reichardt, V. L., C. Milazzo, et al. (2003). "Idiotype vaccination of multiple myeloma patients using monocyte-derived dendritic cells." Haematologica **88**(10): 1139-1149.
- Ridolfi, L., M. Petrini, et al. (2010). "Unexpected high response rate to traditional therapy after dendritic cell-based vaccine in advanced melanoma: update of clinical outcome and subgroup analysis." Clin Dev Immunol **2010**: 504979.
- Robbins, P. F., R. A. Morgan, et al. (2011). "Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1." J Clin Oncol **29**(7): 917-924.
- Rock, K. L., E. Latz, et al. (2010). "The sterile inflammatory response." Annu Rev Immunol **28**: 321-342.

- Rosenberg, S. A., M. T. Lotze, et al. (1987). "A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone." *N Engl J Med* **316**(15): 889-897.
- Rosenberg, S. A., J. R. Yannelli, et al. (1994). "Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2." *J Natl Cancer Inst* **86**(15): 1159-1166.
- Roulois, D., V. Vignard, et al. (2011). "Recognition of pleural mesothelioma by MUC1(950-958)/HLA-A\*0201 specific CD8+ T lymphocyte." *Eur Respir J*.
- Royer, P. J., S. Tanguy-Royer, et al. (2006). "Culture medium and protein supplementation in the generation and maturation of dendritic cells." *Scand J Immunol* **63**(6): 401-409.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." *J Exp Med* **179**(4): 1109-1118.
- Santini, S. M., C. Lapenta, et al. (2009). "IFN-alpha in the generation of dendritic cells for cancer immunotherapy." *Handb Exp Pharmacol*(188): 295-317.
- Schadendorf, D., S. Ugurel, et al. (2006). "Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG." *Ann Oncol* **17**(4): 563-570.
- Schott, M. (2006). "Immunesurveillance by dendritic cells: potential implication for immunotherapy of endocrine cancers." *Endocr Relat Cancer* **13**(3): 779-795.
- Schuler, G., B. Schuler-Thurner, et al. (2003). "The use of dendritic cells in cancer immunotherapy." *Curr Opin Immunol* **15**(2): 138-147.
- Scimone, M. L., V. P. Lutzky, et al. (2005). "Migration of polymorphonuclear leucocytes is influenced by dendritic cells." *Immunology* **114**(3): 375-385.
- Sharkey, R. M. and D. M. Goldenberg (2008). "Use of antibodies and immunoconjugates for the therapy of more accessible cancers." *Adv Drug Deliv Rev* **60**(12): 1407-1420.
- Sherry, R. M., S. A. Rosenberg, et al. (1991). "Relapse after response to interleukin-2-based immunotherapy: patterns of progression and response to retreatment." *J Immunother* (1991) **10**(5): 371-375.
- Simon, T., J. F. Fonteneau, et al. (2009). "Dendritic cell preparation for immunotherapeutic interventions." *Immunotherapy* **1**(2): 289-302.
- Small, E. J., P. F. Schellhammer, et al. (2006). "Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer." *J Clin Oncol* **24**(19): 3089-3094.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." *J Exp Med* **137**(5): 1142-1162.
- Summers deLuca, L., D. Ng, et al. (2011). "LTbetaR signaling in dendritic cells induces a type I IFN response that is required for optimal clonal expansion of CD8+ T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(5): 2046-2051.
- Tarte, K., G. Fiol, et al. (2000). "Extensive characterization of dendritic cells generated in serum-free conditions: regulation of soluble antigen uptake, apoptotic tumor cell phagocytosis, chemotaxis and T cell activation during maturation in vitro." *Leukemia* **14**(12): 2182-2192.
- Thurner, B., I. Haendle, et al. (1999). "Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma." *J Exp Med* **190**(11): 1669-1678.
- Thurner, B., C. Roder, et al. (1999). "Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application." *J Immunol Methods* **223**(1): 1-15.
- Trifilo, M. J., C. Montalto-Morrison, et al. (2004). "CXC chemokine ligand 10 controls viral infection in the central nervous system: evidence for a role in innate immune response through recruitment and activation of natural killer cells." *J Virol* **78**(2): 585-594.

- Tze, L. E., K. Horikawa, et al. (2011). "CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation." *J Exp Med* **208**(1): 149-165.
- Vabulas, R. M., P. Ahmad-Nejad, et al. (2001). "Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells." *J Biol Chem* **276**(33): 31332-31339.
- van der Bruggen, P., C. Traversari, et al. (1991). "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma." *Science* **254**(5038): 1643-1647.
- van Kooten, C. and J. Banchereau (2000). "CD40-CD40 ligand." *J Leukoc Biol* **67**(1): 2-17.
- Viaud, S., C. Thery, et al. (2010). "Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next?" *Cancer Res* **70**(4): 1281-1285.
- Vignard, V., B. Lemerrier, et al. (2005). "Adoptive transfer of tumor-reactive Melan-A-specific CTL clones in melanoma patients is followed by increased frequencies of additional Melan-A-specific T cells." *J Immunol* **175**(7): 4797-4805.
- Vogel, C. L., M. A. Cobleigh, et al. (2002). "Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer." *J Clin Oncol* **20**(3): 719-726.
- Watanabe, S., H. Kagamu, et al. (2003). "The duration of signaling through CD40 directs biological ability of dendritic cells to induce antitumor immunity." *J Immunol* **171**(11): 5828-5836.
- West, M. A., R. P. Wallin, et al. (2004). "Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling." *Science* **305**(5687): 1153-1157.
- Whittall, T., Y. Wang, et al. (2006). "Interaction between the CCR5 chemokine receptors and microbial HSP70." *Eur J Immunol* **36**(9): 2304-2314.
- Wright, S. D., R. A. Ramos, et al. (1990). "CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein." *Science* **249**(4975): 1431-1433.
- Yannelli, J. R. and J. M. Wroblewski (2004). "On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy." *Vaccine* **23**(1): 97-113.
- Yen, J. H., T. Khayrullina, et al. (2008). "PGE2-induced metalloproteinase-9 is essential for dendritic cell migration." *Blood* **111**(1): 260-270.
- Zhou, L. J. and T. F. Tedder (1995). "Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily." *J Immunol* **154**(8): 3821-3835.