



HAL
open science

Etude pré-clinique pour la mise au point d'une thérapie cellulaire antitumorale utilisant les cellules présentatrices d'antigènes dans les Lymphomes B non Hodgkiniens

Gabrielle Lui

► **To cite this version:**

Gabrielle Lui. Etude pré-clinique pour la mise au point d'une thérapie cellulaire antitumorale utilisant les cellules présentatrices d'antigènes dans les Lymphomes B non Hodgkiniens. Immunologie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT : . tel-00265604

HAL Id: tel-00265604

<https://theses.hal.science/tel-00265604>

Submitted on 19 Mar 2008

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.

Thèse

Présentée par Gabrielle LUI

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Joseph Fourier

Discipline : Biologie

Etude pré-clinique pour la mise au point d'une thérapie cellulaire antitumorale utilisant les cellules présentatrices d'antigènes dans les Lymphomes B non Hodgkiniens

Soutenue le 28 janvier 2005 devant le jury composé de :

Pr Jean-Claude Bensa

Pr. Jean-Pierre Farcet (rapporteur)

Pr. Patrice Marche

Dr. Francine Brière (rapporteur)

Dr. Joël Plumas (directeur de thèse)

Thèse préparée à l'Etablissement Français du Sang
Laboratoire Recherche et Développement
29, avenue Maquis du Grésivaudan
38701 La Tronche Cédex

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Joël Plumas, qui m'a accueillie dans son laboratoire pour faire un DEA, puis m'a dirigée pendant mes trois années de thèse. Merci pour ton suivi constant. Je voudrais remercier en même temps Laurence Chaperot qui m'a beaucoup aidée et encadrée dans mon travail. Je vous souhaite de fructueuses recherches sur votre nouvelle thématique.

Je voudrais également remercier le Professeur Jean-Jacques Sotto, qui m'a accueillie dans le Groupe de Recherche sur le Lymphome, à l'époque où il était encore directeur du groupe.

Je suis très honorée que le Docteur Brière, et le Professeur Farcet aient accepté d'être rapporteurs de ma thèse et de juger mon travail. Que le Professeur Marche soit également remercié d'avoir bien voulu participer à ce jury en tant qu'examineur. Je voudrais remercier chaleureusement le Professeur Bensa qui, non seulement m'a accueillie à l'Etablissement Français du Sang, mais a aussi accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie la Ligue contre le cancer, Comité de Haute-Savoie, qui m'a soutenue financièrement durant ces années de thèse.

Enfin je n'oublierai pas tous les autres membres du labo, qui m'ont aidée par leurs compétences ou leur présence et soutien quand tout allait de travers ;

Jean-Paul, merci pour ton aide précieuse, car je ne compte plus toutes les manip que tu as faites pour moi, tes blagues en tous genres, et je pense que à chaque fois que j'entendrai Léonardo et Kate, je penserai à toi !

La personne avec qui j'ai le plus travaillé est certainement Olivier. Nous avons passé quatre bonnes années à travailler ensemble malgré les orages et les tempêtes. Moi non plus je n'oublierai pas ces longues soirées devant le microscope à chercher les cellules ... bon alors elles sont vertes ou rouges ? ? ni les soirées-discussions dans le labo quand ça n'allait pas... dis à Tonton Olivier qu'est-ce qui ne va pas... merci pour ton aide précieuse, et aussi tes blagues avec Mongolito, les éthiopiens ou même Jésus.

Merci grande Ariannou pour ta tranquille présence qui est un bienfait pour nous tous, et pour ton aide pour l'ortographe. A chaque fote je penserai a toa. Qu'est-ce que je vai fair sens toa ? ?je vai écrire aveque dé phote de par tou !! au ce court.

Et Mariam, qui a fait un petit tour chez nous... merci pour ta gaieté et ta fidélité, et les soirées chez toi avec Olivier et Aurélie à manger des pizzas ou des glaces selon les saisons.

Enfin je voudrais remercier les personnes avec qui j'ai pu travailler ; Aurélie qui nous a apporté sa bonne humeur lorsqu'elle a squatté parmi nous, Juliette, qui a commencé sa thèse, tous les membres du labo d'immunocyto, Ghislaine, Christine, Patricia, Richard, Michel et leur grand chef Marie-Christine, et à l'IAB Patricia et Leila, qui nous ont permis de faire des photos.

Je remercie tous mes amis qui m'ont soutenue parfois de très loin. En espérant que personne ne sera vexé, je voudrais remercier en particulier une amie, Alex, qui d'Australie a toujours su me dire les mots pour m'encourager.

Résumé

Dans la perspective du développement d'une immunothérapie antitumorale dans les lymphomes B, nous avons validé l'obtention et la manipulation de cellules tumorales et défini quelles étaient les cellules présentatrices d'antigènes (APC) les plus efficaces. Nous avons mis au point des techniques d'obtention de cellules entières opsonisées, nécrotiques, et apoptotiques compatibles avec une application clinique (résultats de l'article 1). Utilisant ces différentes préparations cellulaires pour charger les APC, nous avons ensuite comparé la cross-présentation d'antigènes contenus dans les cellules tumorales entières par les macrophages (MΦ) et les cellules dendritiques myéloïdes (MDC). A l'opposé des MΦ, les MDC sont capables de cross-présenter efficacement des antigènes provenant des cellules tumorales entières intactes, opsonisées, ou apoptotiques, mais pas des cellules nécrotiques (résultats de l'article 2). Nous avons enfin voulu évaluer les capacités de capture et de cross-présentation d'antigènes des cellules dendritiques plasmacytoïdes (PDC) grâce à une lignée PDC générée dans le laboratoire (résultats de l'article 3). Nous avons montré que les PDC présentaient de faibles capacités d'endocytose et que, contrairement aux DC myéloïdes, elles n'étaient pas capables d'endocyter du matériel de cellules vivantes traitées ou non. En revanche, quand les cellules tumorales ou cibles étaient infectées, nous avons observé que les PDC pouvaient endocyter du matériel cellulaire, s'activer et cross-présenter les antigènes viraux à des lymphocytes T CD8+. Ce travail permet de définir les conditions d'utilisation de cellules tumorales et des cellules présentatrices d'antigènes dans les lymphomes B pour une application potentielle en clinique. D'autre part, il apporte des informations tout à fait novatrices sur le rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans l'immunité adaptative.

Table des matières générale

Introduction	1
1^{ère} partie : Développement d'une réponse immune	3
A. Les cellules dendritiques et les macrophages	3
1 Origine et différenciation des mΦ et des DC	3
2 Répartition des DC et des MΦ in vivo	5
Les macrophages.....	5
Les DC myéloïdes.....	6
Les cellules dendritiques plasmacytoïdes	6
3 Migration des mΦ et DC.....	7
Sans inflammation.....	7
Lors d'une réaction inflammatoire.....	8
4 Reconnaissance des pathogènes et capture d'Ag	9
Les différents récepteurs	9
Les différentes voies d'endocytose	14
Différentes capacités des APC pour la capture de l'Ag	15
5 Activation des APC	15
Maturation des MDC	15
Maturation des PDC.....	16
Activation des mΦ	16
Dégradation des Ag.....	17
6 Présentation des Ag	17
Apprêtement des Ag associés aux molécules de classe II du CMH.....	17
Apprêtement des Ag associés aux molécules de classe I du CMH	18
La cross-présentation	19
Présentation par les molécules CD1	20
B. Activation d'une réponse immune adaptative	21
1 Les trois signaux pour l'activation des lymphocytes T	21
Signal 1 : Interaction du TCR avec le complexe CMH/peptide	21
Signal 2 : interaction entre les molécules de costimulation	22
Signal 3	24
2 Réponses Th1 et Th2	24
3 Les lymphocytes T régulateurs (Treg)	25
2^{ème} partie : Surveillance antitumorale	27
A. Existence d'une surveillance antitumorale	27
1 « Tumor shaping » ou sélection des cellules tumorales par pression du système immunitaire	27

2 Surveillance par le système inné _____	29
Les cellules NK.....	29
Rôle de l'IFN γ et les cellules sécrétrices d'IFN γ	31
3 Surveillance par le système adaptatif _____	32
Existence de lymphocytes T et B antitumoraux.....	32

B. Mécanismes de destruction des cellules tumorales.....35

1 Adhérence et reconnaissance _____	35
2 Les récepteurs de mort _____	35
3 Perforine/granzyme _____	35

C. L'échappement36

1 Défaut de présentation des Ag _____	36
Délétion HLA.....	36
Perte des molécules TAP	36
Autres défauts	37
2 Immuno-supression _____	37
Molécules materno-feotales	37
Facteurs solubles.....	38
3 Résistance à la lyse _____	40
Adhérence	40
Résistance à l'apoptose	40

3^{ème} partie : L'immunothérapie dans le LNHB.....42

A Les lymphomes42

1 Les différents types de lymphomes B _____	42
2 Un paradoxe _____	43

B. Mécanismes d'échappement dans les LNHB44

1 L'adhérence _____	44
2 Résistance à la mort cellulaire _____	44
3 Les cytokines _____	45

C. Immunostratégies utilisées dans le lymphome.....45

1 Rituximab _____	45
2 Vaccination avec l'Idiotype _____	46

D. Utilisation de DC en immunothérapie46

1 Utilisation de peptides _____	47
Les différents types de peptides	48
Les problèmes liés à l'utilisation de peptides.....	48
2 Utilisation de cellules entières _____	48
Différences entre cellules apoptotiques et cellules nécrotiques	49
Les lysats.....	51
Les cellules opsonisées par les Ac	52

3 Activation et présentation par les APC	52
La cross-présentation d'Ag provenant de cellules entières	55
Nécessité d'activer les APC	55
Quels adjuvants utiliser ?	56
4 Quelques données de l'immunothérapie	58
Quelques données dans le mélanome	60
Dans les lymphomes et myélomes	60
Objectifs du travail.....	63
Article 1 : Purification de cellules B pour charger les cellules présentatrices d'antigènes.	64
Résultats complémentaires et discussion	66
Identification des cellules contaminantes.....	66
Préparation des cellules B et Paramètres de phagocytose.....	66
Les caractéristiques de l'apoptose induite	66
Cinétique d'induction d'apoptose	66
Implication des caspases	67
Les paramètres de l'opsonisation	68
Les paramètres de la phagocytose	69
Récepteurs impliqués et influence du sérum.....	69
Conclusion	71
Article 2 : Les cellules entières permettent la cross-présentation d'Ag associés aux tumeurs..	72
Résultats complémentaires et discussion	74
Les paramètres de la phagocytose	74
Stabilité du marquage PKH26.....	74
Les différentes voies d'endocytose	74
Effets de la capture des cellules B sur le phénotype des DC et macrophages.....	75
Activation des macrophages	76
Activation des cellules dendritiques	78
La cross-présentation.....	79
Conclusion	81
Article 3: Les cellules dendritiques plasmacytoïdes cross-présentent des Ag viraux issus de cellules infectées	82
Résultats complémentaires et discussion	84
Effet de l'IL-3 et du virus de l'influenza sur phénotype de la lignée PDC	84
Effet de l'IL-3 et du virus sur les capacités d'endocytose	85

Effet du virus de l'influenza sur la capacité de capture de cellules entières.....	86
La cross-présentation d'Ag viraux par les GEN3	87
Sécrétion d'IFNα après endocytose de matériel de cellules infectées	88
Conclusion	88
<i>Perspectives et conclusion</i>	90
Perspectives	90
Utilisation de DC myéloïdes dans les LNHB.....	90
Utilisation des PDC en thérapie ?	92
Conclusion	93

Table des figures et tableaux

Figure 1: Origine des différentes APC	4
Figure 2 : Molécules intervenant dans la reconnaissance des pathogènes.....	10
Figure 3 :Les différentes voies d'endocytose.....	15
Figure 4 : Apprêtement des Ag sur les molécules du CMH de classe I et II.....	18
Figure 5 : Mécanisme de la cross-présentation.....	20
Figure 6 : Immunoediting	28
Figure 7 : Mode de régulation de l'activation des NK.....	29
Figure 8 : Molécules impliquées dans la reconnaissance des cellules apoptotiques.....	51
Figure 9 : Modulation de la réponse immune par les molécules libérées par les cellules endommagées.....	53
Figure R1: Phénotype des cellules avant séparation (A) et après séparation (B).....	66
Figure R2 : Evolution des différentes populations cellulaires lors de l'apoptose.....	67
Figure R3 : Clivage des caspases 9 et 3 dans les différentes préparations cellulaires.....	68
Figure R4 : Stabilité de l'opsonisation.....	69
Figure R5 : Phagocytose par le macrophage dans des sérums différents.....	70
Figure R6: Inhibition de la phagocytose des cellules opsonisées.....	71
Figure R7 : Stabilité du marquage au PKH 26 après traitement.....	74
Figure R8: Effet des différentes préparations cellulaires sur les macrophages.....	77
Figure R9 : Phénotypage des DC après incubation avec les cellules B.....	78
Figure R10: Les macrophages dégradent les cellules phagocytées.....	80
Figure R11 : Effet de l'IL-3 et du virus sur le phénotype des cellules de la lignée GEN3.....	84
Figure R12 : Effet du virus et de l'IL-3 sur la capacité d'endocytose des cellules de la lignée GEN3.....	85
Figure R13 : Effets de l'activation des PDC sur leur capacité d'endocytose.....	86
Figure R14 : Sécrétion d'IFN α après contact avec des lymphocytes B infectés.....	88
Figure 10 : Multiples points d'intervention pour l'amélioration de l'immunothérapie antitumorale.....	92
Tableau 1 : les lectines de type C.....	12
Tableau 2 : Expression des molécules CD1.....	21
Tableau 3: Expression des molécules de costimulation sur les DC et les M Φ	23
Tableau 4 : Diversité des TAA.....	33
Tableau 5 : Caractéristiques des différents types de lymphomes.....	43
Tableau 6: Les différents types de cancers traités par immunothérapie utilisant les DC.....	59
Tableau 7: Modes de chargement des DC.....	59

Abréviations

Ag : antigène
An: annexine V
APC : cellule présentatrice d'antigènes
CFSE : carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester
CMH: complexe majeur d'histocompatibilité
CTL : lymphocytes T cytotoxique
DC im : DC immature
DC : cellule dendritique
Dex: dextran
ELISA: enzyme linked immunosorbent assay
GM-CSF : granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor
HEV: veinule à haut endothélium
HLA: Human leucocyte antigen
HMBG: High Mobility Group 1 Box 1 protein
HSP: heat shock protein
IFN : interféron
Ig: immunoglobuline
IL : interleukine
IP: iodure de propidium
IPC: cellule productrice d'IFN α
ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motifs
ITIM: immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs
LC : cellule de Langerhans
LNHB : lymphomes B non Hodgkiniens
LY: lucifer yellow
M Φ : macrophage
M-CSF : macrophage-colony-stimulating factor
MDC : DC myéloïde
MFI: moyenne de fluorescence
moDC : DC générées à partir de monocytes
MR : récepteur au mannose
NK : Natural killer
PAMPs: pathogen associated molecular patterns
PDC : DC plasmacytoïde
PRR: Pattern recognition receptor
PS: phosphatidyl-sérine
SEREX: serological expression cloning of human tumor antigens
SH: sérum humain
SR : récepteur scavenger
STAT: signal transducer and activation of transcription
SVF: sérum de veau fœtal
TAA : antigène associé aux tumeurs
TCR: T cell receptor
TGF : transforming growth factor
Th: T helper
TLR : Toll Like Receptor
TNF : tumor necrosis factor
Treg : lymphocyte T régulateur

Introduction

Les travaux présentés dans ce manuscrit se sont intéressés à l'immunothérapie des lymphomes B non Hodgkiniens (LNHB). Ils ont été obtenus dans le laboratoire de Recherche et de Développement de l'Établissement Français du Sang de Grenoble, en collaboration avec le Département d'Hématologie Clinique du CHU, et le Groupe de Recherche sur les Lymphomes. Les LNHB sont des tumeurs hétérogènes, qui se divisent en nombreux sous-types selon leurs particularités histologiques et phénotypiques dans la classification REAL (Harris et al., 1994; Pileri et al., 2000a; Pileri et al., 2000b), et plus récente, celles de l'OMS. Les formes les plus agressives, dont la prolifération cellulaire est rapide, sont les plus sensibles aux chimiothérapies et radiothérapies ; ce sont les lymphomes dits de « haut grade de malignité ». Pour les lymphomes de vitesse d'invasion plus lente dits « indolents », ou de « bas grade de malignité », les traitements classiques sont insuffisants. Lorsque les cellules tumorales ne sont pas totalement éliminées par la chimiothérapie ou la radiothérapie, les patients rechutent, et développent souvent des résistances aux traitements classiques. Il est donc nécessaire de proposer de nouvelles stratégies de traitement pour améliorer la survie de ces patients.

Parmi les nouvelles stratégies, l'immunothérapie apparaît intéressante. En effet, elle pourrait permettre de cibler spécifiquement les cellules tumorales, en utilisant pour effecteur le système immunitaire. Le système immunitaire permet, en effet, de détecter les événements anormaux telle l'entrée de corps étrangers (vus comme « non-soi ») et également des modifications du « soi », comme le développement de cellules tumorales. Dans l'immunothérapie antitumorale c'est la réponse cellulaire (la cytotoxicité des lymphocytes T CD8+) qu'on cherche à développer, afin de détruire la tumeur. Pour activer cette réponse, il est possible d'utiliser des cellules présentatrices d'antigènes, qui interviennent dans l'initiation des réponses adaptatives. Elles ont en effet la capacité :

- 1)- de détecter les pathogènes et de sécréter des chimiokines qui attireront les autres cellules du système immunitaire ou des cytokines qui favoriseront leur prolifération et leur différenciation
- 2)- de capturer des antigènes pour les présenter aux lymphocytes T afin de les activer. Les cellules présentatrices d'antigènes jouent donc un rôle crucial de lien entre la réponse innée et la

réponse spécifique où ce sont les lymphocytes qui entrent en jeu. Parmi les APC, les cellules dendritiques sont considérées comme étant les seules capables d'initier la réponse de lymphocytes T naïfs.

Du fait de ces propriétés, les cellules présentatrices d'antigènes, les cellules dendritiques en particulier, sont actuellement utilisées en immunothérapie antitumorale. Elles sont particulièrement intéressantes pour initier une réponse immune qui une fois établie pourrait permettre de détruire les métastases ou les cancers non-solides qui sont disséminés à travers l'organisme. Il existe cependant plusieurs familles d'APC : macrophages, cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes, qui ont des propriétés de capture d'antigènes et d'activation des lymphocytes T différentes. Les données de la littérature ne permettent pas de savoir quelle est la meilleure APC à utiliser pour générer une réponse antitumorale efficace. La manière de générer ces APC in vitro, ainsi que les conditions optimales de leur utilisation sont loin d'être clairement établies. Nous avons donc mené un programme de recherche préclinique visant à définir les bases d'un protocole d'immunothérapie dans les lymphomes en utilisant comme APC des macrophages et des cellules dendritiques myéloïdes. Nous avons aussi analysé les capacités de capture et de présentation d'antigènes des cellules dendritiques plasmacytoïdes à l'aide d'une lignée qui a été développée au laboratoire.

L'introduction bibliographique de ce mémoire comprendra trois parties. Tout d'abord les principaux acteurs de l'immunologie auxquels nous nous sommes intéressés seront présentés. Nous présenterons ensuite les bases de l'immunologie antitumorale, puis nous ferons le point sur les développements d'immunothérapies des cancers en cours.

1^{ère} partie : Développement d'une réponse immune

Le système immunitaire peut être schématiquement divisé en deux grandes parties : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Au cours des travaux que nous présenterons, nous nous sommes intéressés, aux frontières de l'immunité innée et adaptative, à la possibilité de générer une réponse T cytotoxique antitumorale dans les LNHB, en utilisant des cellules présentatrices d'antigènes (APC). Les APC ont la capacité de capturer des antigènes exogènes, de les apprêter, puis de les présenter aux lymphocytes T pour permettre leur activation et leur différenciation. Les macrophages ($m\Phi$), les cellules dendritiques myéloïdes (MDC) et plasmacytoïdes (PDC) sont des APC capables d'activer une réponse T. La plupart des données que nous présenterons dans cette introduction sont issues de travaux chez l'homme, nous préciserons lorsque des travaux chez la souris seront utilisés.

A. Les cellules dendritiques et les macrophages

Les $m\Phi$ et les DC sont des cellules d'origine hématopoïétique ayant pour origine les cellules souches CD34+ de la moelle osseuse. La fonction principale attribuée aux $m\Phi$ est l'élimination des pathogènes et des cellules mortes. Ils sont souvent appelés les éboueurs de l'organisme. Les DC myéloïdes, qui sont aussi capables d'internaliser des antigènes, sont plutôt connues pour leurs fonctions de présentation d'antigènes aux lymphocytes T, et plus particulièrement aux lymphocytes T naïfs. Elles sont pour cela qualifiées de sentinelles. Les DC plasmacytoïdes (PDC, aussi appelées DC lymphoïdes, IPC (Interferon producing cells) ou DC2) n'ont été décrites que plus récemment, et leur place dans l'initiation des réponses immunes est encore en cours d'évaluation. On pense que les PDC joueraient un rôle majeur dans l'activation des réponses antivirales.

1 Origine et différenciation des $m\Phi$ et des DC

Les précurseurs des $m\Phi$ sont les monocytes qui circulent dans l'organisme via le sang,

entrent dans les tissus, et sous l'influence du micro-environnement, se différencient en macrophages. De plus, les cytokines sécrétées, telle l'IL-6, favoriseraient leur différenciation (Chomarat et al., 2000). Les macrophages peuvent aussi être générés in vitro à partir de monocytes en présence de GM-CSF en 6 jours ou à partir de cellules du sang CD14⁻, CD11c⁺, CD1a⁺ en présence de M-CSF (Banchereau et al., 2000). Les mΦ résidents restent à un stade inactivé dans les tissus. Puis sous l'influence de différents stimuli, ils sont activés, sécrètent des cytokines, puis entrent en apoptose (Bogdan, 2001).

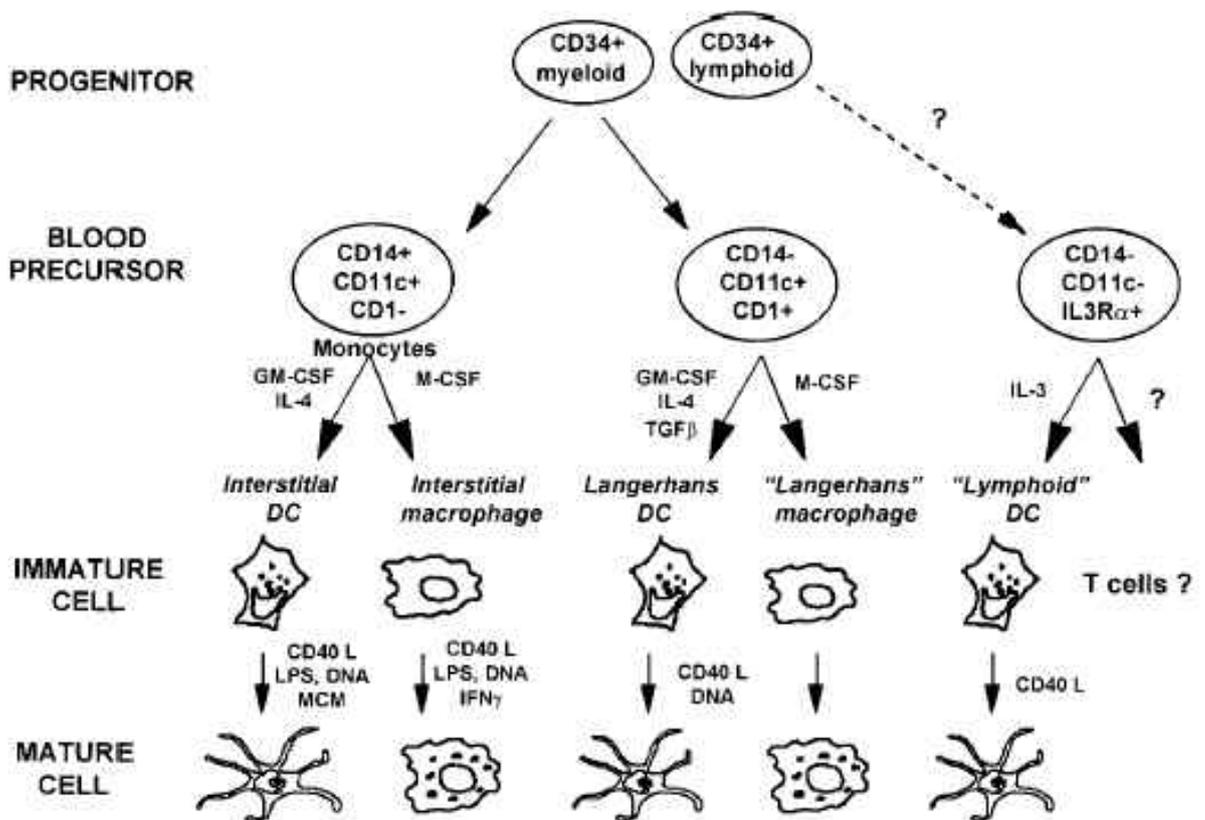


Figure 1: Origine des différentes APC

De (Banchereau et al., 2000). Le sang contient les trois précurseurs qui donnent les différentes APC, mΦ, MDC, et PDC.

Dans le sang, on retrouve trois types de cellules capables de se différencier en DC myéloïdes (MDC). Le monocyte représente un précurseur possible pour les MDC, comme le montre la figure 1, mais les progéniteurs myéloïdes donnent aussi deux autres précurseurs circulants des MDC (préDC) (Ito et al., 1999). Ces deux précurseurs ont le phénotype suivant : lin (CD3, CD19, CD14, CD56)⁻, CD11c⁺, CD4⁺, HLA DR⁺, et sont soit CD1a⁻, soit CD1a⁺. Ces préDC vont pouvoir entrer dans les tissus périphériques, et se différencier en DC interstitielles ou en cellules de Langerhans, respectivement. Les facteurs influençant cette différenciation des précurseurs circulants sont encore mal connus. Le TNF-α favoriserait la différenciation du monocyte vers la

MDC en présence de fibroblastes (Chomarat et al., 2003). Une autre étude a montré que les monocytes qui, après phagocytose de particules, retraversent l'endothélium, se différencient en MDC tandis que ceux qui restent dans la matrice sub-endothéliale deviennent des macrophages (Randolph et al., 1998). Les cellules de Langerhans peuvent être générées à partir des préDC CD1a+, CD11c+ (Ito et al., 1999) sous l'influence d'IL-4, GM-CSF et TGF- β , et expriment rapidement la langerine (Valladeau et al., 2000) et les granules de Birbeck caractéristiques de ce type cellulaire. D'autre part, il est possible de générer *in vitro* des DC à partir de monocytes du sang en présence de IL-4 et de GM-CSF pendant 6 jours (Sallusto and Lanzavecchia, 1994) (elles seront notées moDC). Ce sont des DC qui ressemblent aux DC interstitielles.

L'origine des cellules dendritiques plasmacytoïdes est moins bien connue. Un précurseur de ces cellules est retrouvé au niveau sanguin, de phénotype lin-, CD11c-, CD1a- CD4+, HLA DR+, CD123+, BDCA2+, BDCA4+ (Dzionek et al., 2000). Ces PDC n'expriment pas de marqueurs myéloïdes (Ito et al., 1999; Robinson et al., 1999), laissant penser que ces cellules sont d'une lignée lymphoïde. D'autres études sont venues appuyer cette hypothèse. En effet, les PDC expriment également des transcrits codant pour la chaîne pré T α , λ -like, V pré-B (Rissoan et al., 2002), caractéristiques des lymphocytes B et T. Elles expriment aussi le facteur de transcription Spi-B, qui serait impliqué dans le contrôle de leur différenciation (Schotte et al., 2003). D'autres travaux de Spits et al portant sur le rôle de Id2 et Id3 dans la différenciation des PDC, et des lymphocytes T et B sont aussi en faveur d'une origine lymphoïde des PDC (Spits et al., 2000). *In vitro*, des PDC peuvent être générées à partir de progéniteurs hématopoïétiques CD34+ (Blom et al., 2000), en partie sous l'action de la thrombopoïétine et du Flt3-L (Chen et al., 2004a). L'appartenance des PDC à la lignée lymphoïde reste cependant encore débattue, puisqu'il serait possible de reconstituer les deux populations de DC (PDC et MDC) à partir des mêmes cellules précurseurs, déjà engagées dans la voie de différenciation myéloïde (Shigematsu et al., 2004).

2 Répartition des DC et des M Φ *in vivo*

Les macrophages

Les m Φ tissulaires sont phénotypiquement hétérogènes et ont une appellation spécifique dans quelques sites précis : ostéoclastes dans le tissu osseux, microglies dans le système nerveux, cellules mésengiales dans la vessie, cellules de Kupffer dans le foie, histiocytes dans les tissus conjonctifs. Ils sont également présents dans le cœur, l'épiderme et le derme, la cavité péritonéale, les poumons, le pancréas. Ces m Φ ne se divisent pas, et leur durée de vie, qui dépend du tissu, n'est pas bien définie (Gordon, 1999). Dans les différents organes, y compris

dans le système nerveux, ils ont comme rôle d'éliminer les cellules apoptotiques (Witting et al., 2000). Grâce à leur capacité phagocytaire, ils empêchent les invasions bactériennes par exemple de Streptococci (Goldmann et al., 2004). Ils ont aussi la capacité de sécréter des molécules toxiques (comme les RNIs (Reactive Nitrogen Intermediates)), actives sur les bactéries, les champignons et certains parasites (Bogdan, 2001). Sous l'effet de différents stimuli, les m Φ peuvent sécréter des cytokines qui amorcent une réponse immune.

Les macrophages sont aussi présents dans les organes lymphoïdes en grande quantité. Dans le cortex et la médula du thymus, ils éliminent les thymocytes apoptotiques. Dans la rate, grâce à leurs nombreux récepteurs pour les composants des membranes bactériennes et les lipides, les macrophages contribuent à la résistance anti-microbienne, et à l'élimination des produits de dégradation. Dans les ganglions, les macrophages sont localisés au niveau du sinus sub-capsulaire et de la médulla. Ils y éliminent les cellules apoptotiques et présentent les Ag aux lymphocytes. Ils sont également présents dans les plaques de Peyer. Il est possible que les macrophages tissulaires migrent vers les organes lymphoïdes secondaires (Gordon, 1999).

Les DC myéloïdes

Au niveau sanguin, on distingue donc les monocytes, et les précurseurs des MDC lin-CD11c+. Ces cellules vont pouvoir migrer dans les tissus sains et inflammés.

Les cellules de Langerhans sont localisées dans l'épiderme cutané et les muqueuses (de Fraissinette et al., 1989; Maurer, 1999). Ce sont les seules DC qui expriment in vivo CD1a, les granules de Birbeck et la Langérine (Fithian et al., 1981; Valladeau et al., 2000). Les DC interstitielles sont CD1a-. et sont retrouvées dans de nombreux tissus : dans l'épithélium pulmonaire (McWilliam et al., 1999), au niveau du tractus intestinal (MacPherson and Liu, 1999) du cœur, du foie, du pancréas ou de la vessie (Stephoe and Thomson, 1999) et dans le derme (Maurer, 1999). Ces MDC immatures ont une bonne capacité endocytaire, ce qui leur permet de capturer les antigènes présents en périphérie (Banchereau et al., 2000).

Les MDC sont également présentes au niveau des organes lymphoïdes secondaires comme primaires. Elles joueraient un rôle important dans la sélection des lymphocytes dans le thymus. Une fois activées, les MDC périphériques migrent dans les organes lymphoïdes secondaires, et entrent dans les ganglions par les vaisseaux lymphatiques afférents. On les retrouve dans les zones T, où elles vont présenter aux lymphocytes T les antigènes qu'elles ont capturés. Ces MDC sont alors appelées cellules interdigitées. Les LC peuvent également migrer au niveau des ganglions lors d'une inflammation chronique de la peau (Geissmann et al., 2002).

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les PDC représentent 0.2 à 0.5% des cellules mononuclées du sang périphérique (Olweus et al., 1997). Elles ont été également retrouvées dans le sang de cordon (Sorg et al., 1999). En situation normale, elles n'ont pas été retrouvées dans les tissus périphériques, mais elles peuvent se localiser au niveau de la peau lors d'une injection de lipoprotéines de *Treponema pallidum* (Sellati et al., 2001), ou dans le lupus (Blomberg et al., 2001; Farkas et al., 2001). Elles peuvent aussi se localiser dans les muqueuses nasales lors d'une allergie (Jahnsen et al., 2000).

Les PDC sont aussi retrouvées dans les organes lymphoïdes. La présence de PDC a été détectée dans les parties extrafolliculaires des amygdales (Grouard et al., 1997), des ganglions (Cella et al., 1999), et des plaques de Peyer (Jameson et al., 2002). Leur localisation au niveau et à proximité du HEV, et leur expression de CD62L suggèrent qu'elles entrent dans les ganglions via la circulation sanguine. Dans ces organes lymphoïdes secondaires, elles pourraient avoir pour fonction d'activer les lymphocytes T, mais cela reste à démontrer. Les PDC sont aussi présentes dans le thymus (Bendriss-Vermare et al., 2001).

3 Migration des mΦ et DC

Les migrations des cellules de l'immunité sont gouvernées par l'expression de chimiokines dans les tissus, et de récepteurs qui leur correspondent sur les cellules. Par exemple, les chimiokines, comme SLC/CCL21, ELC/CCL19, SDF-1/CXCL12, ou BCA-1/CXCL13, exprimées constitutivement dans les organes lymphoïdes par les cellules endothéliales et stromales, permettent une migration des cellules de l'immunité exprimant les récepteurs correspondant en absence d'inflammation (Allavena et al., 2000). Ainsi les lymphocytes T naïfs et mémoires centraux qui expriment CCR7 peuvent migrer continuellement depuis le sang vers les ganglions au niveau des HEV, grâce à l'expression de SLC/CCL21 (von Andrian and Mempel, 2003). Dans le ganglion, SLC/CCL21 permet une localisation des lymphocytes T dans les zones T et les zones marginales des follicules (Willmann et al., 1998). Sans signal d'activation, les lymphocytes quittent les ganglions par les vaisseaux efférents (von Andrian and Mempel, 2003). Dans une situation inflammatoire, les DC activées vont sécréter DC-CK-1/CCL18, capable d'attirer préférentiellement les lymphocytes T naïfs, favorisant ainsi la rencontre entre DC et lymphocytes T. DC-CK-1/CCL18 est fortement exprimée dans la zone T des ganglions (Adema et al., 1997). Si ce schéma de circulation est bien connu pour le trafic des lymphocytes, il n'en est pas de même en ce qui concerne la migration des APC, que nous allons présenter maintenant, dans un contexte normal ou inflammatoire.

Sans inflammation

Les mécanismes de recrutement des monocytes dans les tissus en dehors de toute inflammation ne sont pas très bien connus. Les monocytes expriment le CXCR4 et peuvent migrer en réponse à SDF-1/CXCL12 (Ancuta et al., 2003), ce qui pourrait faciliter leur migration dans le derme. Une fois dans les tissus les monocytes se transformeraient en DC ou en m Φ résidents.

Les précurseurs des MDC qui patrouillent dans le sang expriment CCR2, CCR5, CXCR3 et CXCR4 (de la Rosa et al., 2003; Penna et al., 2001) et pourraient entrer constitutivement dans les tissus grâce à CXCR4, dont un des ligands est SDF-1/CXCL12, présent dans le derme et les ganglions. On ne retrouve pas de préMDC exprimant CCR6 dans le sang, les précurseurs des LC pourraient acquérir ce récepteur après avoir traversé l'endothélium, ce qui leur permettrait alors de migrer au niveau de l'épiderme, attirés par MIP-3 α /CCL20 (Banchereau et al., 2000). L'acquisition séquentielle de la capacité de migrer en réponse aux ligands de CCR2 puis de CCR6 a bien été démontrée à l'aide de LC obtenues en culture à partir de progéniteurs CD34+ (Vanbervliet et al., 2002).

Les PDC expriment CCR2, CCR5, CCR7, CXCR3, et CXCR4, mais ne sont capables de migrer qu'en présence de SDF-1/CXCL12 (ligand de CXCR4), les autres récepteurs n'étant pas fonctionnels (Penna et al., 2001; Vanbervliet et al., 2003). Associée à l'expression de CD62L, cette capacité de migrer en réponse à SDF-1/CXCL12 pourrait permettre un recrutement des PDC, via les HEV, dans les ganglions directement à partir du sang (Grouard et al., 1997).

Lors d'une réaction inflammatoire

En présence d'agents pathogènes, des chimiokines inflammatoires sont rapidement sécrétées par les tissus et les APC résidentes : IL-8/CXCL8, MIP-1 β /CCL4, MCP-1/CCL2, RANTES (Regulated upon activation and normal T Cell expressed)/CCL5 (Sallusto and Lanzavecchia, 2000). Les m Φ activés par des bactéries peuvent sécréter MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, RANTES/CCL5 et MCP-3/CCL7, IL-8/CXCL8, Mig/CXCL9 et IP-10/CXCL10 (Veckman et al., 2003), tandis que les MDC activées produisent MDC/CCL22, TARC/CCL17, MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3 et MIP-1 β /CCL4, MIP-3 β /CCL19, RANTES/CCL5, IL-8/CXCL8 et Fractalkine/CX₃CL1 (Allavena et al., 2000). Ces chimiokines permettent d'attirer sur le site de l'inflammation d'autres cellules de l'immunité : APC, polynucléaires, et lymphocytes. Les PDC infectées peuvent également sécréter des cytokines comme MIP-1 β /CCL4, MIP-1 α /CCL3, MCP-1/CCL2, et IP-10/CXCL10 (Megjugorac et al., 2004).

Les monocytes sont recrutés en nombre sous l'action de CCL2 (Hogg and Carley, 2002) (Maus et al., 2003) (Weber et al., 1999), ils traversent alors les vaisseaux et peuvent alors se

différencier soit en macrophages soit en DC selon des facteurs environnementaux encore mal connus.

Les préMDC migrent en réponse à MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, MCP-3/CCL7, MCP-4/CCL13, TECK/CCL25, SDF-1/CXCL12, MIP-3 α /CCL20, RANTES/CCL5, MCP-1/CCL2, (Dieu-Nosjean et al., 1999; Penna et al., 2001). Ces DC, dans un contexte de danger (présence de pathogènes, d'IL-1 ou de TNF- α) mûrissent, acquièrent CCR7 (Dieu et al., 1998; Penna et al., 2001; Sallusto et al., 1998), et gardent CXCR4 et CCR4 (Allavena et al., 2000). Parallèlement, les DC matures perdent CCR1 et CCR5 (Sozzani et al., 1998) et la capacité de répondre à certaines chimiokines comme RANTES/CCL5) et IP-10/CXCL10 (Penna et al., 2001). Pour les cellules de Langerhans, la perte de CCR6 entraîne une perte de la réponse à MIP-3 α /CCL20. Les MDC matures peuvent alors migrer via la lymphe vers les zones T des ganglions, où est exprimé MIP-3 β /CCL19, ligand de CCR7 (Dieu et al., 1998; Willimann et al., 1998).

Les PDC du sang semblent avoir moins de capacité de migration que les MDC (de la Rosa et al., 2003; Penna et al., 2001). In vitro, les PDC immatures acquièrent la capacité de migrer en réponse à Mig/CXCL9, IP-10/CXCL10, et I-TAC/CXCL11 (ligands de CXCR3) seulement en présence de SDF-1/CXCL12. Cette étude suggère donc qu'un recrutement des PDC est possible dans les sites périphériques ou dans les ganglions au cours de l'inflammation (Krug et al., 2002; Vanbervliet et al., 2003). Au cours de leur maturation, les PDC, comme les MDC, vont exprimer CCR7 (Gibson et al., 2002; Krug et al., 2001), ce qui leur confère alors la capacité de migrer en réponse à MIP-3 β /CCL19, et pourrait leur permettre de rejoindre les organes lymphoïdes secondaires (Penna et al., 2001).

4 Reconnaissance des pathogènes et capture d'Ag

Les différents récepteurs

Les pathogènes peuvent être reconnus par différents récepteurs exprimés par les APC. Les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) présents à la surface des microorganismes peuvent être reconnus par les PRR (Pattern Recognition Receptor). Des molécules opsonisantes (comme les Ig ou le complément) peuvent les recouvrir et ce sont alors d'autres récepteurs qui interviennent. Certains de ces récepteurs sont spécialisés dans l'endocytose : les récepteurs «scavenger» (SR), les lectines, les récepteurs aux Fc des Ig, tandis que d'autres, comme les TLR, activent les APC.

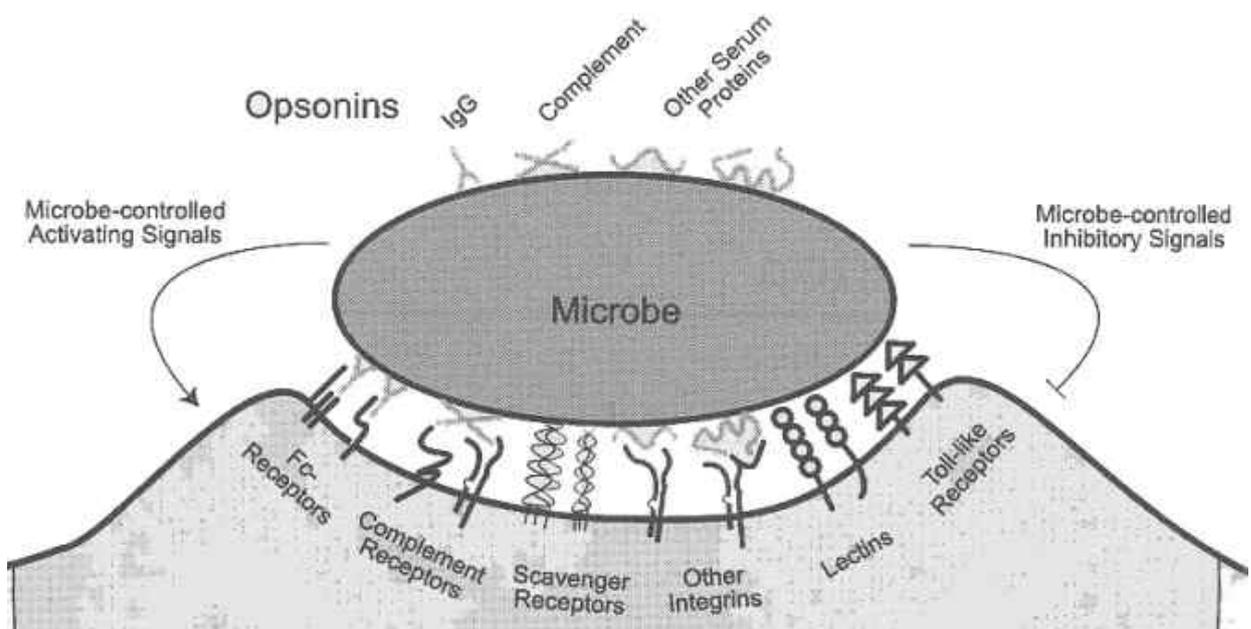


Figure 2 : Molécules intervenant dans la reconnaissance des pathogènes.
D'après (Underhill and Ozinsky, 2002).

Les Toll Like Receptors

Les Toll Like Receptors (TLR) jouent un rôle crucial dans la détection des infections microbiennes. Ce sont des récepteurs très conservés dans l'évolution, initialement décrits chez la *Drosophile*. On connaît à ce jour 10 TLR chez l'homme, qui reconnaissent des composants différents issus des pathogènes (Takeda et al., 2003). Ces TLR présentent des homologies entre eux et transduisent majoritairement leur signal via la même voie de signalisation. La protéine MyD88 est recrutée au niveau du TLR activé, elle recrutera la kinase IRAK, qui une fois phosphorylée pourra s'associer à TRAF6 aboutissant finalement à l'activation du facteur de transcription NF- κ b (Takeda et al., 2003).

Le premier TLR décrit chez l'homme est le TLR4, molécule de surface, qui peut, dans certains cas, fonctionner avec CD14. Il a plusieurs ligands : le lipopolysaccharide (LPS), des composants viraux, et des protéines de choc thermique (HSP). Le TLR2 coopère avec les TLR1, et 6 pour reconnaître des composants des parois des bactéries, des mycoplasmes, ou des parasites. Le TLR5 reconnaît la flagelline des bactéries, tandis que le TLR3 reconnaît les ARN doubles brins des virus (Alexopoulou et al., 2001) et le poly (I :C), un analogue synthétique. Les TLR7, 8 et 9 présentent de grandes homologies entre eux. Le TLR9 permet de reconnaître les motifs CpG hypo-méthylés de l'ADN bactérien (Bauer et al., 2001b). Les TLR7 et 8 reconnaissent l'ARN simple brin des virus. (Heil et al., 2004) (Diebold et al., 2004), et des composés synthétiques de la famille de imidazoquinolines, comme le R-848 (Jurk et al., 2002). Les TLR 7, 8 et 9 sont intracytoplasmiques. Le ligand de TLR10 n'est pas encore connu (Takeda et al., 2003).

Les macrophages expriment également des TLR, mais les études sont moins complètes sur les macrophages que les DC. Le TLR4 en particulier leur permet de répondre au LPS et permettrait l'induction d'IL-12(Nau et al., 2003). Les macrophages exprimeraient également TLR2 et TLR9(Cecil and Klemsz, 2004). Les monocytes semblent exprimer les TLR1, 2, 4, 5, 6, et 8(Kadowaki et al., 2001; Krug et al., 2001).

Les MDC in vivo expriment les TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, et 8, tandis que les PDC expriment les TLR 1, 6, 7 et 9(Kadowaki et al., 2001; Krug et al., 2001). L'interaction des TLR avec leurs ligands a pour conséquence une activation des cellules qui influencera la polarisation ultérieure de la réponse immune. Par exemple, le LPS en se liant au TLR4 exprimé par les MDC peut induire l'expression d'IL-12, qui favorisera la génération d'une réponse Th1, alors que le peptidoglycane, ligand des TLR2 et 6 fera sécréter de l'IL-8 et orientera vers une réponse Th2 (pour revue (Mazzoni and Segal, 2004)). D'autre part, les PDC en présence des ligands des TLR7 et 9 sécréteront de grandes quantités d'IFN α (Heil et al., 2004; Jurk et al., 2002), ce qui favorisera une réponse Th1.

Les Récepteurs « Scavenger » (SR)

Les SR sont des glycoprotéines de surface qui ont été décrites à l'origine comme ayant la capacité de fixer des lipoprotéines modifiées. Plusieurs classes de SR sont exprimées par les APC ; les SR de classe A, B, C, D, et E, classés selon leur structure moléculaire (Platt and Gordon, 1998). Ce sont des molécules qui permettent l'endocytose. Les SR A sont des molécules trimériques à structure en collagène, dotées d'une partie transmembranaire. Les SR-B forment une large boucle extracellulaire reliée par deux petites parties transmembranaires. Les molécules CD36, CLA-1, et SR-BII font partie de cette classe. On peut également citer dans les autres types de SR : la molécule SR-C1 de classe C, et LOX-1 (lectin-like oxidised LDL-receptor 1) de classe E.

Aux côtés des lipoprotéines modifiées, les SR peuvent également reconnaître et permettre l'endocytose de pathogènes, comme les SR-A pour les bactéries Gram+ et Gram- (Peiser and Gordon, 2001). Certaines molécules, comme CD36, CLA-1, ont la capacité de lier les phosphatidylsérines et permettraient ainsi la phagocytose de cellules apoptotiques et nécrotiques.

Les SR-A, CLA-1 et Lox sont exprimés par les DC(Delneste et al., 2002; Harshyne et al., 2003) et les macrophages(Peiser and Gordon, 2001). MARCO n'est pas exprimé sur les DC isolées du sang, cependant une étude chez la souris suggère que les DC de la rate l'exprimeraient après une activation par le LPS(Granucci et al., 2003). L'expression de MARCO est restreinte à quelques types de macrophages : ceux de la zone marginale de la rate, du cortex médullaire dans les ganglions, et sur les macrophages du péritoine (Kraal et al., 2000). Les SR-AI et SR-AII sont

exprimés sur la majeure partie des macrophages, et sur les moDC (Peiser et al., 2002). Les autres molécules sont moins connues.

Les lectines de type C

Les lectines de type C fixent les sucres d'une manière dépendante du calcium, grâce à leur domaine conservé CRD (carbohydrate recognition domain). Nous ne citerons que les plus étudiées. Elles sont classées en deux types selon leur structure moléculaire. Le récepteur au mannose (MR) et DEC-205 sont de type I, alors que DC-SIGN, la langérine, et BDCA-2 sont de types II (Figdor et al., 2002).

Le MR est exprimé par les m Φ (Kato et al., 2000), par les moDC immatures (Sallusto et al., 1995) mais pas par les LC (Kato et al., 2000; Mommaas et al., 1999) ni les MDC et PDC isolées du sang. La langérine n'a été trouvée que sur les LC (Valladeau et al., 2000). DC-SIGN est exprimé par les moDC (Geijtenbeek et al., 2000), et par quelques sous-populations de MDC, comme celles du poumon (Tailleux et al., 2003), mais pas sur les PDC des plaques de Peyer, ni sur les LC de l'épithélium vaginal (Jameson et al., 2002). DEC-205 est exprimé faiblement à la surface des moDC immatures et des MDC du sang. L'expression de ce récepteur est augmentée lors de la maturation sur les moDC. En revanche, sur les LC et les m Φ , cette molécule n'est pas détectée (Kato et al., 2000).

Lectine de type C	Type	Expression	Ligand
CD206 (MR)	I	M Φ , moDC	Mannose, fucose
DEC-205	I	MDC, moDC	nd
Langérine (CD207)	II	LC	nd
DC-SIGN (CD209)	II	moDC, sous populations de MDC	HIV, mannan, ICAM-2 et 3
BDCA-2	II	PDC	nd

Tableau 1 : les lectines de type C.

nd : non déterminé.

Les ligands du MR sont des composés mannosylés ou galactosylés. Le MR reconnaît le mannose et le fucose, tandis que DC-SIGN reconnaît des motifs composés de plusieurs motifs mannose. DC-SIGN peut fixer *Mycobacterium Tuberculosis* sur les MDC (Tailleux et al., 2003). Cette molécule peut également fixer des composés viraux associés au HIV et contribue ainsi à la dissémination de ce virus dans l'organisme (Baribaud et al., 2002). Les ligands naturels

de DEC-205, de la langérine et de BDCA-2 ne sont pas bien connus. (Figdor et al., 2002). Chez la souris, DEC-205 peut être un récepteur pour l'endocytose, induisant la cross-présentation (Bonifaz et al., 2002). La langérine permettrait d'endocyter des bactéries comme *Mycobacterium Leprae* (Hunger et al., 2004), et BDCA-2 peut aussi être récepteur pour l'endocytose (Dzionek et al., 2000).

Les récepteurs aux Ig

Il existe plusieurs types de récepteurs aux Ig ; les Fc α R pour les IgA, les Fc ϵ R pour les IgE et les Fc γ R pour les IgG. On distingue trois classes de récepteurs aux IgG ; les Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) et les Fc γ RIII (CD16). Les Fc γ RI et Fc γ RII comptent trois sous-classes notées A, B et C tandis que les Fc γ RIII ne comptent que deux sous-classes A et B. Ce sont les récepteurs Fc γ RI qui ont la plus forte affinité pour la partie constante des IgG (van Sorge et al., 2003). La phagocytose par les récepteurs Fc γ R est initiée par l'agrégation de ces récepteurs. Un des premiers événements est la phosphorylation des résidus tyrosines des motifs ITAM localisés dans la partie intracytoplasmique de Fc γ RIIA et C, et des chaînes γ ou ζ qui s'associent avec Fc γ RI et Fc γ RIIIA. Les tyrosine-kinases Src et Syk permettent cette phosphorylation. De nombreuses molécules de signalisation sont recrutées dans la voie de signalisation de l'induction de la phagocytose qui n'est pas encore complètement comprise. Le calcium, la protéine kinase C (PKC), la phospholipase D, la phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI-3K), ERK et les GTPases de la famille Rho seraient recrutés (Garcia-Garcia and Rosales, 2002). Ces molécules permettent l'internalisation mais aussi le transport des endosomes vers les lysosomes pour la dégradation des protéines phagocytées (Bonnerot et al., 1998). Fc γ RIIb contient un motif ITIM, qui régule négativement la phagocytose par les autres récepteurs (Hunter et al., 1998).

Les MDC isolées du sang expriment CD32. Sous l'effet de l'IFN γ les MDC peuvent augmenter l'expression de CD64 (Fanger et al., 1996). Les macrophages, quant à eux, expriment les trois Fc récepteurs (Mantovani et al., 2002). Les PDC n'expriment que CD32 (Bave et al., 2003).

Opsonines et récepteurs aux opsonines

Les pathogènes peuvent être recouverts par des molécules appelées opsonines, facilitant leur capture par les phagocytes qui expriment les récepteurs pour ces molécules. Les molécules du complément comme, C1q, C4b, C3b sont reconnues par le récepteur au complément CR1 (CD35), tandis que iC3b est reconnu par CR3 (CD11b/CD18) ou CR4 (CD11c/CD18). Le CR seul n'est pas suffisant pour induire une endocytose, il lui faut d'autres signaux venant d'autres récepteurs (Underhill and Ozinsky, 2002). Les molécules comme les collectines et les ficollines peuvent également fixer les sucres des parois bactériennes et participer à l'action du

complément. Les collectines comprennent le MBL (mannan binding lectin), et les SP (surfactant protein) A et D, les CL (collectines liver) L1 et P1. Les récepteurs comme CD91, la calréticuline, CR1 ou CD14 pourraient être des récepteurs pour les collectines(Lu et al., 2002).

Les macrophages expriment CD91, CR3 et CD14, tandis que les DC n'expriment pas CD14. Les MDC sont CD11c⁺ et CD11b faible, tandis que les PDC sont CD11c⁻ et CD11b – (Dzionic et al., 2000). CD91 est exprimé par les MDC (Hart et al., 2004).

Les différentes voies d'endocytose

Les cellules présentatrices d'antigènes sont capables d'endocyter, c'est-à-dire d'internaliser des antigènes solubles ou particulaires. Cette endocytose peut avoir lieu, selon plusieurs modes : la pinocytose et la phagocytose. La pinocytose est la voie d'endocytose qui permet l'entrée de liquide et d'Ag solubles dans la cellule, mise en évidence grâce à des marqueurs solubles (type « Lucifer yellow »). Plusieurs mécanismes de pinocytose sont décrits : elle peut dépendre de la clathrine, de la calvéoline (et dans ces deux cas elle peut permettre l'endocytose médiée par des récepteurs), ou être indépendante de la clathrine et de la calveoline. Ces trois types d'endocytose se font par invagination de la membrane plasmique (revue(Conner and Schmid, 2003)).

La macropinocytose, quant à elle, est caractérisée par la formation de pseudopodes membranaires, qui vont englober les Ag à ingérer. Elle permet ainsi l'internalisation de « grands » volumes de milieu extracellulaire. Elle peut être induite par la reconnaissance d'un ligand par son récepteur. Elle nécessite le recrutement de Rac, la transferrine, Ras, et Rab (Swanson and Watts, 1995) et la polymérisation de l'actine (Conner and Schmid, 2003).

Enfin la phagocytose permet la capture de particules, et met en jeu le cytosquelette d'actine. Les récepteurs jouent un rôle important dans la phagocytose des pathogènes, pour leur reconnaissance et l'induction de leur internalisation, en guidant la formation des pseudopodes autour de la particule à ingérer, mécanisme dit « zipper » (Swanson and Baer, 1995). Ces récepteurs peuvent être les FcR pour les particules opsonisées par des anticorps, ou les récepteurs au complément CR3 et CR4, pour celles opsonisées par le complément. Les voies de signalisation mises en jeu impliquent les phosphatityl-inositol-3-kinases, dont l'activation permet de recruter d'autres molécules, comme Myosine X au niveau des pseudopodes pour la phagocytose médiée par les récepteurs Fc (Cox et al., 2002). Les molécules Rho GTP ase, et phospho Kinase C (PKC) sont aussi impliquées (Aderem and Underhill, 1999).

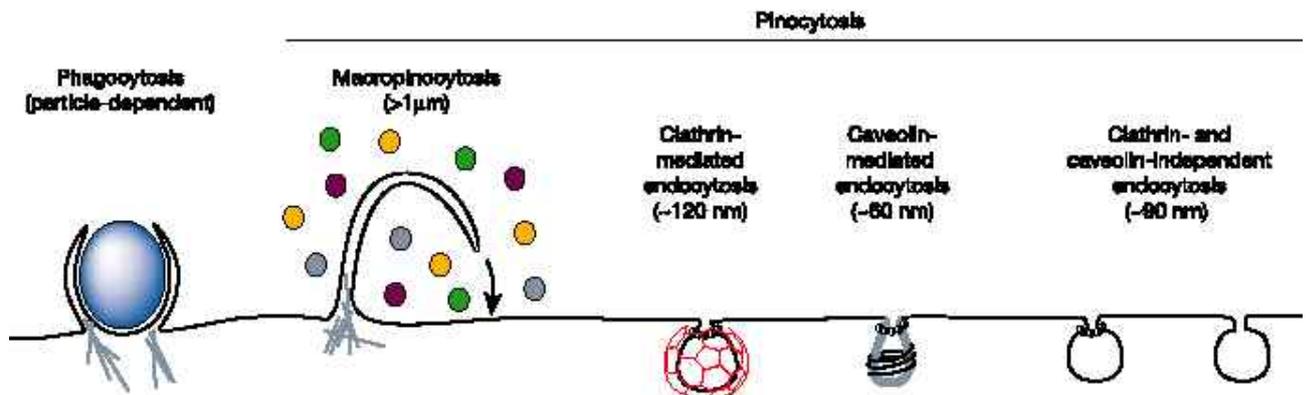


Figure 3 :Les différentes voies d'endocytose.

De (Conner and Schmid, 2003). Les APC peuvent capturer les Ag selon plusieurs mécanismes. Les voies de pinocytose permettent l'entrée de petites particules par invagination de la membrane. La macropinocytose et la phagocytose permettent l'entrée de particules plus volumineuses.

Différentes capacités des APC pour la capture de l'Ag

Les différentes APC ne sont pas dotées des mêmes capacités d'endocytose. Les macrophages, grâce à l'expression des nombreux récepteurs, peuvent reconnaître et endocyter de nombreux pathogènes, et jouent ainsi un rôle essentiel dans la répression des proliférations bactériennes, par exemple. Les MDC ont également de bonnes capacités d'endocytose mais moins importantes que les mΦ(Kato et al., 2000). En revanche, bien que les études portant sur ce sujet soient rares, les PDC semblent être dotées de plus faibles capacités d'endocytose(Dzionic et al., 2000; Robinson et al., 1999).

5 Activation des APC

Maturation des MDC

La maturation des DC est essentielle pour l'induction d'une réponse immune car elle les rend capables de présenter des Ag et d'activer les lymphocytes T dans les ganglions. Elle est induite par des « signaux de danger » selon la théorie de Matzinger(Matzinger, 2002), qui sont par exemple des cytokines, comme l'IL-1 et le TNF- α , ou des composés bactériens comme le LPS(Inaba et al., 2000; Winzler et al., 1997). C'est la maturation qui permet les changements morphologiques des DC dont l'acquisition de dendrites(Winzler et al., 1997). Les DC matures, aux nombreux prolongements cytoplasmiques expriment la molécule CD83(Zhou and Tedder, 1995). La maturation se caractérise également par une forte expression des molécules du CMH de classe I et II, des molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86(Sallusto and Lanzavecchia, 1994; Zhou and Tedder, 1995), et de DC-LAMP (DC lysosome associated membran protein)(de Saint-Vis et al., 1998). L'acquisition de CCR7 leur confère de nouvelles

propriétés migratoires leur permettant d'accéder aux ganglions(Penna et al., 2001). Inaba et al. ont de plus montré que le chargement des peptides sur les molécules de classe II était dépendant de la maturation(Inaba et al., 2000). Au cours de la maturation, les molécules du CMH de classe II sont transportées du lysosome vers la surface(Chow et al., 2002; Winzler et al., 1997). Les DC matures, grâce à l'expression des molécules du CMH et des molécules de costimulation peuvent alors activer des lymphocytes T CD4 comme CD8. Selon le contexte dans lequel elles ont été activées, elles seront capables de sécréter de l'IL-12, ou d'autres cytokines, qui pourront diriger la réponse T induite, vers la voie Th1 ou Th2.

Maturation des PDC

Les PDC peuvent maturer sous l'action d'IL-3 et CD40L, ou en présence de virus(Cella et al., 2000; Grouard et al., 1997; Kadowaki et al., 2000; Kohrgruber et al., 1999). Cette maturation se traduit par une augmentation de l'expression des molécules impliquées dans la présentation des Ag, comme les molécules HLA et les molécules de costimulation, ce qui leur confère la capacité d'activer efficacement des lymphocytes T. Une infection par un virus peut également leur faire exprimer CD83 et le CCR7 (Fonteneau et al., 2003), suggérant que, comme les MDC, les PDC matures pourraient rejoindre les ganglions. Activées en présence de virus, ou de ligands des TLR7 ou 9, les PDC matures peuvent sécréter de grandes quantités d'IFN de type I(Bauer et al., 2001a; Ito et al., 2002; Kadowaki et al., 2000; Siegal et al., 1999) une cytokine capable d'orienter la réponse immune vers la voie Th1. En revanche, les PDC activées par de l'IL-3 induiront une réponse Th2(Rissoan et al., 1999).

Activation des mΦ

Plusieurs types d'activation des macrophages sont possibles selon les stimuli reçus (récepteurs d'endocytose, TLR, cytokines)(Gordon, 2003). Les bactéries se lient à CD14 et aux TLR(Aderem and Ulevitch, 2000) et vont induire une sécrétion d'oxide nitrique (NO, action anti-bactérienne) : cette activation est appelée l'activation innée. Les différents TLR permettent de reconnaître la nature du pathogène, dans le phagosome (Takeuchi et al., 1999; Underhill et al., 1999) et permettent l'activation de facteurs de transcription comme NF-κb. En revanche, une activation alterne par l'IL-4 ou l'IL-13 n'induit pas la production de NO mais permet une augmentation de l'endocytose médiée par les MR(Hart et al., 1999; Montaner et al., 1999) et favorise une réponse Th2 par la sécrétion d'IL-10 et de TGF-β (Bogdan, 2001). L'IFNγ a plutôt une action inverse de l'activation alterne et permet une diminution de l'expression du MR(Mokoena and Gordon, 1985).

Les macrophages ont la capacité d'activer les lymphocytes T car ils expriment également les molécules de costimulation CD80 et CD86(Chaperot et al., 2000a), les molécules du CMH de

classe I et II, en particulier après une activation par l'IFN γ . Les macrophages peuvent favoriser la réponse Th1 grâce à la sécrétion d'IL-12 sous l'activation de dérivés de composés bactériens comme le LPS par exemple (Jobe et al., 2003; Utsugi et al., 2003).

Dégradation des Ag

Les phagosomes contenant les antigènes internalisés sont transportés à travers la cellule pour fusionner avec des endosomes et des lysosomes qui contiennent les enzymes capables de dégrader les Ag. Des molécules exprimées à la surface des phagosomes en contact avec le cytosol permettent de diriger leur trafic, et leur maturation. Rab 5 est un marqueur des phagosomes nouvellement formés (Christoforidis et al., 1999). Il interagit avec EEA1 (early endosome autoantigen) qui permet la fusion avec des endosomes. Puis le phagosome accumule d'autres molécules comme Rab 7, qui l'orientent vers les lysosomes, pour former les phagolysosomes (Rupper et al., 2001). Le matériel internalisé par endocytose suit un trafic similaire. Plusieurs enzymes contenues dans les endosomes dégradent les protéines internalisées. Deux classes de protéases appelées cathepsines sont impliquées : les protéases à cystéine et à aspartate (Riese and Chapman, 2000). Dans les MDC, l'activité des protéases est régulée par la maturation. Le chargement des peptides sur les molécules du CMH, dans les compartiments riches en molécules du CMH de classe II (MIIC), est aussi contrôlé par la maturation des DC (Inaba et al., 2000). Une autre étude suggère que l'IL-1 β permettrait une augmentation de l'activité catalytique des cathepsines et la dégradation des protéines en peptides qui peuvent ensuite être chargés sur les molécules du CMH de classe II (Fiebiger et al., 2001). Les différentes enzymes lysosomales ont un spectre d'activité plus ou moins large. Leur activité dépend du pH, lui-même contrôlé par la maturation de la DC, qui permet la mise en route de pompes à protons pour acidifier les lysosomes (Trombetta et al., 2003).

6 Présentation des Ag

Après internalisation et dégradation des Ag, les peptides provenant d'Ag exogènes sont chargés sur les molécules du CMH de classe II. Les molécules du CMH de classe I présentent les peptides endogènes à la cellule. Ce sont les voies de présentation décrites classiquement. Il est cependant possible pour les APC de présenter les peptides provenant d'Ag exogènes en association avec les molécules HLA de classe I par une voie appelée cross-présentation.

Apprêtement des Ag associés aux molécules de classe II du CMH

L'expression des molécules de classe II du CMH et donc la présentation par ces molécules sont spécifiques des APC. Ces molécules sont synthétisées en association avec la chaîne invariante Ii qui bloque initialement le chargement des peptides. La queue cytoplasmique

de li porte un motif qui permet de diriger ces molécules néo-synthétisées soit vers la voie endosomale, soit de la partie trans du Golgi vers les endosomes précoces(Honey and Rudensky, 2003). La fusion du phagosome ou de l'endosome nouvellement formé avec d'autres endosomes l'enrichit en enzymes (cathepsin S par exemple), qui vont pouvoir dégrader la chaîne li et libérer le site d'ancrage du peptide(Riese and Chapman, 2000). Dans les endosomes tardifs et les lysosomes, les complexes peptides/molécules du CMH de classe II (CMH/peptide) se forment(Inaba et al., 2000). Ils se regroupent dans les compartiments (MIIC) riches en molécules de classe II du CMH et de costimulation, qui sont positifs pour LAMP. Les CMH/peptide gagnent alors la membrane plasmique(Turley et al., 2000). Ce trafic est induit par la maturation : après un signal de danger activateur, les MIIC disparaissent et les molécules du CMH de classe II sont transportées à la surface de la DC(Chow et al., 2002). En surface, les CMH/peptide et molécules de costimulation CD86, CD40 resteraient groupés(Turley et al., 2000).

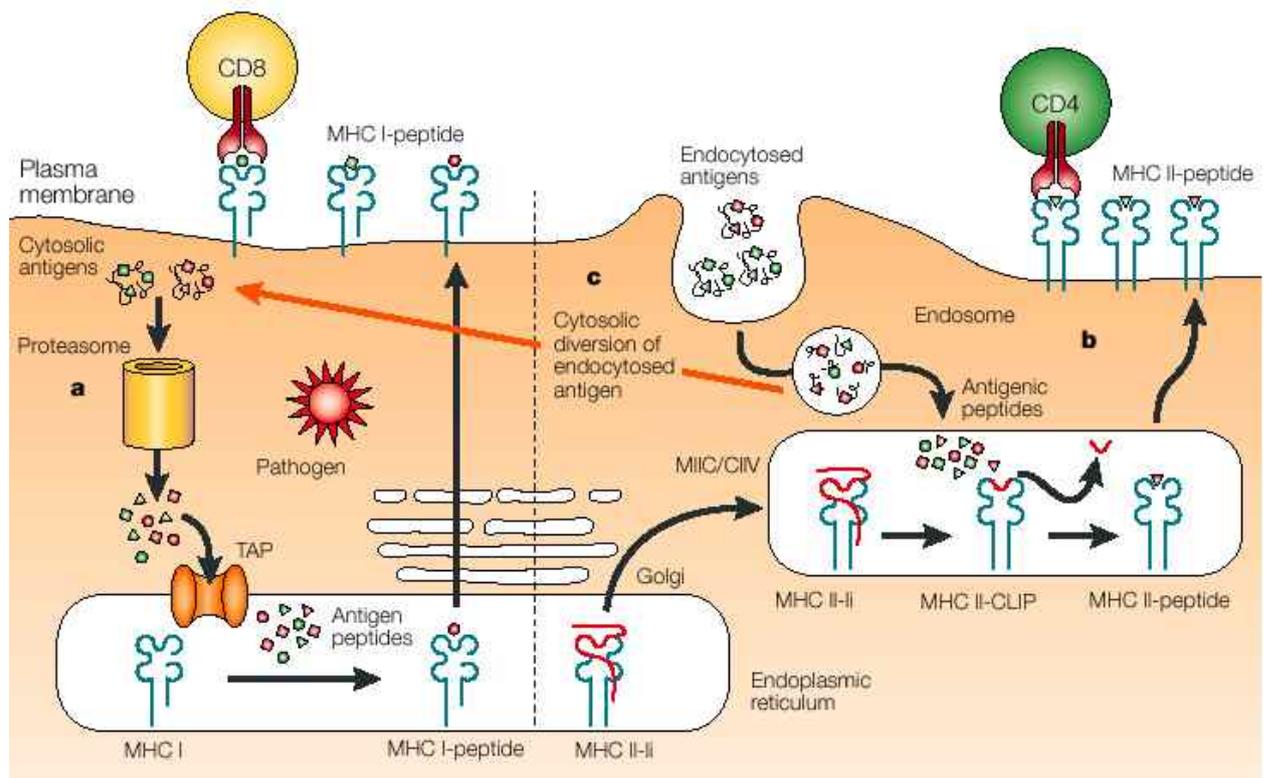


Figure 4 : Apprêtement des Ag sur les molécules du CMH de classe I et II.

De (Heath and Carbone, 2001). Les DC sont capables de présenter les peptides selon trois voies d'apprêtement différentes : les Ag exogènes sur les molécules du CMH de classe II et de classe I (la cross-présentation), les Ag endogènes sur les molécules de classe I.

Apprêtement des Ag associés aux molécules de classe I du CMH

L'expression des molécules HLA de classe I est ubiquitaire et permet de présenter des peptides issus de la dégradation de protéines endogènes à la cellule, synthétisées dans le cytosol par la cellule elle-même ou par un pathogène (type virus). Elles sont adressées au protéasome

(complexe enzymatique du cytosol) grâce à l'ubiquitynilation. Le protéasome dégrade les protéines en peptides qui sont ensuite transportés par les molécules TAP1/2 dans le réticulum endoplasmique (RE) où ils sont chargés sur les molécules du CMH de classe I (Klein and Sato, 2000). Les différentes étapes de la dégradation à la présentation des peptides sont régulées. La maturation des DC permet une augmentation de la synthèse des molécules du CMH de classe I (Delamarre et al., 2003). L'immunoprotéasome induit par l'IFN γ ne produit pas les mêmes peptides que le protéasome classique (Morel et al., 2000).

La cross-présentation

Les DC et les macrophages sont capables de cross-présenter des Ag. La cross-présentation est la présentation de peptides issus de protéines exogènes en association avec les molécules du CMH de classe I. Les mécanismes de la cross-présentation ont été récemment analysés. Une des questions clés était de savoir comment les protéines exogènes pouvaient accéder au cytosol pour y être dégradées par le protéasome puis être chargées sur les molécules de classe I. Les protéines des endosomes ou phagosomes seraient transportées par la molécule Sec61 dans le cytoplasme pour y être ubiquitynilées puis dégradées par le protéasome. Les peptides seraient alors retransloqués dans le phagosome via les molécules TAP, puis chargés sur les molécules du CMH de classe I (Houde et al., 2003) dans le macrophage. Ces mécanismes de fusion de RE avec le phagosome et de retranslocation ont été vérifiés sur la DC (Guermonprez et al., 2003). Les protéines internalisées par macropinocytose peuvent être également cross-présentées (Ackerman et al., 2003). D'autre part, une séquence signal du domaine intracytoplasmique des molécules du CMH de classe I semble indispensable pour diriger ces molécules vers le compartiment où se fait le chargement des Ag d'origine exogène (Lizee et al., 2003).

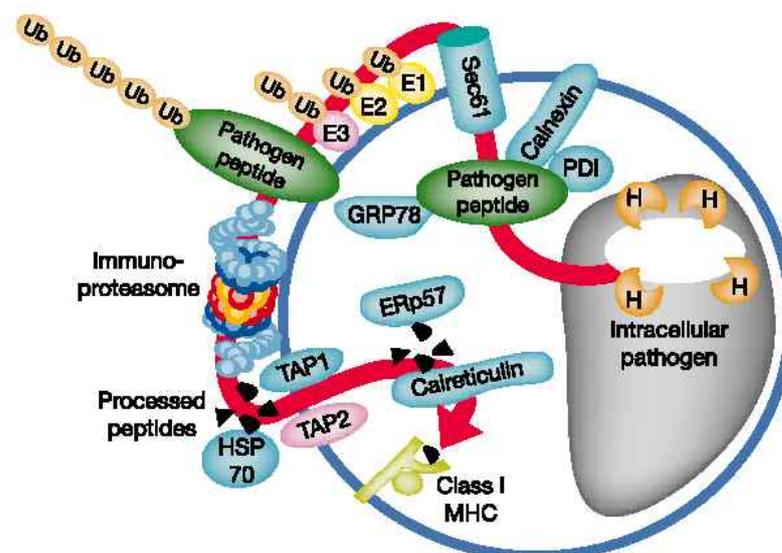


Figure 5 : Mécanisme de la cross-présentation.

De (Houde et al., 2003). Les Ag exogènes sont dégradés puis transloqués grâce aux molécules Sec61 dans le cytosol pour y être ubiquitinylés et dégradés par l'immuno-protéasome. Les peptides sont ensuite retransloqués par les molécules TAP dans les phagosomes pour être chargés sur les molécules du CMH de classe I.

Des études ont laissé supposer que les HSP exogènes pouvaient fournir les peptides cross-présentés (Tamura et al., 1997). Cependant, d'autres études plus récentes montrent que ces molécules ne seraient pas nécessaires pour la cross-présentation (Shen and Rock, 2004). Mieux que les peptides, les protéines natives internalisées constitueraient la source principale de substrats pour l'immunoprotéasome des APC qui produit les peptides chargés sur les molécules du CMH de classe I (Norbury et al., 2004).

Plusieurs travaux suggèrent que la cross-présentation pourrait être induite ou favorisée par certains signaux, en fonction des récepteurs impliqués dans l'endocytose ou des TLR mis en jeu, et aussi des molécules de costimulation engagées et des cytokines présentes. Une étude chez la souris propose que les IFN de type I sécrétés lors d'une infection virale par les PDC pourraient être un signal activateur de la cross-présentation (Le Bon et al., 2003). Par ailleurs, sur les MDC murines, l'activation par les TLR3 et 9 induirait la cross-présentation d'OVA, en agissant sur le trafic des Ag internalisés, qui seraient redirigés vers le cytosol (Datta et al., 2003). D'autres signaux comme le CD40L ou la rupture de contacts cellulaires pourraient aussi induire la cross-présentation chez la souris (Delamarre et al., 2003). Des récepteurs comme LOX et les FcR favoriseraient la cross-présentation des Ag exogènes (Delneste et al., 2002; Dhodapkar et al., 2002a).

Présentation par les molécules CD1

Les molécules CD1 sont des molécules de présentation dont la structure est semblable à celle des molécules du CMH de classe I, qui comporte une poche hydrophobe, qui peut être chargée avec des Ag lipidiques (Dutronec and Porcelli, 2002). Les moDC humaines expriment les molécules CD1a, b, c et d (Brigl and Brenner, 2004). CD1a et CD1c sont exprimées sur les cellules de Langerhans. Peu d'études ont été faites sur l'expression de ces molécules sur les PDC (l'expression des molécules est résumée dans le tableau 2). Les molécules CD1 ont des parties intracytoplasmiques différentes qui les dirigent soit vers les endosomes précoces ou tardifs, soit vers les lysosomes, où les lipides sont dégradés (Moody and Porcelli, 2003). Pour les molécules CD1a, le chargement se fait au niveau de l'endosome précoce, tandis que pour les molécules CD1b, les Ag sont chargés au niveau des lysosomes. Les molécules CD1 peuvent être reconnues par les TCR $\alpha\beta$ comme $\gamma\delta$ et peuvent induire une activation des lymphocytes NK T. Les récepteurs utilisés au moment de l'internalisation des Ag peuvent jouer un rôle déterminant dans la présentation sur les CD1. Sur les cellules de Langerhans, par exemple, la langérine pourrait induire une présentation de lipides sur les molécules CD1a (Hunger et al., 2004). Ces molécules

jouent donc un rôle dans la présentation des lipides bactériens et la polarisation de la réponse immune ; l'hypothèse de leur implication dans l'immunosurveillance des cancers commence à émerger (Coventry and Heinzl, 2004).

Molécules CD1	moDC	MDC	LC	PDC	mΦ
CD1a	+	-	+	-	-
CD1b	+	Certains types	-	ND	+
CD1c	+	-	+	-	-
CD1d	+	Certains types	-	ND	+

Tableau 2 : Expression des molécules CD1.

ND : non déterminé.

Les APC capturent les pathogènes et intègrent différents signaux faisant le lien entre la réponse innée et la réponse adaptative

B. Activation d'une réponse immune adaptative

L'activation d'un lymphocyte T est complexe et implique plusieurs types de molécules, dont le TCR, les molécules de costimulation, mais aussi des molécules d'adhérence et des cytokines. Les seuils d'activation seront différents selon que l'on s'adresse à un lymphocyte T naïf ou à un lymphocyte T mémoire. En effet, il est admis que l'activation d'un lymphocyte T naïf nécessite que l'antigène soit présenté par une cellule professionnelle, dont le prototype est la cellule dendritique. La réponse des lymphocytes T mémoires sera beaucoup moins exigeante en terme de costimulation et de densité antigénique nécessaire.

1 Les trois signaux pour l'activation des lymphocytes T

Signal 1 : Interaction du TCR avec le complexe CMH/peptide

La reconnaissance par le TCR du complexe CMH/peptide a lieu au sein d'une synapse. Une des premières étapes de la formation de cette synapse est l'interaction de molécules d'adhérence, comme les molécules CD2/CD58 (LFA-3), CD54 (ICAM-1) ou CD50 (ICAM-3)/CD11a/CD18 (LFA-1). Même en absence d'Ag, ICAM-3 et LFA-1 se regroupent à la surface de contact entre le lymphocyte T et l'APC et permettent ainsi au lymphocyte de « scanner » la DC. L'engagement d'ICAM-3 aurait un rôle important dans l'initiation de l'adhérence entre lymphocyte T et APC et pourrait interagir avec d'autres molécules, comme DC-SIGN sur les DC (Geijtenbeek et al., 2000; Montoya et al., 2002). Au sein de la synapse, les molécules

d'adhérence se trouvent en périphérie autour des molécules TCR et CMH/peptide et de costimulation(Grakoui et al., 1999), et initient un signal activateur avant même que la synapse ne soit complètement formée (Lee et al., 2002).

Le TCR reconnaît avec une grande spécificité une molécule du CMH en association avec un peptide, il s'associe au CD3 pour induire une réponse cellulaire. Le complexe CD3/TCR est formé des molécules TCR α , TCR β , CD3 γ , CD3 δ , et CD3 ϵ , et CD3 ζ (Pan et al., 2004). C'est la chaîne CD3 ζ qui contient le motif ITAM de transduction du signal. L'interaction TCR-CMH/peptide est particulièrement déterminante dans l'activation de lymphocytes naïfs. L'affinité entre le TCR et le complexe CMH/peptide ainsi que la dose de l'Ag influence fortement la signalisation, et permet ou non la phosphorylation de ZAP-70(Hemmer et al., 1998). L'interaction entre le TCR son ligand doit être d'une durée suffisamment longue, et pour qu'il y ait activation, il faut dépasser un nombre seuil de TCR engagés. Il faut cependant tenir compte de la dynamique de cette interaction, un seul complexe CMH/peptide pouvant engager séquentiellement plusieurs TCR. De plus, l'intégration du message donné par l'environnement est également importante dans la réponse cellulaire, et ce message dépend des différentes molécules de costimulation exprimées à la surface des APC et des cytokines présentes lors de l'activation (pour revue (Lanzavecchia et al., 1999)).

Signal 2 : interaction entre les molécules de costimulation

La seule reconnaissance TCR-CMH/peptide n'est pas suffisante pour induire une réponse, il faut un signal supplémentaire délivré par des molécules de costimulation.

On peut distinguer deux familles de molécules de costimulation :

- la famille de CD28 (qui est un sous-type de la superfamille des Ig) qui comprend CD80 et CD86, reconnaissant CD28 ou CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocytes Ag 4) sur le lymphocyte, ICOS (inducible T-cell costimulator), et PD-1 qui reconnaissent leur ligand, (respectivement ICOS ligand, et PD-1 ligand) sur l'APC(June and Riley, 2004; Sharpe and Freeman, 2002).
- la famille du TNF récepteur/TNF(Croft, 2003) qui comprend les couples récepteur/ligand suivants ; CD40/CD40L, 4-1BB/4-1BBL, CD30/CD30L, OX40/OX40L, CD27/CD70, HVEM/LIGHT. L'expression de ces molécules de la famille du TNFR sur les APC et les lymphocytes T est modulée aux cours de l'activation.

Molécule	T cells			APCs	
	Naïve	Effector	Memory	Resting	Activated
CD27	++	+++	++/-	-	B*
CD70	-	+++*	-	-	B, DC, MØ
HVEM	+++	+	+++	B, DC*	B, MØ*
LIGHT	-	+++	-	DC	-
OX40	-	+++	+/-	-	B, DC*
OX40L	-	+++*	-	-	B, DC, MØ
4-1BB	-	+++	+/-	-	B, DC*
4-1BBL	-	+++*	-	-	B, DC, MØ
CD30	-	+++	+/-	-	-
CD30L	-	+++*	-	-	B, MØ

Tableau 3: Expression des molécules de costimulation sur les DC et les MØ
D'après (Croft, 2003). - non exprimé sur les mΦ ou les DC et les cellules B.

Les PDC n'expriment pas ou très faiblement les molécules CD80, CD86 et CD40 (Krug et al., 2001; Robinson et al., 1999) mais comme pour les MDC, leur expression sous l'action de différents stimuli, comme des CpG, CD40L ou IL-3 peut être induite. Peu d'études sur l'expression de molécules de costimulation de la famille du TNF sur les PDC ont été faites. On peut noter celle de Krug qui montre que les PDC cultivées en présence d'IL-3 expriment OX40L (Ito et al., 2004).

L'expression de CD40 sur la DC peut être augmentée par un stimulus comme le LPS ou un autre signal de danger. Les LC mûrissent sous l'action de CD40L, développent des dendrites, augmentent l'expression de CD80 et CD86, et sécrètent des cytokines comme TNF- α , IL-8, et CCL3 (Caux et al., 1994). L'interaction CD40/CD40L est de plus particulièrement importante dans l'induction de la sécrétion d'IL-12 par les MDC (Langenkamp et al., 2000).

Au cours de la maturation, l'expression des molécules de costimulation est modulée. Chaque couple récepteur/ligand influence la réponse T différemment. CD80 et CD86 exprimés sur les APC ont pour ligand CD28 sur les lymphocytes. L'interaction de CD28 avec CD80 ou CD86 permet de diminuer le nombre seuil de TCR à engager pour avoir une activation du lymphocyte T, en amplifiant le signal donné via le TCR (Lanzavecchia et al., 1999; Viola and Lanzavecchia, 1996). Fonctionnant en synergie avec le TCR, CD28 induit la sécrétion d'IL-2, qui favorise la prolifération et la survie des lymphocytes T (Fields et al., 1998; Zhou et al., 2002). L'interaction de CD28 avec ses ligands entraîne l'expression des autres molécules de costimulation qui modulent la réponse T induite (Croft, 2003; McAdam et al., 2000; Sharpe and Freeman, 2002; Walker et al., 1999). CTLA-4, autre ligand de CD80 et CD86, est quant à lui exprimé plus tardivement par les lymphocytes T CD4 et CD8 activés; il inhibe leur prolifération, participant ainsi au contrôle de la réponse immune (Krummel and Allison, 1995).

Les molécules de costimulation interviennent donc à différents stades de la réponse immune et participent à l'orientation de celle-ci vers une réponse Th1 ou Th2 ou T régulateur. L'interaction de PD-1 avec son ligand diminuerait la sécrétion d'IL-10 et d'IFN γ par les lymphocytes T, tandis que ICOS induirait la sécrétion d'IL-4 (Freeman et al., 2000; Mak et al., 2003). Les molécules de costimulation interviennent aussi dans la régulation de la migration des lymphocytes T par l'induction de la sécrétion de chimiokines et de l'expression différentielle de leurs récepteurs (Herold et al., 1997; Walker et al., 1999).

Signal 3

Les cytokines constituent un troisième signal, qui va déterminer en partie l'orientation de la réponse immune vers la réponse cellulaire ou humorale, voire la tolérance (Albert et al., 2001). In vitro, le signal 3 peut être fourni par l'IL-2. Malek et Bayer proposent que le signal 3 soit donné in vivo par des cytokines diverses (IL-2, IL-4, IL-6, IL-12...), ou par des molécules de costimulation (41BB, OX40, CD27...)(Malek and Bayer, 2004). En association avec les molécules de costimulation et le TCR, ces signaux vont induire la différenciation des lymphocytes T naïfs, en lymphocytes Th1, Th2, ou Tregulateurs.

2 Réponses Th1 et Th2

La réponse immune cellulaire comprend l'activation des lymphocytes CD4⁺ Th1, CD8⁺ et NK. Une cytokine importante dans cette activation est l'IL-12 (Trinchieri, 2003). Sa présence permet, en coopération avec l'IL-18, de générer des lymphocytes CD4⁺ Th1 qui sécrètent de l'IFN γ (Langenkamp et al., 2000; Murphy and Reiner, 2002). La réponse immune humorale implique les lymphocytes CD4⁺ Th2 et les lymphocytes B. Les lymphocytes CD4⁺ Th2 sont générés principalement en présence d'IL-4, qui par la voie d'activation STAT-6 permet la transcription de GATA3 et la sécrétion d'IL-4 par les lymphocytes Th2 (Murphy and Reiner, 2002). L'IL-4 joue un rôle important pour les lymphocytes B, dans la sécrétion des Ig et la commutation vers la production d'IgE (Liu et al., 2003).

Les DC matures et les m Φ vont sécréter des cytokines qui permettent l'orientation de la réponse immune (Kapsenberg, 2003; Mantovani et al., 2002). Différents facteurs environnementaux peuvent amener les APC à orienter les lymphocytes T vers une réponse Th1 ou Th2, grâce aux nombreux récepteurs exprimés par les APC, tels les TLR (Mazzoni and Segal, 2004). De plus, les DC ne seraient pas limitées à sécréter une gamme donnée de cytokines (Langenkamp et al., 2000) : dans les premiers temps de l'activation, les MDC sécrètent de l'IL-12, activant une réponse Th1. Plus tardivement, les MDC, suite à la même activation

(Langenkamp et al., 2000) diminuent leur sécrétion d'IL-12 et génèrent alors une réponse Th2.

Les PDC, comme les MDC, peuvent selon le contexte orienter soit vers une réponse Th1 (Cella et al., 2000) par la sécrétion d'IFN α soit vers une réponse Th2 (Rissoan et al., 1999). En particulier, une polarisation Th1 est induite par les PDC activées en présence de virus (Cella et al., 2000) de CpG ODN (Krug et al., 2001) ou de R-848 (Ito et al., 2002).

Selon leur polarisation, les lymphocytes T exprimeront différents récepteurs aux chimiokines. Les lymphocytes T activés perdent l'expression de CCR7 qui leur a permis d'entrer dans les ganglions. Les lymphocytes Th2 exprimeraient préférentiellement CCR8 (Zingoni et al., 1998), CCR3 (Sallusto et al., 1997), et CCR4 (Bonecchi et al., 1998), répondant ainsi à CCL1, à l'eotaxine, et à MDC/CCL22. En revanche, CCR5 et CXCR3 sont préférentiellement exprimés par les lymphocytes Th1 et permettent leur migration sous l'action de MIP1 β /CCL4 et IP10/CXCL10 (Bonecchi et al., 1998; Loetscher et al., 1998).

3 Les lymphocytes T régulateurs (Treg)

Les lymphocytes Treg prolifèrent peu lors d'une activation par le TCR, et peuvent, lors d'un transfert adoptif, transmettre à l'hôte la tolérance à un antigène. On peut distinguer deux types de lymphocytes T CD4⁺ régulateurs : les lymphocytes Treg naturels et adaptatifs (ou Tr1) (Bluestone and Abbas, 2003; Roncarolo et al., 2001). Les lymphocytes Treg naturels sont générés dans le thymus, ils expriment CD4, CD25, CTLA-4, et GITR (glucocorticoid-induced TNF receptor family-related protein), ils sécrètent de l'IL-10 et du TGF- β , mais leurs fonctions suppressives dépendent de contacts cellulaires. Ces lymphocytes Treg empêcheraient le développement de réponses auto-immunes. Les lymphocytes Treg adaptatifs, activés en périphérie dans un contexte particulier (absence de costimulation, ou en présence d'IL-10) sont CD4⁺CD25^{+/-}, ils sécrètent de l'IL-10 et du TGF- β qui sont importants pour leurs fonctions régulatrices. Les lymphocytes Treg générés in vitro à partir de lymphocytes CD4⁺ sont Foxp3⁻, et sécrètent de l'IL-10 (Bluestone and Abbas, 2003; O'Garra and Vieira, 2004). En plus de ses effets immunosuppresseurs pour les lymphocytes, l'IL-10 peut induire une diminution de l'expression de la molécule de costimulation CD86 et de HLA-DR par les DC (Buelens et al., 1995). Aux côtés des lymphocytes Treg CD4⁺, qui sont les plus étudiés actuellement, on retrouve aussi des lymphocytes CD8⁺ régulateurs (Horwitz et al., 2003).

En périphérie, plusieurs situations peuvent aboutir à la différenciation de lymphocytes T naïfs en lymphocytes Treg lors de la stimulation par le TCR : soit un défaut de molécules de

costimulation, soit grâce à des signaux positifs(Vigouroux et al., 2004). Si des anticorps bloquant anti-CD40 et anti-CD86 sont ajoutés à une culture mixte lymphocytaire, des lymphocytes Treg peuvent aussi être générés (Koenen and Joosten, 2000). Plusieurs autres signaux positifs peuvent initier une telle différenciation : une signalisation par CD2 sur les lymphocytes T naïfs(Wakkach et al., 2001), par ICOS(Akbari et al., 2002), ou par NOTCH(Yvon et al., 2003). La présence de DC immatures peuvent également générer des lymphocytes Treg. Les lymphocytes expriment la molécule CTLA-4, perdent la capacité de sécréter de l'IFN γ et d'IL-4. En revanche ils sécrètent de l'IL-10(Jonuleit et al., 2000). L'IL-10 et le TGF- β joueraient un rôle important dans la génération de lymphocytes Treg(Chen et al., 2003; Levings et al., 2004).

Les PDC activées avec du CD40L pourraient induire la génération de lymphocytes Treg CD8+. Les lymphocytes CD8+ naïfs, activés par les PDC, produisent de grandes quantités d'IL-10 et peu de TGF- β , tandis que ceux activés avec des moDC produisent de l'IFN γ . Un rôle central de l'IL-10 dans la génération et la fonction de ces CD8 régulateurs est mis en évidence. Les signaux responsables de l'induction de ces lymphocytes Treg restent à définir, puisque les PDC ne produisent pas d'IL-10(Gilliet and Liu, 2002). Les PDC activées avec un CpG de type B peuvent avoir le même effet sur les lymphocytes CD4+ CD25-, qui deviennent CD25+ (Moseman et al., 2004).

Une fois générés par l'interaction TCR-CMH/peptide en présence d'un signal tolérogène, les lymphocytes Treg sont fonctionnels. Lors d'une seconde rencontre avec le complexe CMH/peptide, ces lymphocytes Treg vont entrer en fonction localement, ils vont pouvoir réguler négativement des lymphocytes cibles par des mécanismes pas encore connus dépendants ou indépendants de contacts intercellulaires (O'Garra and Vieira, 2004; Vigouroux et al., 2004), parmi lesquels ; la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β tous les deux immunosuppresseurs(Gilliet and Liu, 2002; Gorelik et al., 2000; Lin et al., 2002). Les CD4+CD25+ peuvent inhiber la prolifération de lymphocytes T mémoires comme naïfs(Levings et al., 2001).

2^{ème} partie : Surveillance antitumorale

Le système immunitaire fait donc intervenir de nombreuses cellules pour défendre l'organisme contre les pathogènes. Parmi ces cellules, les APC ont un rôle clé de sentinelles : elles repèrent le danger, alertent et recrutent les autres cellules, migrent dans les ganglions pour activer les lymphocytes T. Ces lymphocytes activés peuvent alors retourner lyser les cellules infectées en périphérie. Dans le cas d'une infection par un agent pathogène, la présence de PAMP et les lésions tissulaires vont générer un environnement propice à l'activation des APC. Les tumeurs, elles, se développent le plus souvent en l'absence de tels « signaux de danger », ce qui peut contribuer à les rendre invisibles pour le système immunitaire.

Le concept d'immunosurveillance antitumorale est entre autres, basé sur l'observation que la fréquence des cancers est beaucoup plus importante chez les individus immuno-déprimés (SIDA, immunosuppression post-greffe), avec dans ces cas-là, une prépondérance des cancers viro-induits, par exemple les lymphomes induits par le virus d'Epstein-Barr. Le potentiel antitumoral du système immunitaire est de plus confirmé par l'efficacité des thérapies cellulaires allogéniques, dont l'efficacité repose sur l'effet GVL (graft versus leukemia), c'est-à-dire la capacité des cellules immunocompétentes du greffon à reconnaître les cellules malignes et à les détruire efficacement. L'émergence de cancers chez des individus par ailleurs en bonne santé, suggère que leur système immunitaire s'est retrouvé incapable de générer une réponse antitumorale capable d'éradiquer la tumeur. Dans le chapitre suivant, nous présenterons quelques principes de l'immunologie antitumorale, et quelques mécanismes d'échappement permettant aux cellules tumorales de se développer.

A. Existence d'une surveillance antitumorale

1 « Tumor shaping » ou sélection des cellules tumorales par pression du système immunitaire

Il est difficile de préciser dans quelle mesure les différents acteurs de l'immunité antitumorale interviennent lorsqu'une tumeur apparaît, mais cette immunosurveillance va

exercer une pression sélective qui va influencer le devenir de la tumeur. Les cellules transformées les plus immunogènes seront vraisemblablement éliminées précocément par les cellules NK, NKT, T $\gamma\delta$ ou CTL. Parce que les tumeurs sont souvent génétiquement instables, cette pression sélective permet l'émergence de cellules malignes de plus en plus résistantes au système immunitaire. Le système immunitaire interviendrait donc activement dans l'évolution des tumeurs, d'où le concept d'« immunoediting » préféré par certains à celui de « surveillance » (Dunn et al., 2004; Shankaran et al., 2001). Décrit par Dunn et al., « l'immunoediting » comprend 3 étapes (illustré dans la figure 8). (1) L'élimination : les cellules les plus immunogènes sont supprimées par le SI. Pendant plusieurs années, un équilibre (2) s'établit alors entre le système immunitaire et les cellules tumorales qui peu à peu acquièrent des mutations qui les rendent résistantes. Puis quelques cellules arrivent à échapper (3) à l'immunosurveillance ; une tumeur peut alors se développer et les signes cliniques apparaissent. Il y a donc une immunosurveillance, qui peut avoir pour conséquence la sélection des cellules cancéreuses les plus résistantes. Cette surveillance peut être exercée par le système immunitaire inné ou adaptatif.

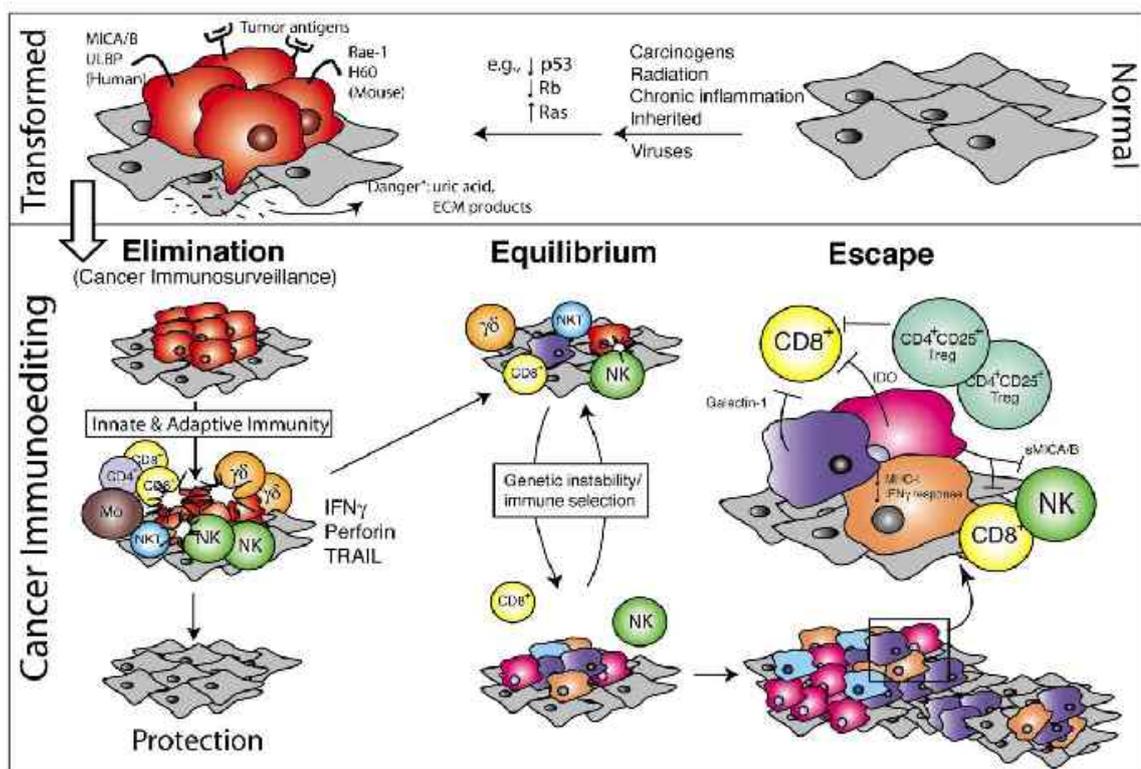


Figure 6 : Immunoediting .

De Dunn, Immunity. Le système immunitaire participe à la sélection des cellules les moins immunogènes, qui deviennent tumorales, et qui échappent aux lymphocytes effecteurs.

2 Surveillance par le système inné

Les cellules NK

Les lymphocytes NK sont généralement reconnus pour leur capacité de lyser des cellules cibles qui n'expriment pas de molécules du CMH de classe I. Leur activation est cependant plus complexe et résulte de l'intégration de deux signaux, un positif et un négatif. Elles seront capables de lyser des cellules par la voie d'exocytose des perforine-granzymes, ou par la voie d'apoptose via Fas. Elles pourront aussi sécréter des cytokines (IFN γ , TNF, GM-CSF), des chimiokines (CCL4, CCL5 et CCL22) ou du NO (Robertson, 2002) (Cooper et al., 2001).

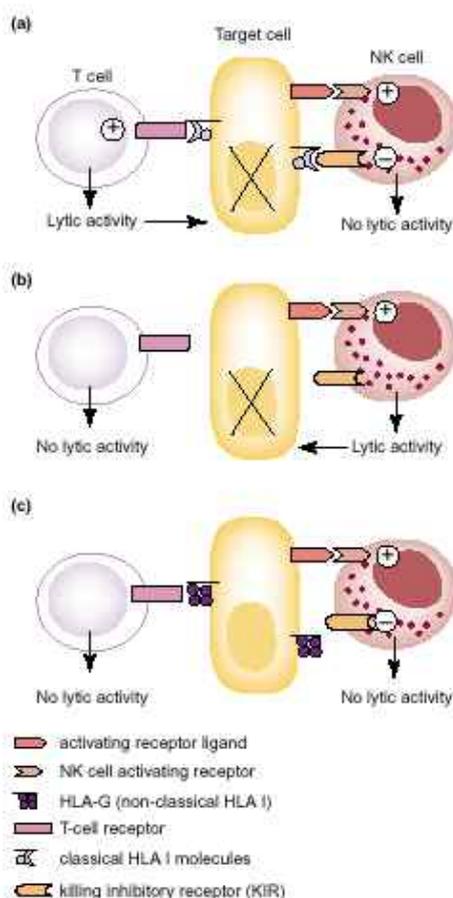


Figure 7 : Mode de régulation de l'activation des NK.

De Seliger Trends in Immunology 2003. L'activation des cellules NK est régulée par l'intégration de signaux donnés par des récepteurs activateurs, et de récepteurs inhibiteurs reconnaissant les molécules du CMH de classe I de la cellule cible. Alors que les CTL seront activés par les molécules du CMH, les NK seront inhibés et n'exerceront pas leur activité lytique.

Les signaux positifs activateurs

L'activation des cellules NK est complexe, et implique diverses molécules (Lanier, 2003):

-des molécules de la superfamille des Ig, comme les NCR (Natural cytotoxicity receptor) : NKp46 (Pessino et al., 1998), NKp44, et NKp30 (Pende et al., 1999), et des molécules KIR (killer cell Ig-like receptor),

-des molécules de la famille proche des lectines de type C : les molécules NKG2 C, D et E.

-des co-récepteurs CD69, 2B4 (CD244), DNAM-1, NTB-A et le CD2, CD16 (Costello et al., 2004; Lanier, 1998). Cette liste n'étant pas exhaustive.

Les ligands de ces récepteurs sont très divers. NKp44 et NKp46 reconnaissent l'hémagglutinine exprimée par des virus (Arnon et al., 2001; Mandelboim et al., 2001), les molécules KIR2DS reconnaissent des molécules HLA C, tandis que NKG2D peut lier les molécules MICA, MICB, ULBP (Cosman et al., 2001; Raulet, 2003), et CD16 la partie constante des IgG. Ces récepteurs sont activateurs grâce à leur association avec des protéines adaptatrices qui expriment un motif ITAM (YXXL_{6-8X} YXXL/I) (Lanier, 2001). La chaîne ζ du TCR, Fc ϵ R1 γ des FcR et DAP12 contiennent ces motifs, et sont exprimés sur les cellules NK. Lors de la reconnaissance ligand/récepteur, les ITAM sont phosphorylés et recrutent Syk et Zap-70 qui vont ensuite activer d'autres molécules de transduction comme MAPK, PI3K, des phospholipases C (Lanier, 2003). Par exemple, NKG2D peut s'associer à DAP12 mais aussi à DAP10 (Wu et al., 1999) qui pourra se lier à une sous-unité de PI3K transduisant ainsi un signal positif.

Les signaux négatifs inhibiteurs

Les récepteurs de surface des cellules NK donnant un signal négatif sont essentiellement les molécules de superfamille des immunoglobulines (Ig) dont les ligands sont les molécules du CMH de classe I, HLA A, B, C, et G (Lanier, 1998). Ces ligands sont des molécules KIR, les LIR (Leucocyte Ig-like Receptor) (Andre et al., 2001), ou des molécules NKG2 de la famille des lectines, qui peuvent s'associer à CD94 (Lanier, 1998). Ces récepteurs inhibiteurs possèdent dans leur partie intracytoplasmique un ou des motifs ITIM (I/VxYxxL/V) (Lanier, 1998) qui une fois phosphorylés recruteront des phosphatases SHP-1 et SHP-2 (Lanier, 2003). Les signaux négatifs vont pouvoir empêcher la transduction des signaux positifs induits par les récepteurs activateurs.

Rôles des lymphocytes NK dans la surveillance antitumorale

Les cellules NK ont la capacité de lyser des cellules tumorales, sans sensibilisation préalable. Elles peuvent infiltrer les tumeurs, et leurs phénotype et fonctions ne sont pas forcément altérés (Gati et al., 2004).

Certains ligands activateurs des cellules NK sont exprimés par les cellules tumorales. Chez l'homme, les molécules MIC (MHC I related molecule) A et B, (Bahram et al., 1994) sont exprimées à la surface des cellules épithéliales intestinales sous l'effet d'un stress thermique (Groh et al., 1996) (Groh et al., 1998). Ces molécules de stress sont également exprimées au cours de la tumorigénèse dans les cellules tumorales humaines du sein, des ovaires, du poumon, des intestins, de la prostate, et de la vessie (Groh et al., 1999). Les molécules ULBP (UL 16 binding protein) sont exprimées par certaines cellules tumorales (Cosman et al., 2001). La molécule MICA, par supposition MICB (Bauer et al., 1999), mais aussi les ULBP (Cosman et

al., 2001) sont reconnues par les molécules activatrices NKG2D.

Les cellules NK surveillent particulièrement l'expression des molécules du CMH de classe I grâce aux molécules KIR, CD94/NKG2A et LIR. Les cellules saines expriment ubiquitairement les molécules HLA I qui donnent ainsi un signal négatif. Elles n'expriment normalement pas de molécules de stress qui pourraient fournir un signal positif. En revanche la perte (complète ou partielle) d'expression des molécules HLA I par les cellules tumorales, qui est un phénomène fréquent dans la tumorigénèse (Garrido et al., 1997), activera les cellules NK. L'activation des cellules NK pourra aussi participer à l'activation des DC favorisant leur production d'IL-12, et agissant ainsi sur la réponse adaptative (Mocikat et al., 2003).

Rôle de l'IFN γ et les cellules sécrétrices d'IFN γ

Les modèles murins ont permis beaucoup de travaux montrant le rôle de l'IFN γ dans la surveillance antitumorale. Des souris déficientes pour la voie de signalisation de l'IFN γ (déficientes soit pour le récepteur à l'IFN γ , soit pour STAT) développent plus de tumeurs spontanées et chimio-induites, suggérant donc que l'IFN γ joue un rôle primordial dans la surveillance antitumorale (Kaplan et al., 1998; Shankaran et al., 2001). Une des actions de l'IFN γ est d'inhiber la prolifération de certaines cellules tumorales et d'augmenter l'expression des molécules du CMH de classe I ce qui favorise la présentation des TAA (tumor associated Ag) aux lymphocytes T CD8+. D'autre part, l'IFN γ produit par les lymphocytes T CD4+ Th1 participe à l'activation des lymphocytes CD8+ cytotoxiques.

Les cellules sécrétrices d'IFN γ peuvent être de plusieurs types ; des lymphocytes T CD8+ activés, CD4+ Th1, NK T ou des cellules NK activées. Dans un modèle de mélanome murin, l'IFN γ sécrété précocément après injection de cellules tumorales provient des lymphocytes T $\gamma\delta$; il régule la sécrétion ultérieure d'IFN γ par les lymphocytes T $\alpha\beta$ recrutés (Gao et al., 2003). Comme les cellules NK, les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont capables de reconnaître des molécules de stress comme MICA et MICB et de lyser les cellules qui les expriment (Bauer et al., 1999) (Groh et al., 1998). Ils expriment également la molécule NKG2D (Verneris et al., 2004) (Raulet, 2003).

Plusieurs études (Street et al., 2001; Street et al., 2002), utilisant des souris déficientes pour la perforine, ont montré que la perforine était impliquée dans le rejet de cellules tumorales dans différents modèles (poumon et lymphome) et que ce rejet dépendait de la présence de la $\beta 2$ microglobuline, montrant l'implication du TCR et des molécules du CMH de classe I dans l'immunité antitumorale. Cependant, si les lymphocytes NKT et T $\gamma\delta$ étaient éliminés, les souris perdaient alors toute résistance aux cellules tumorales, du fait d'un déficit de sécrétion d'IFN γ . Les lymphocytes T $\gamma\delta$ joueraient donc un rôle dans la surveillance des tumeurs par leur sécrétion

d'IFN γ , non seulement dans les sites où elles constituent la majeure partie des lymphocytes T (tissu intestinal), mais également dans d'autres tissus, comme le sang ou le poumon, où elles sont en minorité.

3 Surveillance par le système adaptatif

Existence de lymphocytes T et B antitumoraux

Dans le thymus, les lymphocytes T subissent tout d'abord une sélection positive des thymocytes qui reconnaissent le CMH du soi, puis une sélection négative, selon l'affinité du récepteur pour le CMH/peptide. Si cette affinité est trop forte, les cellules entrent en apoptose (Starr et al., 2003) ; mais il est admis que des lymphocytes T ayant un TCR de faible affinité pour des Ag du soi puissent être générés. Les lymphocytes T antitumoraux pourront appartenir à cette dernière catégorie de lymphocytes autoréactifs, quand ils seront spécifiques d'autoantigènes exprimés préférentiellement par les cellules malignes.

La fréquence de lymphocytes T spécifiques d'un peptide de MAGE-3.A1 chez un donneur sain est estimée à $3/10^7$ parmi lymphocytes circulants (Coulie et al., 2002). Chez des sujets sains, les lymphocytes T CD8 dirigés contre des épitopes de Melan-A (Pittet et al., 1999) (Dunbar et al., 2000) sont de phénotype naïf (CD45RA+, CCR7+), alors que chez des patients porteurs d'un mélanome une partie de ces lymphocytes T ont un phénotype de lymphocytes T mémoires effecteurs (Lee et al., 1999). L'équipe de Roméro a montré que ces lymphocytes T antitumoraux étaient générés par le thymus en examinant le nombre des cercles d'excision et la longueur des télomères (Romero et al., 2002).

Quant aux lymphocytes B antitumoraux, ils sont vraisemblablement présents chez les sujets sains, bien que difficiles à mettre en évidence. En effet, l'absence d'anticorps (Ac) sériques dirigés contre des antigènes tumoraux ne signifie pas l'absence de cellules B, dont le BCR serait dirigé contre ces Ag. La production d'anticorps ne pouvant avoir lieu qu'en présence de l'Ag, seuls les patients dont les tumeurs expriment un Ag tumoral pourront développer des Ac et des CTL contre cet antigène (Jager et al., 2000c; Stockert et al., 1998). La détection d'Ac antitumoraux chez les patients confirme donc l'existence de lymphocytes B antitumoraux ; ces Ac antitumoraux peuvent être générés cours de traitements avec un vaccin peptidique (Jager et al., 2000a)

Le développement d'une réponse humorale suggère que des lymphocytes CD4+ ont été également sollicités, car ils sont indispensables pour activer la réponse des lymphocytes B. Effectivement, il existe aussi des lymphocytes CD4 qui reconnaissent des antigènes tumoraux (Jager et al., 2000b; Van Der Bruggen et al., 2002). Ces lymphocytes CD4 seraient un

instrument important dans l'activation efficace des CD8 et des lymphocytes B antitumoraux(Pardoll and Topalian, 1998).

Les Ag Associés aux Tumeurs (TAA)

Les apports de l'immunologie réverse

L'immunologie réverse, à partir des lymphocytes T et B antitumoraux, a permis d'identifier des Ag associés aux tumeurs (TAA). Elle consiste à utiliser des CTL activés et amplifiés pour cribler une banque protéique obtenue à partir d'ADNc de cellules tumorales et permet d'isoler les protéines immunogènes dont l'expression est spécifique aux cellules tumorales(Rosenberg, 1999; Van Der Bruggen et al., 2002; Van Pel et al., 1995). Malgré le faible pourcentage des patients qui produisent spontanément des anticorps, ils ont été également utilisés pour cribler et identifier des Ag tumoraux dans une banque d'expression (Scanlan et al., 2002; Stockert et al., 1998). C'est la méthode dite SEREX (serological analysis of recombinant cDNA expression librairie) (Sahin et al., 1997). Après avoir identifié des TAA, il est possible de définir des peptides tumoraux de longueur et de séquence optimales pour une fixation sur des molécules du CMH (Romero et al., 2002). De très nombreux peptides ont été ainsi définis se liant à différentes molécules HLA de classe I et de classe II(Van Der Bruggen et al., 2002).

Les différentes familles d'antigènes tumoraux

De nombreuses familles d'antigènes tumoraux ont pu être déterminées, classées en plusieurs catégories : (Rammensee et al., 2002)

Type d'Ag	Exemple
Ag issus d'un gène contenant une mutation ponctuelle	CDK4
Ag obtenus par changement d'un cadre de lecture d'un gène normal	TGF βRII
Ag obtenus par une transcription anti-sens d'un gène normal	RU2AS
les protéines fusionnées produits de translocations chromosomiques	BCR-ABL
les protéines qui ont subi des modifications post-transcriptionnelles altérées	tyrosinase
les Ag sur-exprimés	Her2/neu, MUC, télomérase
les Ag non-protéiques	Gangliosides GD3
les Ag « cancer/testis »	MAGE, Melan
les Ag embryonnaires et exprimés par les cellules cancéreuses	CEA
les Ag oncogènes	ras
les protéines de gènes supresseurs de tumeurs	p57
les protéines virales	HPV16 E7

Tableau 4 : Diversité des TAA

Dans les lymphomes B, l'idiotype de l'immunoglobuline monoclonale exprimée par les

cellules B malignes représente un antigène tumoral assez étudié (Hsu et al., 1996; Timmerman et al., 2002).

Certains TAA sont particulièrement intéressants car ils sont partagés par plusieurs types de cancers, et peu exprimés par les tissus normaux. La télomérase en est le meilleur exemple (Vonderheide et al., 2004) ; en essai clinique de phase I, elle permettrait une activation de lymphocytes T anti-télomérase et pourrait donc servir d'Ag tumoral universel.

Les Ag MAGE sont certainement les mieux connus. Ces Ag sont exprimés par différents types de cancers (mélanome, carcinomes du poumon, de la vessie, du sein, de la prostate) à des fréquences différentes. Les Ag MAGE font partie de la famille des « cancer testis antigens ». Ils sont exprimés dans les tissus germinaux mâles, codés sur le chromosome X, et absents des autres tissus normaux de l'adulte (Scanlan et al., 2002). Cette grande famille d'Ag a une expression ectopique dans les cellules cancéreuses qui peut varier au cours de la maladie. Elle comprend d'autres Ag comme BAGE, GAGE, LAGE, SSX ou encore NY-ESO-1 (Coulie et al., 2002). NYESO-1, découvert par la méthode SEREX (Chen et al., 1997) dans le carcinome de l'oesophage, est exprimé également dans les mélanomes, les cancer du sein, ou de la prostate. Plusieurs peptides dérivés de NY-ESO-1 pouvant se fixer sur les molécules HLA-A2 ont été trouvés (Jager et al., 1998).

Des peptides NYESO-1 s'associant aux molécules HLA de classe II ont été également isolés, ils peuvent ainsi être reconnus par les lymphocytes CD4 (Jager et al., 2000b). C'est le cas pour d'autres TAA comme MAGE-3, pour lequel des peptides pouvant se fixer sur les molécules HLA de classe II ont été également définis (Zhang et al., 2003). Il est intéressant d'identifier des peptides qui peuvent activer des lymphocytes T CD4 et des CD8. En effet, charger des APC avec des peptides de classe I et II permettrait d'avoir l'aide des lymphocytes T CD4 qui vont participer à la prolifération des lymphocytes T CD8 en sécrétant des cytokines (Wang, 2002). D'autre part l'aide des lymphocytes CD4+ serait particulièrement importante dans la génération de lymphocytes CD8+ mémoire. Les lymphocytes CD4+ participent à leur génération par une activation via le CD40L mais aussi par d'autres mécanismes pas encore identifiés (Rocha and Tanchot, 2004). Les lymphocytes CD8+ activés en absence de lymphocytes CD4+ ne sont pas fonctionnels.

Ces quelques lignes non exhaustives montrent l'importance des travaux réalisés grâce à l'immunologie réverse, qui a défini de nombreux TAA et peptides antigéniques.

Malgré l'expression de TAA, les cellules tumorales ne sont pas capables d'activer des lymphocytes T elles-mêmes, car elles ne sont pas des cellules présentatrices d'antigènes efficaces. L'induction d'une réponse adaptative lymphocytaire suppose donc l'intervention d'APC capables d'activer les lymphocytes T en leur apportant les signaux nécessaires, décrits

dans la première partie de ce manuscrit(Hellstrom et al., 2001).

B. Mécanismes de destruction des cellules tumorales

Les cellules effectrices centrales dans l'élimination des cellules tumorales sont les cellules NK et les CTL. Elles ont deux voies possibles d'action : soit elles induisent l'apoptose par les récepteurs de mort, soit elles lysent par exocytose des molécules perforine/granzyme.

1 Adhérence et reconnaissance

Dans l'activation de la lyse par des cellules NK, comme des CTL, la première étape est l'adhérence grâce à des molécules comme CD2, LFA-1, ICAM(Vyas et al., 2002). La cellule cible et le lymphocyte sont alors en contact étroit au niveau de synapses immunologiques, ce qui favorisera la reconnaissance de la cible. Les CTL seront activés par une reconnaissance du TCR, ou de NKG2D, qui peut être également exprimé sur les CD8 (Groh et al., 2001). Pour les cellules NK, les étapes conduisant à la lyse intègrent les signaux des molécules activatrices et inhibitrices (précédemment décrites). Les granules contenant les molécules de lyse (perforine/granzymes) seront ensuite sécrétés dans cette synapse, au contact de la cellule cible (Bossi et al., 2002). Les molécules d'adhérence comme LFA-1, en reconnaissant ses ligands (ICAM-2, et 3) favorisent la libération de perforine (Perez et al., 2004).

2 Les récepteurs de mort

Il existe plusieurs couples récepteur/ligand impliqués dans l'apoptose ; Fas/Fas Ligand (ou CD95/ CD95L), DR3 (Dead receptor) /APO-3L, TNF-R1/TNF- α , DR4 et DR5/TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand). Ces récepteurs de mort se trimérisent une fois fixés à leur ligand, qu'ils reconnaissent par leur partie extra-cellulaire (Rossi and Gaidano, 2003). Leur queue cytoplasmique contient une séquence nommée domaine de mort qui peut recruter d'autres molécules adaptatrices (comme FADD, TRADD, RIP) qui peuvent à leur tour recruter la procaspase 8 pour former le DISC (death inducing signaling complex).

3 Perforine/granzyme

Les cellules effectrices CTL ou lymphocytes NK peuvent lyser par exocytose de granules contenant les molécules perforine et granzymes. La perforine forme des pores à la surface de la cellule qui permettent une entrée passive des granzymes B ou A, entraînant la perte de l'intégrité membranaire suivie d'une désintégration de la cellule (Trapani and Smyth, 2002). Les

granzymes B, une fois dans le cytoplasme de la cellule cible, vont cliver Bid une molécule pro-apoptotique qui va initier l'apoptose via la mitochondrie (Trapani and Smyth, 2002).

C. L'échappement

Les cellules tumorales peuvent donc exprimer des TAA susceptibles d'activer des lymphocytes antitumoraux. De nombreuses hypothèses sont émises pour expliquer l'inefficacité ou l'absence de réponse antitumorale observée chez les patients. Il est possible que les effecteurs du système immunitaire n'aient pas accès à certaines tumeurs, ou que les tumeurs ne soient pas identifiées comme représentant un danger, il s'agit alors d'une ignorance. D'autre part les lymphocytes T dirigés contre des TAA peuvent avoir été délétés ou anergisés dans le thymus ou en périphérie. Ce mécanisme de protection du soi contre l'auto-immunité est appelé la tolérance, et supprime les lymphocytes les plus réactifs. Les lymphocytes anergisés prolifèrent peu, et ne peuvent plus devenir effecteurs lors d'une activation ultérieure. Parallèlement à cette tolérance déjà mise en place par le système immunitaire, les cellules tumorales peuvent développer des mécanismes de résistance qui leur permettent de contourner les actions des cellules effectrices. C'est l'échappement, dont quelques aspects seront présentés.

1 Défaut de présentation des Ag

Pour que les CTL puissent lyser les cellules tumorales, il faut que les Ag soit présentés correctement par les APC et par les cellules tumorales également. Ces dernières, suite aux nombreuses altérations génétiques (mutations, délétions, translocations), peuvent développer des mécanismes qui empêchent cette présentation.

Délétion HLA

Il peut y avoir perte des molécules HLA par délétion haplotypique (Hiraki et al., 1999) ou par des mutations de la β 2-microglobuline qui ne peut plus s'associer normalement avec la chaîne lourde du CMH de classe I (Koopman et al., 2000). Cependant une perte totale des molécules HLA sensibiliserait les cellules à la lyse par les lymphocytes NK. En effet, ceux-ci ne recevraient plus de signaux inhibiteurs via les molécules inhibitrices. En revanche, la perte partielle de l'expression de certaines molécules HLA-ABC ou de certains allèles permet aux cellules tumorales d'échapper à la fois aux cellules NK, et aux lymphocytes T CD8+(Chen et al., 1989; Garrido et al., 1997).

Perte des molécules TAP

Les molécules TAP-1, TAP 2, LMP-2, et LMP-7, participent à l'apprêtement et au

chargement des peptides sur les molécules du CMH de classe I. Une étude chez la souris montre l'importance de ces différentes molécules dans le rejet tumoral. Des cellules tumorales qui n'expriment pas ces molécules ne sont pas rejetées car elles n'expriment pas non plus les molécules du CMH de classe I. En revanche après restauration de l'expression de ces quatre molécules, les cellules tumorales sont lysées(Zheng et al., 1998). Chez l'homme, lors de l'évolution de la maladie, les cellules de mélanomes peuvent perdre l'expression des Ag MART-1/Melan A suite à une diminution de l'expression de la molécule TAP-1(Maeurer et al., 1996).

Autres défauts

L'absence de présentation de peptides tumoraux peut venir du fait que la protéine n'est pas synthétisée. Par exemple, la perte d'expression des Ag Melan A/MART-1 par les cellules tumorales, phénomène appelé « Ag silencing », serait induite par un ou des facteurs solubles autocrines(Kurnick et al., 2001). L'absence de la présentation d'un peptide peut aussi être due à la façon dont un Ag est dégradé par le protéasome des cellules tumorales. La présentation du peptide MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉ a été étudiée sur des cellules de mélanome d'un patient HLA-A*0201. Le peptide n'est pas présenté spontanément, mais il peut être généré et chargé sur les molécules du CMH lorsque le protéasome est inhibé par la lactacystine(Valmori et al., 1999). Par ailleurs, un défaut de présentation peut provenir des APC, en effet, il semblerait que l'immunoprotéasome ne permette pas de fabriquer tous les peptides possibles(Morel et al., 2000), entraînant l'absence de présentation de certains peptides tumoraux.

2 Immuno-supression

Molécules materno-foetales

Pour inhiber les cellules du SI, les cellules tumorales expriment de nombreux types de molécules dont certaines sont impliquées dans la tolérance de la mère au fœtus. Par exemple, les molécules HLA-G sont exprimées par les cellules du trophoblaste(Le Bouteiller et al., 2003), et leur concentration sérique est augmentée chez des patients atteints de cancers(Rebmann et al., 2003; Sebti et al., 2003). HLA-G a été retrouvé dans des cancers de la vessie, du sein, du rein, du poumon, et dans les mélanomes, et les lymphomes B et T(Rouas-Freiss et al., 2003). Plusieurs isoformes des molécules HLA-G ont été identifiées. HLA-G1 et HLA-G2 protègent les cellules tumorales contre la lyse médiée par les cellules NK(Paul et al., 1998; Seliger et al., 2003). En effet HLA-G1 peut inhiber une activation induite par les molécules MIC, donnant un signal inhibiteur plus fort que le signal d'activation(Menier et al., 2002). Ces molécules peuvent aussi avoir un effet inhibiteur sur les lymphocytes T CD8 activés en augmentant l'expression de CD95 à leur surface(Fournel et al., 2000). La présence de HLA-G dans une culture mixte

lymphocytaire inhibe la prolifération(Lila et al., 2001)

Une autre molécule impliquée dans l'inhibition de la réponse cellulaire est l'enzyme indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), qui est exprimée dans le trophoblaste intra-villeux invasif(Honig et al., 2004) et qui peut inhiber la prolifération des lymphocytes(Kudo et al., 2004). Cette enzyme est exprimée par plusieurs types de tumeurs(Uytenhove et al., 2003) et peut inhiber la prolifération des lymphocytes T par déplétion du tryptophane du milieu. La synthèse d'IDO peut être augmentée en présence d'IFN γ .

Facteurs solubles

TGF- β

Plusieurs types de cytokines sont sécrétées au niveau des tumeurs, dont le TGF- β (Reome et al., 2004) (Derynck et al., 2001). Ainsi chez la souris, une tumeur très immunogène ne sera plus rejetée lorsqu'elle est transfectée pour produire du TGF- β (Torre-Amione et al., 1990). En effet, le TGF- β peut avoir un effet anti-inflammatoire, et inhibe la prolifération de différents types de cellules (Kulkarni et al., 1993) (Siegel and Massague, 2003). Le TGF- β 1 bloque la sécrétion d'IFN γ par les cellules NK, leur synthèse d'ADN, et diminue leur capacité de lyse(Bellone et al., 1995; Bellone et al., 1999). Il inhibe l'expression de molécules activatrices NKp30 et NKG2D(Castriconi et al., 2003). La différenciation des lymphocytes T naïfs chez la souris en lymphocytes Th2 est empêchée par une inhibition de l'expression de GATA-3 par le TGF- β (Gorelik et al., 2000). Le fonctionnement des APC est également affecté par le TGF- β : il inhibe la maturation induite par TNF- α , LPS et IL-1 des cellules de Langerhans dérivées de monocytes. Les LC en présence de TGF- β diminuent leur expression des molécules HLA-DR, n'augmentent pas celle de CD80, de CD86 ni de CD83(Geissmann et al., 1999).

IL-10, IL-6 et autres molécules solubles

De l'IL-10 a été retrouvée dans le sérum des patients porteurs d'un cancer à des concentrations supérieures à celles retrouvées chez des sujets sains(Galizia et al., 2002). Des monocytes exprimant faiblement HLA-DR ont été identifiés comme source potentielle d'IL-10 dans le cancer ovarien(Loercher et al., 1999). Cette cytokine a plusieurs effets négatifs sur la réponse immune. L'IL-10 serait responsable de l'augmentation d'expression de HLA-G dans les lymphomes cutanés(Urosevic et al., 2002). Elle affecte aussi la réponse adaptative : elle peut bloquer la production d'IL-2 et ainsi inhiber la prolifération des lymphocytes CD4⁺ humains(de Waal Malefyt et al., 1993). Des expériences chez la souris ont montré qu'en présence d'IL-10, les lymphocytes T diminuaient leur sécrétion d'IFN γ , et présentaient une cytotoxicité amoindrie. Cette cytokine peut aussi agir sur les APC qui, dans cette étude, exprimaient moins fortement CD86 et les molécules du CMH de classe II(Sharma et al., 1999). Chez des patients atteints de

myélome, l'IL-10 ou le TGF- β peuvent induire l'incapacité des DC à augmenter CD80 lors d'une activation (Brown et al., 2001). De plus, l'IL-10 est fortement impliquée dans la tolérance, en favorisant la génération de lymphocytes Treg ainsi que dans leur mode d'action (Gilliet and Liu, 2002).

L'IL-6 est également retrouvée dans le sérum de patients atteints d'un cancer (Galizia et al., 2002; Tartour et al., 1996). Dans le myélome, cette cytokine empêche la génération de DC, et diminue le nombre de cellules précurseurs des DC dans le sang (Ratta et al., 2002).

Les cellules tumorales peuvent également surexprimer et sécréter des gangliosides (des lipides absents des cellules normales), qui peuvent avoir différentes actions inhibitrices sur : l'activité de la phospholipase C γ (Draberova et al., 2003), l'activation et la prolifération des lymphocytes T (Buggins et al., 2001; McKallip et al., 1999), et les fonctions des APC (Caldwell et al., 2003). Ils diminuent l'expression des molécules de costimulation et inhibent la sécrétion d'IL-6, IL-12 et TNF- α par les DC.

Les cellules tumorales peuvent sécréter MICA dans le milieu. Leur interaction avec NKG2D a pour conséquence l'internalisation et dégradation de ce récepteur, donc une diminution de son expression sur les lymphocytes NK et CD8+ (Groh et al., 2002).

Recrutement d'autres cellules inhibitrices

De nombreuses chimiokines sont produites au niveau des tumeurs ; ces chimiokines permettent le recrutement de diverses cellules de l'immunité dont les fonctions peuvent parfois être favorables au développement de la tumeur. On retrouve CCL2 dans les cancers du sein, des ovaires, mélanomes, du poumon, de l'œsophage, et dans les glioblastomes, et CCL5 dans les cancers cervicaux, du sein, et les mélanomes. CCL2 attire particulièrement les monocytes, qui une fois dans la tumeur sécrètent à leur tour CCL2 assurant ainsi un auto-recrutement (Murdoch et al., 2004). Ces monocytes peuvent se différencier en m Φ . Dans plusieurs types de cancers, les m Φ infiltrant les tumeurs sont détectés dans les régions hypoxiques des tumeurs (Murdoch et al., 2004), leur présence est liée à un mauvais pronostic. En effet, par la sécrétion de VEGF, et de NO, ils favorisent la formation de vaisseaux qui viennent irriguer la tumeur (Pollard, 2004). Les macrophages sécrètent aussi des cytokines inhibitrices de la réponse immune comme IL-10 et TGF- β (Gordon, 2003).

Une étude sur le cancer ovarien a montré que les m Φ intratumoraux peuvent sécréter CCL22 qui attire dans la tumeur les lymphocytes Treg qui expriment CCR4 (Curiel et al., 2004b). Les cellules Treg infiltrants sont capables d'inhiber la prolifération de lymphocytes T antitumoraux, la synthèse d'IFN γ et d'IL-2 par les lymphocytes T effecteurs et diminuent leur cytotoxicité. Leur présence dans les tumeurs est associée, là encore, à un mauvais pronostic

(Curiel et al., 2004b).

Dans les tumeurs de l'ovaire et dans les mélanomes, la chimiokine SDF-1/CXCL12 est mise en évidence ; elle permettrait un recrutement des PDC dans ces tumeurs en l'absence d'inflammation(Curiel et al., 2004a; Vermi et al., 2003; Zou et al., 2001). Ex vivo, les PDC isolées des tumeurs de l'ovaire inhibent la prolifération de lymphocytes T antitumoraux(Zou et al., 2001), et pourraient exercer un effet angiogénique(Curiel et al., 2004a). Une corrélation entre la présence de PDC et un mauvais pronostic des patients a pu être établie dans les cancer du sein (Treilleux, I, Clin canc research, sous presse).

3 Résistance à la lyse

Adhérence

Pour exercer leur activité lytique, les CTL comme lymphocytes NK ont besoin des molécules d'adhérence précédemment citées qui permettent la mise en place de la synapse immunologique. Les cellules tumorales peuvent échapper à la lyse en empêchant ces premières étapes d'adhérence. Dans de nombreux cas, les cellules tumorales sécrètent MUC1, une glycoprotéine qui entoure les cellules tumorales. Une étude dans le mélanome a montré que les cellules malignes recouvertes de MUC1 adhéraient moins aux cellules effectrices, même si celles-ci exprimaient LFA-3 (qui interagit avec CD2), et ICAM-1 (qui interagit avec LFA-1) (van de Wiel-van Kemenade et al., 1993). Une étude plus récente dans le cancer colorectal montre que la concentration de la molécule d'adhérence ICAM-1 dans le serum des patients étaient plus élevée que celle des sujets sains. Ces molécules ICAM-1 solubles peuvent bloquer la formation de conjugués et la lyse des cellules tumorales (Sanchez-Rovira et al., 1998).

Résistance à l'apoptose

Une des voies de maintien de l'homéostasie du système immunitaire est l'apoptose induite par les récepteurs de mort. Ces mécanismes interviennent dans la sélection des lymphocytes T et des B, et dans l'arrêt de la réponse immunitaire. L'apoptose intervient aussi comme mécanisme effecteur de mort dans la cytotoxicité à médiation cellulaire. Pour des cellules tumorales, résister à l'apoptose signifiera donc échapper aux contrôles exercés par les effecteurs du maintien de l'homéostasie et de l'immunité antitumorale.

Les cellules cancéreuses peuvent développer un blocage de l'apoptose au niveau du récepteur. Un récepteur tronqué de sa partie intracytoplasmique peut perdre son domaine de mort et ne plus recruter les molécules adaptatrices (Cascino et al., 1996). Les cellules de mélanome peuvent exprimer FLIP_L qui inhibe la formation du DISC (Irmeler et al., 1997). L'apoptose peut être aussi bloquée plus en aval. Une mutation peut entraîner une surexpression des molécules anti-

apoptotiques, Bcl-2 par exemple, et rendre les cellules résistantes à la mort(Findley et al., 1997). De même, une diminution de l'expression de molécules pro-apoptotiques, comme Bax,(LeBlanc et al., 2002) bloque l'apoptose via la voie TRAIL. Les cellules tumorales peuvent par ailleurs devenir résistantes à l'apoptose induite par les récepteurs de mort et la voie perforine/granzyme(Otten et al., 2004). Un des mécanisme de résistance à la lyse par granzyme B est la surexpression de serpins qui inhibent leur action(Bots et al., 2004). D'autre part, l'environnement tumoral peut protéger les cellules tumorales contre l'apoptose, la matrice extracellulaire pouvant jouer un rôle anti-apoptotique dans le cancer du poumon(Sethi et al., 1999).

Les cellules tumorales se développent donc grâce à de nombreux mécanismes d'échappement aux cellules de l'immunité qui sont présentes et encore fonctionnelles. L'immunothérapie a pour stratégie d'utiliser les cellules potentiellement effectrices pour éradiquer les cellules tumorales. Compte tenu des propriétés des APC, elles semblent particulièrement intéressantes dans l'activation d'une réponse anticancéreuse. Nous avons étudié le cas des lymphomes B non Hogdkiniens (LNHB).

3^{ème} partie : L'immunothérapie dans le LNHB

A Les lymphomes

Les lymphomes non Hodgkiniens sont des hémopathies malignes qui se développent à partir de lymphocytes T ou B ou NK, bloqués à un stade donné de leur maturation. L'objet de notre étude est le lymphome B. Les LNHB représentent 3,6% de l'ensemble des cancers, et se situent au 6^{ème} rang dans la fréquence des cancers chez l'homme et la femme. L'incidence des lymphomes est en constante progression ; pour les LNHB, de 6,3 cas pour 100 000 habitants en France, en 1980, on passe à 13,3 cas pour 100 000 habitants en 2000 (Réseau français des registres du cancer, INSERM, Institut veille sanitaire). L'augmentation relevée est peut-être due en partie aux meilleures techniques de diagnostic.

1 Les différents types de lymphomes B

Les LNHB sont des hémopathies hétérogènes, de nombreux types de lymphomes ont été décrits, et compte tenu de la diversité des types histologiques et de la complexité des pathologies, plusieurs classifications ont été utilisées à travers le monde. La classification REAL publiée en 1994 (Harris et al., 1994) par un groupe d'experts a proposé une classification basée sur des critères histologiques, morphologiques, immunologiques, cytogénétiques, de biologie moléculaire et clinique, en essayant de définir les différentes entités de lymphomes en fonction de leur équivalent normal. La classification actuellement utilisée en clinique est celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) élaborée par plusieurs spécialistes de plusieurs pays (WHO classification Tumors of hemathopoietic and lymphoid tissues 2001). Elle reprend la plupart des critères définis par la REAL.

Compte tenu de la complexité de la pathologie, il est difficile de présenter les différents types de lymphomes d'une façon complète, et nous ne donnerons que quelques caractéristiques utilisées dans le diagnostic (tableau 5). Nous avons choisi la classification de l'OMS/WHO

qui distingue les lymphomes provenant de cellules précurseurs de ceux provenant des cellules B plus matures.

Tableau 5 : Caractéristiques des différents types de lymphomes

Modifié d'après (Gaulard, 2000) IgS : Ig de surface, IgC : Ig cytoplasmique, t() : translocation

2 Un paradoxe

Les lymphomes B se développent aux dépens de lymphocytes B, qui sont des cellules capables d'exercer des fonctions APC. En effet, les lymphocytes B normaux, qui capturent les Ag grâce à leur BCR, sont ensuite capables de les apprêter et de les présenter en association avec les molécules du CMH de classe II aux lymphocytes CD4+. De plus ils expriment comme toutes les cellules de l'organisme les molécules du CMH de classe I. Les travaux précédents du laboratoire ont montré que les cellules B de lymphomes exprimaient pour la plupart des molécules d'adhérence (Jacob et al., 1999) et de costimulation (Chaperot et al., 1999b) nécessaires à l'établissement de la synapse immunologique. De plus, nous avons montré que les cellules tumorales pouvaient activer la prolifération de lymphocytes T allogéniques (Plumas et al., 1995) et autologues issus des lymphocytes T infiltrant la tumeur (Chaperot et al., 1999a) ou du sang circulant (Chaperot et al., 2002). Les CTL ainsi générés sont fonctionnels et sont capables de lyser les cellules tumorales par un mécanisme dépendant de la perforine et des granzymes.

Ces résultats préliminaires montrent donc qu'il est possible de générer *in vitro* une réponse lymphocytaire T CD8+ efficace à partir des lymphocytes autologues qui n'ont pas été anergisés, ni déplétés, et que les cellules tumorales sont sensibles à la lyse par perforine/granzymes. Cependant les tumeurs parviennent à se développer, soit par ignorance ou tolérance du système immunitaire, soit par diverses mutations qui leur ont permis d'échapper à l'immunosurveillance. Nos travaux auront pour objectif de rétablir une réponse CTL capable d'éradiquer les cellules tumorales.

B. Mécanismes d'échappement dans les LNHB

1 L'adhérence

Les lymphomes ont développé des moyens de résister à la lyse notamment en empêchant la formation de conjugués entre effecteur et cible. L'expression des molécules d'adhérence CD54 et CD58 est hétérogène dans les différents LNHB. La molécule clé dans la formation de conjugués entre des lymphocytes activés et des B tumoraux semble être CD54. La diminution de l'expression de CD54 dans certains lymphomes serait un moyen d'échappement à la lyse(Chaperot et al., 1997). Ce mécanisme est particulièrement bien décrit dans le cas des lymphomes de Burkitt pour lesquels le virus d'Epstein Barr provoque une diminution de l'expression des molécules d'adhérence(Gregory et al., 1988).

2 Résistance à la mort cellulaire

En plus de la perte d'adhérence décrite pour certains types de lymphomes, les cellules tumorales de LNHB peuvent également résister à l'apoptose. D'autres travaux du laboratoire ont montré que les cellules de lymphomes B sont résistantes à l'apoptose médiée par Fas (CD95) (Plumas et al., 1998) mécanisme central dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire. Le récepteur de mort CD95 est exprimé sur les cellules de lymphomes B, mais n'entraîne pas l'apoptose. Les molécules de la famille de Bcl-2 sont exprimées par les LNHB (Xerri et al., 1997), et la résistance pourrait venir de l'expression constitutive de la molécule c-FLIP qui inhibe la formation du DISC dans certaines lignées(Irisarri et al., 2000). Dans les tumeurs primaires, le DISC ne se forme pas pour des raisons indépendantes de l'expression de c-FLIP qui restent à identifier(Lajmanovich et al., 2004). Un autre mécanisme d'inhibition de la mort cellulaire implique l'expression de la serpin (protease inhibitor 9), qui empêche l'action des granzymes B dans certains types de lymphomes(Bladergroen et al., 2002).

3 Les cytokines

L'IL-10 et L'IL-6 sont des facteurs de croissance pour les lymphocytes B, tandis que le TGF- β inhibe leur croissance. Dans les LNHB, la production d'IL-10 semble régulée par TIMP (tissue inhibitor of metalloprotein); l'expression de ces deux molécules est particulièrement augmentée dans les lymphomes de haut grade, plus agressifs(Guedez et al., 2001). Dans certains lymphomes CD5+, la molécule CD5 induit une production d'IL-10 qui permet aux cellules tumorales de résister à l'apoptose et favorise leur survie(Gary-Gouy et al., 2002). Dans les myélomes multiples, l'IL-6 est sécrétée par les lymphocytes B tumoraux en plus grandes quantités que par les cellules normales(Szcepek et al., 2001). De plus dans la moelle osseuse, les cellules malignes amplifieraient la sécrétion d'IL-6 par les cellules stromales(Vincent and Mechti, 2004). La voie de prolifération des cellules B tumorales est donc favorisée tandis que la voie de régulation négative par le TGF- β est réprimée. Le récepteur pour le TGF- β , inhibiteur de la prolifération des lymphocytes B, est souvent sous-exprimé dans les lymphomes B(Ho et al., 2003). L'infection par le virus Epstein Barr peut favoriser l'incapacité à répondre au TGF- β (Inman and Allday, 2000).

D'autres mécanismes présentés dans le paragraphe de l'échappement des tumeurs pourraient aussi favoriser le développement de cette pathologie.

C. Immunostratégies utilisées dans le lymphome

Le pronostic des LNHB a été largement amélioré ces dernières années par l'utilisation d'anticorps ciblant le CD20 exprimé par les cellules tumorales. Cependant, si la survie des patients a été améliorée par l'utilisation de cet Ac, il ne permet pas d'obtenir de guérison. Il est envisageable d'utiliser des stratégies de thérapie cellulaire active ou passive afin d'induire des réponses plus durables. Des essais cliniques de vaccinations avec l'idiotype, seul ou avec des DC, ont été réalisés dans les lymphomes B. Ces essais restent cependant rares, en partie du fait de la contrainte liée à la production de l'idiotype.

1 Rituximab

Le Rituximab est un Ac chimérique spécifique du CD20 utilisé en clinique. C'est une IgG dont les parties variables sont murines et les parties constantes humaines. Largement utilisé dans le traitement des LNHB(Ghielmini et al., 2004; Maloney et al., 1997), il est directement injecté aux patients et permet d'améliorer la survie des malades. Plusieurs mécanismes d'action de cette thérapie sont possibles (Smith, 2003), l'importance de chaque mécanisme dans l'éradication des tumeurs reste à établir. Nous avons examiné l'efficacité de quelques uns de ces

mécanismes dans l'élimination des cellules tumorales. Le Rituximab favorise une phagocytose importante des cellules tumorales opsonisées par les macrophages, et également une lyse par les cellules NK. En revanche la lyse par le complément est moins systématique et varie selon le niveau d'expression du CD20 et des molécules inhibitrices ((Manches et al., 2003) en annexe). Notre hypothèse est qu'in vivo les débris des cellules tumorales lysées peuvent être prises en charge par les APC, qui les présenteront aux lymphocytes T, générant une immunité à long terme.

2 Vaccination avec l'Idiotype

L'idiotype représente un antigène tumoral spécifiquement exprimé par le clone B malin, situé dans la région variable des IgG. Malgré les contraintes que son utilisation implique, l'idiotype a été utilisé dans des essais cliniques de vaccination (Bendandi, 2000; Hsu et al., 1996). Les épitopes reconnus par les lymphocytes T CD4 et CD8, qui diffèrent vraisemblablement d'un patient à l'autre, sont des peptides localisés dans les régions hypervariables des Ig (Baskar et al., 2004). Les études précliniques dans des modèles murins ont montré qu'une réponse humorale était induite après injection de la protéine (Kaminski et al., 1987). Puis les premiers essais cliniques de vaccination par injection de l'idiotype ont montré l'induction d'une réponse cytotoxique en quelques mois accompagnée d'une régression de la taille des tumeurs ou d'une stabilisation de la maladie chez des patients avec des LNHB de stade III ou IV (Nelson et al., 1996). Une autre étude, confirmant la corrélation entre l'induction d'une réponse immune et un meilleur pronostic, montre qu'une telle vaccination permet une amélioration de la survie des patients sur un temps plus long (Hsu et al., 1997). Les effets secondaires de ce type de vaccination semblent peu importants. Afin d'améliorer l'efficacité de la vaccination avec l'idiotype, il a été proposé d'y associer des cellules dendritiques, qui pourraient présenter l'Ag aux lymphocytes T. Plusieurs modes de vaccination ont dès lors été envisagés : (i) mobiliser in vivo les APC du patient en utilisant du GM-CSF (Bendandi, 2000) (ii) générer les APC ex vivo pour les charger avec l'Ag et les réinjecter. L'utilisation de cellules dendritiques pulsées avec l'idiotype a donné des résultats préliminaires encourageants que nous développerons plus loin (Hsu et al., 1996; Timmerman et al., 2002).

Une des contraintes de ces protocoles utilisant l'idiotype est la nécessité de générer un Ag différent pour chaque patient. Il serait donc intéressant d'envisager une autre source d'Ag.

D. Utilisation de DC en immunothérapie

Le but principal recherché dans l'utilisation des APC ou de la vaccination avec des

peptides est l'activation des lymphocytes CD8 effecteurs capables de migrer aux sites tumoraux pour détruire les cellules malignes. En effet, des essais cliniques d'injection de CTL ont montré l'efficacité de ces effecteurs. Les CTL antitumoraux injectés dans l'organisme sont capables de lyser les cellules malignes et induisent des régressions tumorales (Dudley et al., 2002). Dans cette étude, les CTL ont été activés ex vivo ; il est aussi envisageable de les activer in vivo en utilisant une stratégie vaccinale basée sur l'injection d'APC pulsées avec des Ag tumoraux. Dès lors plusieurs questions se posent : - Quelle APC utiliser pour générer une réponse T antitumorale in vivo : des m Φ ou des DC (myéloïdes ou plasmacytoïdes)? Comment générer ces APC ? Quel doit être leur stade de maturation ? Sous quelle forme délivrer les antigènes pour qu'ils soient efficacement présentés par les APC ? Nous aborderons certaines de ces questions dans nos travaux.

La forme sous laquelle l'Ag sera délivré, ainsi que la maturation des APC seront déterminantes dans l'orientation de la réponse T générée. Les Ag doivent être correctement capturés et apprêtés, et il faut activer les APC de sorte qu'elles produisent les signaux (cytokines, molécules de costimulation) qui induiront une réponse de type Th1 et des CTL. Les mécanismes conduisant à cette activation ne sont pas encore entièrement connus et semblent délicats à maîtriser. En effet, une activation trop forte des effecteurs peut induire l'AICD (Activation-Induced Cell Death), si elle est trop faible, cette activation peut induire des lymphocytes Treg, plutôt que des lymphocytes T effecteurs. L'utilisation de peptides pour la vaccination est une piste intéressante. Leur disponibilité et la facilité de leur utilisation ont permis rapidement leur utilisation en clinique dans les cancers pour lesquels des Ag tumoraux partagés ont été identifiés. La plupart des protocoles de vaccination avec des peptides concernent le mélanome. A côté des stratégies utilisant des peptides, qui seront restreintes aux tumeurs pour lesquelles des Ag sont connus, il est envisageable d'utiliser les cellules tumorales entières comme source d'Ag. En sachant que les cellules entières pourront fournir des signaux soit inhibiteurs soit activateurs, il faudra alors ajouter un signal supplémentaire fort de maturation des APC pour activer une réponse T efficace, et juguler un éventuel effet inhibiteur. C'est l'intégration des signaux reçus qui va permettre l'expression par les APC des molécules qui permettront l'activation des lymphocytes T.

1 Utilisation de peptides

L'utilisation de peptides est assez fréquente dans les essais cliniques de vaccination antitumorale (Figdor et al., 2004). Dans certains types de protocoles, les peptides sont injectés directement chez le patient avec éventuellement une mobilisation des DC par une injection de

GM-CSF (Disis et al., 2002; Slingluff et al., 2003). Dans d'autres cas, ils seront utilisés pour pulser des DC générées ex vivo, le plus souvent générées à partir de monocytes. La maturation des DC pulsées ex vivo avec ces peptides est induite avec des cytokines ou des adjuvants. Un Ag comme MAGE, partagé par plusieurs types de cancers, peut être utilisé dans le traitement du mélanome, mais aussi dans celui du carcinome gastrointestinal (Sadanaga et al., 2001).

Les différents types de peptides

Grâce aux technologies de l'immunologie réverse, de nombreux peptides tumoraux s'associant à différentes molécules HLA ont été identifiés, nous les avons décrits précédemment. Afin d'améliorer l'efficacité de la vaccination peptidique, des modifications de ces peptides sont proposées, et des peptides hétéroclitiques sont synthétisés à partir d'un peptide « sauvage » peu immunogène. En effet, l'immunogénicité d'un peptide dépendrait non seulement de son affinité mais également de sa constante de dissociation d'avec la molécule HLA (van der Burg et al., 1996). Les peptides hétéroclitiques activent plus efficacement les lymphocytes T (England et al., 1995), et induisent une cross-réactivité avec le peptide normal. Le peptide hétéroclitique permet un signal 1 fort nécessaire à l'activation des lymphocytes T qui une fois activés peuvent lyser les cellules qui présentent le peptide moins immunogène (Dyall et al., 1998; Scardino et al., 2002). Des essais précliniques montrent qu'un peptide hétéroclitique peut générer des clones T qui reconnaissent le complexe peptide-CMH avec des affinités différentes. Les lymphocytes de forte avidité lyseront les cellules tumorales qui expriment le peptide normal (Dutoit et al., 2001).

Les problèmes liés à l'utilisation de peptides

La vaccination à l'aide peptides présente des désavantages. Les complexes HLA/peptide ne sont pas très stables sur les APC, et ont une faible durée de vie (Amoscato et al., 1998). Or les lymphocytes T naïfs nécessiteraient une activation d'environ 20 heures pour proliférer (Iezzi et al., 1998). De plus la durée de présentation des peptides aux lymphocytes conditionne la génération de lymphocytes T mémoires ou effecteurs qui n'auront pas les mêmes capacités de migration ni de lyse (Iezzi et al., 2001). Ce problème pourrait être résolu par l'utilisation de CPP (Cell Penetrating Peptides) qui permettraient une présentation d'au moins 24h par les DC (Wang and Wang, 2002). Par ailleurs, l'utilisation de peptides pour la vaccination présente l'inconvénient de cibler seulement quelques Ag qui peuvent disparaître au cours de l'évolution de la pathologie (Kurnick et al., 2001). Les cellules tumorales échappent alors aux CTL.

2 Utilisation de cellules entières

L'utilisation d'APC chargées avec des cellules tumorales entières permettrait à la fois la présentation de tous les Ag contenus dans cellules malignes, et une présentation d'une durée plus

longue sur les APC. Théoriquement la réponse antitumorale devrait être alors plus efficace, mais d'autres questions sont alors soulevées. En effet, pour induire la capture d'Ag provenant de cellules entières par les DC, les cellules tumorales doivent être préparées. Les cellules sont généralement soit induites en apoptose, soit en nécrose, soit opsonisées, avec des conséquences différentes pour la réponse immune qui sera induite. Il est difficile de définir quel mode de préparation sera le plus efficace en se basant sur les données de la littérature, qui décrivent des résultats parfois très divergents.

Différences entre cellules apoptotiques et cellules nécrotiques

Une des premières étapes de l'apoptose est la perte d'asymétrie de la membrane plasmique, avec une externalisation des phosphatidyl-sérines (PS) par la cellule qui garde son intégrité membranaire, suivie d'une fragmentation de la cellule en corps apoptotiques. On pense que dans l'organisme, les cellules apoptotiques sont rapidement phagocytées avant la nécrose secondaire (apoptose tardive), où les cellules perdent leur intégrité membranaire laissant échapper leur contenu cytoplasmique (Ren and Savill, 1998). Les cellules nécrotiques primaires ont des caractéristiques différentes des cellules apoptotiques. Elles grossissent, sans condensation de l'ADN, puis éclatent en libérant leur cytoplasme dans le milieu. Contrairement à l'apoptose, les caspases ne sont pas clivées dans la nécrose (Denecker et al., 2001).

L'effet des deux types de cellules est différent sur l'activation du système immunitaire (Albert, 2004). Il est admis que les cellules nécrotiques induisent une réaction inflammatoire, tandis que les cellules apoptotiques seraient plutôt anti-inflammatoires. Ces deux phénomènes sont donc perçus soit comme un danger contre lequel il faut réagir (la nécrose), soit comme une fausse alerte qu'il faut étouffer (l'apoptose). Une question reste en suspens : les cellules en nécrose secondaire, ou apoptose tardive doivent-elles être considérées comme des cellules nécrotiques ou apoptotiques ?

L'opsonisation des cellules nécrotiques et apoptotiques

Les cellules nécrotiques et apoptotiques peuvent être opsonisées par des opsonines sériques qui faciliteront leur élimination en faisant le lien entre celles-ci et les phagocytes (Roos et al., 2004; Verbovetski et al., 2002). La molécule C1q joue un rôle important dans l'élimination des cellules apoptotiques. Ainsi, les PBL et les PMN en apoptose précoce fixent faiblement C1q et C5, alors qu'en nécrose, ou en apoptose secondaire, ils fixent rapidement C3 et C4, différemment selon le type cellulaire (Gaipl et al., 2001). De même la Mannose-Binding Lectin (MBL) se fixe préférentiellement aux cellules nécrotiques et aux cellules en apoptose tardive facilitant leur phagocytose par les macrophages (Nauta et al., 2003). D'autres molécules opsonisent les cellules mortes et favorisent leur reconnaissance par les phagocytes (Lauber et al., 2004; Roos et al., 2004). Par exemple, MGF-E-8 (milk fat globule-EGF-factor 8), sécrété par les

m Φ , permet la liaison des phospholipides des cellules apoptotiques aux intégrines $\alpha\beta3$ exprimées à leur surface, induisant ainsi leur phagocytose (Hanayama et al., 2002). Les protéines surfactantes A et D peuvent également recouvrir les cellules apoptotiques ou nécrotiques (Gardai et al., 2003). Selon que l'on s'adresse à de la nécrose ou de l'apoptose, les opsonines mises en jeu pourront être différentes, modulant ainsi la capture des Ag et la qualité de la réponse induite.

Reconnaissance et endocytose des cellules nécrotiques et apoptotiques

Les cellules mortes peuvent être endocytées par les m Φ et les DC via divers récepteurs. Les récepteurs impliqués dans la fixation des cellules nécrotiques et apoptotiques sur les APC pourraient être différents ; une étude sur des cellules murines montre que des cellules nécrotiques (obtenues par chauffage) n'empêchent pas la fixation de cellules apoptotiques sur les macrophages. Ces cellules nécrotiques exprimeraient donc à leur surface des molécules spécifiques permettant leur identification par les phagocytes (Cocco and Ucker, 2001). Ces PS permettent la reconnaissance des cellules nécrotiques et apoptotiques et leur endocytose, par macropinocytose (Hoffmann et al., 2001a). Des molécules, comme CD14 (Gregory, 2000), CD36, phosphatidylsérines récepteur (PSR) (Hoffmann et al., 2001a), les SR A, LOX-1 (lectin-like oxidized LDL receptor-1), CD68 et le récepteur tyrosine kinase MER (Fadok and Chimini, 2001; Henson et al., 2001; Scott et al., 2001), sont impliquées dans la capture de cellules apoptotiques. CD36, $\alpha\beta3$ seraient plus impliqués pour leur endocytose par les macrophages (Fadok et al., 1998b), alors que les DC utiliseraient plutôt $\alpha\beta5$ (Albert et al., 2000; Albert et al., 1998) ou encore le PSR (Fadok et al., 2000). CD91, via la calréticuline, induit également la capture de cellules apoptotiques recouvertes de surfactant, de MBL ou de C1q (Gardai et al., 2003; Ogden et al., 2001; Vandivier et al., 2002). Tous les récepteurs pouvant être impliqués ne sont pas cités.

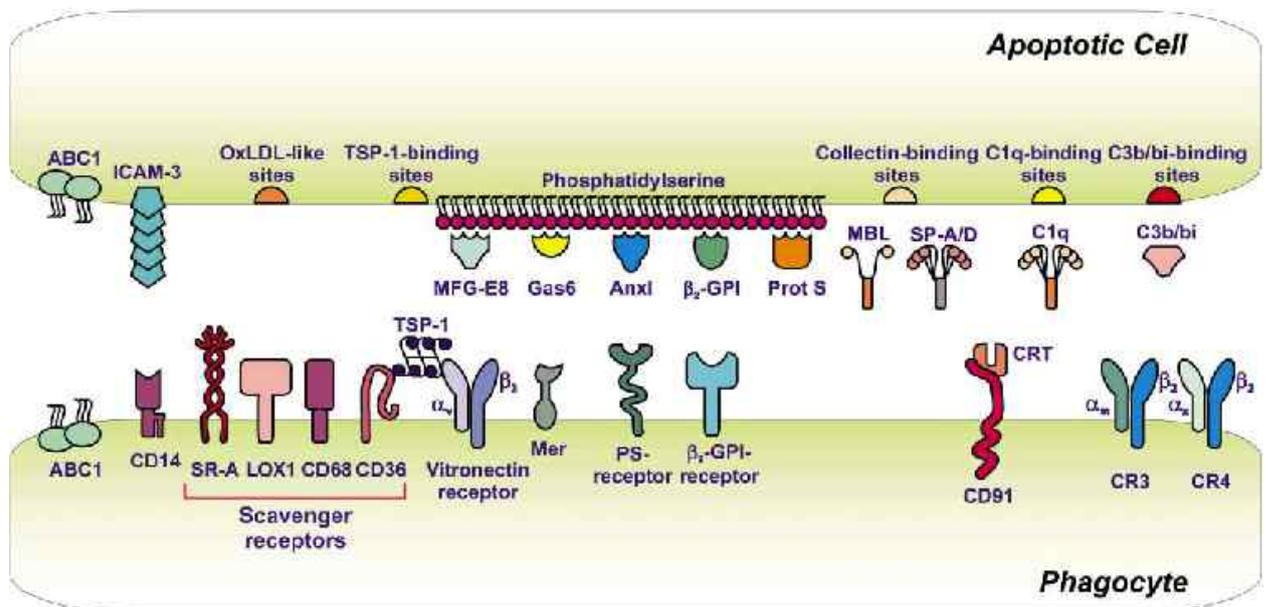


Figure 8 : Molécules impliquées dans la reconnaissance des cellules apoptotiques.

Les cellules apoptotiques et aussi nécrotiques peuvent être opsonisées par de nombreuses molécules sériques. Les récepteurs à ces différentes molécules entrent alors en jeu dans la reconnaissance et la capture de ces cellules mortes.

Les molécules libérées par les cellules apoptotiques et nécrotiques

Les cellules contiennent dans leur cytoplasme des molécules qui peuvent jouer le rôle d'adjuvants endogènes. Ces molécules seront différemment libérées dans le milieu extracellulaire selon que la cellule meurt par nécrose ou apoptose. Les cellules apoptotiques condensent leur ADN grâce à des molécules comme HMGB-1 (High Mobility Group 1 Box 1 protein). De ce fait, lorsque les cellules en nécrose secondaire perdent leur intégrité membranaire, HMGB n'est pas relâchée dans le milieu (Scaffidi et al., 2002). Or HMGB, libérée lors de la nécrose, est impliquée dans la réponse inflammatoire. En fixant son récepteur RAGE (Receptor for Advanced Glycation End product) elle active la sécrétion de cytokines inflammatoires (Andersson et al., 2000) et joue un rôle important dans la migration des monocytes (Rouhiainen et al., 2004). Les cellules nécrotiques libèrent également des Heat Shock Proteins (HSP) (Basu et al., 2000). De plus, les cellules lors d'un stress (thermique ou chimique) dégradent leur ADN et synthétisent de l'acide urique qui peut être libéré par les cellules nécrotiques, mais pas par les cellules apoptotiques qui conservent leur intégrité membranaire (Shi et al., 2003). Le récepteur à cette molécule n'est pas connu, mais il représente un adjuvant endogène puissant.

Les lysats

Plutôt que des cellules entières, certains préfèrent utiliser des lysats cellulaires, le plus souvent fabriqués par la succession de plusieurs cycles de congélation-décongélation. Les cellules éclatent rapidement, en libérant leur cytoplasme. La suspension cellulaire est parfois

filtrée après la lyse, pour enlever les membranes (Mannering et al., 1997; Sauter et al., 2000). Les lysats préparés à partir de cellules vivantes pourraient contenir les protéines HMGB-1 (Scaffidi et al., 2002) et des HSP (Basu et al., 2000; Somersan et al., 2001), mais pas d'acide urique (Shi et al., 2003). Ils contiennent donc potentiellement des protéines qui peuvent faire maturer les DC et induire une réaction inflammatoire. Les protéines contenues dans les lysats sont vraisemblablement internalisées par pinocytose, qui peut faire intervenir des récepteurs sur les APC. Ainsi, CD91 est un récepteur pour les HSP gp96, HSP 90 et 70 chez la souris (Basu et al., 2001). Exprimé sur les m Φ humains, CD91 leur permet d'initier la macropinocytose et favorise donc l'absorption de phase liquide et d'Ag solubles (Ogden et al., 2001).

Les cellules opsonisées par les Ac

L'opsonisation par un Ac permet une meilleure phagocytose des cellules. La partie constante des IgG est reconnue par les récepteurs Fc des APC, en particulier CD64 et CD32. La phagocytose des cellules se fait alors grâce à un mécanisme "zipper". Les cellules opsonisées par des Ac pourraient également activer le complément (Manches et al., 2003), qui pourrait jouer un rôle d'opsonine favorisant la capture de ces cellules. Lorsque des cellules tumorales sont en apoptose et opsonisées, les récepteurs impliqués dans leur endocytose semblent être plutôt les récepteurs spécifiques des cellules apoptotiques (Selenko et al., 2001).

3 Activation et présentation par les APC

Les molécules libérées par les cellules apoptotiques, nécrotiques, ou opsonisées, ainsi que les récepteurs impliqués dans l'endocytose de ces cellules moduleront la réponse immune en agissant sur les APC.

Effets des cellules apoptotiques

Les cellules apoptotiques ont plutôt un effet inhibiteur de la réponse immune. Les PS pourraient inhiber la maturation des DC induite par le LPS : les PS bloquent l'expression de CD83, des molécules de costimulation, des molécules du CMH, ainsi que la sécrétion d'IL-12 (Chen et al., 2004b). La phagocytose de cellules apoptotiques par des m Φ induit la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires comme TGF- β , PGE₂, et inhibe la production d'IL-8, IL-1 β , et TNF- α (Fadok et al., 1998a; Freire-de-Lima et al., 2000). Les PS semblent particulièrement déterminantes dans la production de TGF- β (Huynh et al., 2002). De plus, l'interaction des cellules apoptotiques avec CD36 (un récepteur des PS) semble augmenter la production d'IL-10 par les monocytes (Voll et al., 1997). Ces cytokines auront un effet inhibiteur sur la réponse immune.

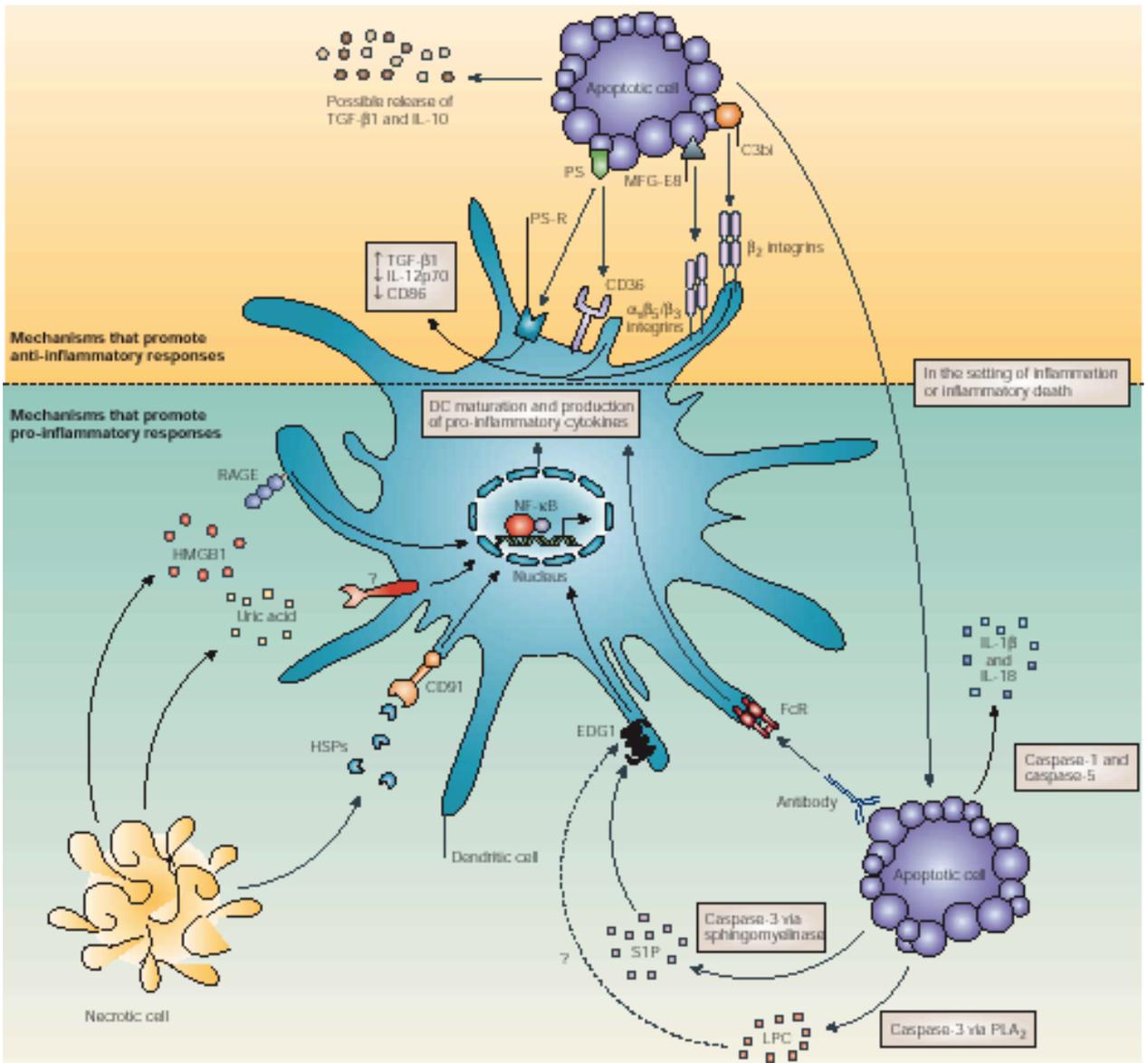


Figure 9 : Modulation de la réponse immune par les molécules libérées par les cellules endommagées

De (Albert, 2004). Les cellules nécrotiques et apoptotiques expriment des molécules différentes ; elles sont soit libérées dans le milieu (par exemple HMGB, l'acide urique) soit exprimées à la surface des cellules (les PS par exemple). Certaines de ces molécules favorisent une réponse pro-inflammatoire, d'autres une réponse anti-inflammatoire. La reconnaissance par les récepteurs permet la transduction de signaux qui aboutissent à l'activation de la DC, la sécrétion de certaines chimiokines et cytokines, et l'expression de certaines molécules de costimulation.

Effets des cellules nécrotiques

Les molécules libérées par les cellules nécrotiques ont plutôt un effet activateur. Certaines données suggèrent que les DC ayant capturé des cellules nécrotiques sont plus aptes à activer la réponse immune (Sauter et al., 2000) que les DC qui ont endocyté des cellules apoptotiques. L'acide urique libéré par les cellules nécrotiques active les moDC qui augmentent l'expression de CD80 et CD86 (Shi et al., 2003). HMGB interagit avec RAGE, et a également un effet activateur sur les mΦ via les TLR 2 et 4 (Park et al., 2004). Les DC, en présence de HMGB, mûrent, sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et de l'IL-12, favorisant ainsi la

génération de lymphocytes Th1 (Messmer et al., 2004). HMGB stimule aussi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme TNF- α , IL-1, IL-8, MCP-1 par les cellules endothéliales (Andersson et al., 2000; Fiuza et al., 2003). L'ATP libéré par les cellules nécrotiques active aussi les DC mais diminuerait la sécrétion d'IL-12, favorisant ainsi une réponse Th2 (la Sala et al., 2001). Les HSP, et en particulier la HSP70, provenant de cellules nécrotiques peuvent également faire maturer les DC (Somersan et al., 2001).

Ces données amènent une question : si les cellules nécrotiques et lysées expriment des PS, pourquoi n'inhibent-elles pas les réponses immunes, comme décrit pour les cellules apoptotiques (Henson et al., 2001) ? Les travaux de Fadok ont montré que les membranes de cellules lysées avaient le même effet anti-inflammatoire que celles des cellules apoptotiques, alors que le lysat total a un effet pro-inflammatoire. Cependant, lorsque des inhibiteurs de protéases sont ajoutés aux cellules lysées, la sécrétion de TNF- α et d'IL-8 par des m Φ est diminuée. Les auteurs suggèrent que les protéases cytosoliques libérées lors de la nécrose clivent les récepteurs aux PS sur les APC, et ainsi empêchent leur effet anti-inflammatoire (Fadok et al., 2001).

Effets des cellules opsonisées par des molécules sériques ou par des Ac

L'opsonisation des cellules apoptotiques par des molécules telles que C1q, MGF-8, GAS6, protéine S ou encore la β 2 glycoprotéine pourrait participer à la modulation de la réponse lymphocytaire et au maintien de la tolérance au soi (Roos et al., 2004). iC3b peut également recouvrir les cellules apoptotiques facilitant leur capture par les moDC. En présence de cellules apoptotiques recouvertes d'iC3b, les DC mûrissent, perdent CCR2 et CCR5 et acquièrent CCR7, mais sans augmenter l'expression de CD86 ni des molécules HLA de classe II (Verbovetski et al., 2002). Ces DC seraient acteurs de la tolérance périphérique. Chez la souris, les DC de la zone marginale des follicules de la rate utilisent les récepteurs CR3 (CD11b/CD18) et CR4 (CD11c/CD18) pour endocyter les cellules apoptotiques. L'interaction d'iC3b avec CR3 participe à l'inhibition de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires IL-1 α , IL-1 β , IL6, et TNF- α , et d'IL-12. Les DC orienteraient alors la réponse vers la voie Th2 (Morelli et al., 2003).

En revanche, une endocytose médiée par les récepteurs aux parties Fc des Ig serait plutôt bénéfique pour l'induction d'une réponse immune. En effet, les Ac auraient pour effet de favoriser la cross-présentation d'Ag cellulaires (Dhodapkar et al., 2002a) et solubles (Rodriguez et al., 1999). Les données sur l'effet des Ac sur la maturation des DC sont cependant contradictoires. Dans la plupart des travaux, les auteurs ajoutent un adjuvant pour faire maturer les DC qui ont phagocyté des cellules opsonisées (Dhodapkar et al., 2002a; Shaif-Muthana et al., 2000). D'autres études suggèrent que le cross-linking des récepteurs CD32 (Banki et al., 2003) et la capture de cellules opsonisées auraient pour effet la maturation des DC chez l'homme (Selenko

et al., 2001) et chez la souris(Akiyama et al., 2003). Les DC peuvent alors générer des CTL(Akiyama et al., 2003; Dhodapkar et al., 2002a).

Les lysats

Les lysats peuvent contenir des molécules comme HMGB, et les HSP qui pourront avoir un rôle activateur sur les APC. Plusieurs travaux ont montré qu'une réponse efficace médiée par les lymphocytes T CD4 et CD8 pouvait être activée en utilisant des DC chargées avec un lysat de cellules tumorales, enrichi en HSP(Wen et al., 2002; Zeng et al., 2003).

La cross-présentation d'Ag provenant de cellules entières

Les cellules apoptotiques semblent donc moins aptes pour activer une réponse que les cellules nécrotiques. Cependant des études ont montré que des cellules apoptotiques permettaient une cross-présentation d'Ag par les APC. Albert et al ont montré que les DC pulsées avec des monocytes apoptotiques infectés par le virus de l'influenza étaient capables de cross-présenter des Ag(Albert et al., 1998). Cependant, dans cette étude, le virus peut jouer un rôle activateur, en se liant aux TLR des APC, compensant l'effet anti-inflammatoire des cellules apoptotiques. Une autre étude montre l'activation de lymphocytes T CD8 avec des moDC chargées avec des cellules apoptotiques d'une lignée de carcinome du pancréas humain maturées en présence de TNF- α et de PGE₂ (Schnurr et al., 2002). Dans la littérature, on trouve plusieurs autres études qui montrent une activation efficace de CTL antitumoraux avec des DC pulsées avec des cellules apoptotiques (Hoffmann et al., 2001b; Kokhaei et al., 2003; Rovere et al., 1999; Shaif-Muthana et al., 2000) contredisant d'une certaine façon les travaux qui montrent l'effet inhibiteur des cellules apoptotiques. Les cellules nécrotiques pourraient être moins efficaces que les cellules apoptotiques dans l'activation des lymphocytes (Shaif-Muthana et al., 2000). Concernant l'utilisation de lysat, les données sont encore contradictoires. Une étude a montré qu'il était possible de générer des CTL antitumoraux à partir des lymphocytes des patients et de lysats de cellules tumorales autologues avec des moDC (Wen et al., 2002; Zeng et al., 2003). D'autres montrent que le lysat est moins efficace que les cellules apoptotiques pour induire la cross-présentation d'Ag (Hoffmann et al., 2000; Schnurr et al., 2002), voire complètement inefficace (Ferlazzo et al., 2000).

Nécessité d'activer les APC

Les DC peuvent donc cross-présenter des Ag provenant des cellules entières, mais le chargement seul des DC ne suffit pas pour induire une réponse efficace. Dans certain cas, une tolérance pourrait être instaurée, au lieu d'une activation. En effet, la tolérance périphérique à certains Ag pourrait être mise en place et maintenue grâce aux DC immatures(Steinman et al., 2000), et permettrait de rendre tolérants les lymphocytes T autoréactifs. Dans le contexte de

l'immunothérapie antitumorale, il est absolument nécessaire d'éviter ces DC « tolérogènes ».

L'utilisation de DC immatures n'est pas appropriée dans l'immunothérapie

Plusieurs études suggèrent que les DC immatures sont tolérogènes. Des essais *in vivo* chez l'homme ont été réalisés et ont montré que des DC immatures pulsées avec un peptide de la protéine matricielle (MP) du virus de l'influenza induisent la perte de la fonction effectrice des lymphocytes T CD8 et l'apparition de cellules productrices d'IL-10 CD8⁺ (Dhodapkar et al., 2001). Des lymphocytes T naïfs CD4⁺ activés par des DC allogéniques immatures ne prolifèrent pas, et augmentent l'expression de CTLA-4, d'ICOS et la sécrétion d'IL-10, molécules connues pour intervenir dans la tolérance (Jonuleit et al., 2000). Une autre étude chez la souris montre l'effet tolérogène de DC immatures chargées avec des cellules apoptotiques contenant de l'ovalbumine. Les auteurs ont vérifié que les DC endocytent ces cellules injectées, mais qu'elles ne maturaient pas *in vivo*. Les lymphocytes T des souris injectées avec les cellules apoptotiques seules ne répondaient pas à une stimulation ultérieure par l'ovalbumine, tandis que ceux des souris co-injectées avec du CD40L répondaient (Liu et al., 2002).

Si le rôle tolérogène des MDC immatures semble largement admis, le rôle des PDC dans la tolérance est encore loin d'être clair. Les PDC jouent peut-être un rôle dans la tolérance comme le montrent certains articles (Gilliet and Liu, 2002; Kuwana et al., 2001; Moseman et al., 2004) mais rien n'est encore bien établi, il est possible qu'elles possèdent elles-aussi une certaine plasticité qui pourrait leur permettre d'induire des réponses T différentes selon le contexte.

Quels adjuvants utiliser ?

On peut penser éviter l'effet tolérogène des APC en utilisant des adjuvants. On regroupe sous le terme d'adjuvant différentes molécules comme des chimiokines, des cytokines, ou des composés bactériens (Chen, 2003). Ce sont des molécules qui vont favoriser la réponse immune, en agissant par exemple sur la maturation des DC, ou sur la prolifération ou l'activation des lymphocytes.

Adjuvants et macrophages

Les m Φ ont déjà été utilisés dans des thérapies antitumorales non pas pour leur capacité de présentation de l'Ag, mais plutôt pour leurs effets cytotoxiques (Bartholeyns et al., 1991). En effet, une fois activés par de l'IFN γ , ils peuvent sécréter : des anions superoxydes, des peroxydes d'hydrogène, du NO ou encore des enzymes protéolytiques (Oberling, 1997). Ils sont appelés alors MAK (macrophage activated killer). Ils pourraient cependant dans certaines conditions exercer des fonctions APC, ce qui a été montré dans des études chez la souris. Le lipide A monophosphorylé associé au squalène active les macrophages qui peuvent alors cross-présenter des Ag (Wijburg et al., 1998). Les macrophages peuvent aussi être activés par des ligands aux

TLR, comme le LPS qui les active via TLR4 (Nau et al., 2003). Le LPS est cependant trop toxique pour être utilisé en clinique. Mais d'autres composés, comme le CWS (Cell Wall Skeleton) de *Mycobacterium Bovis* (BCG.CWS) pourraient activer les m Φ via les TLR2 et 4 (Azuma and Seya, 2001).

Adjuvant, cellules dendritiques et réponse immune

Plusieurs types d'adjuvants peuvent être utilisés dans l'immunothérapie employant les DC, nous n'en citerons ici que quelques uns, certains sont approuvés pour l'utilisation en clinique : le AS02 qui consiste de saponine QS21, et du lipide A monophosphorylé (un composé bactérien), et le Montanide composé d'huile minérale et d'octadécanoate de mannitol anhydre (Romero et al., 2002). Parmi les autres adjuvants, les cytokines ont été largement étudiées et utilisées seules ou en association avec des DC (Dranoff, 2004). La KLH, une protéine très immunogène, couplée à des peptides favorisera la réponse immune contre ces derniers (Timmerman et al., 2002).

Certains adjuvants sont donc choisis pour leur action sur les DC : le TNF- α est employé pour la maturation des DC utilisées dans l'immunothérapie des tumeurs solides comme celles du pancréas, du foie, ou de la thyroïde (Stift et al., 2003). Les ligands des TLR activent aussi efficacement les DC. Les bactéries comme *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin (BCG) sont déjà utilisées dans le traitement des carcinomes de la vessie avec succès (Alexandroff et al., 1999). Le BCG.CWS est utilisé en clinique (Morales et al., 2001) ; il active les DC via les TLR2 et 4 (Azuma and Seya, 2001). Le poly [I] :poly [C₁₂U] (produit par Ampligen®) induit, via le TLR3, la maturation des DC, et leur production d'IL-12, favorable à la réponse de type Th1 (Adams et al., 2003). Certaines équipes proposent aussi une association de TNF- α et de poly [I :C] pour induire la maturation de moDC chargées avec des cellules tumorales apoptotiques (Gregoire et al., 2003). D'autres adjuvants activant plutôt les PDC sont en cours d'évaluation. L'imiquimod, qui se lie au TLR7 (Bong et al., 2002; Geisse et al., 2004; Shackleton et al., 2004) est proposé pour le traitement de mélanomes ou de carcinomes de la peau. Le développement d'ODN CpG, ligands de TLR9 fait l'objet de recherches menées par l'industrie (Paul, 2003). Ces deux types d'adjuvants pourraient agir en partie en activant la sécrétion d'IFN α par les PDC (Gibson et al., 2002; Klinman, 2004) qui oriente vers une réponse Th1.

D'autres adjuvants auront plutôt pour cible les lymphocytes. Par exemple, de l'IL-2 peut être injectée à faible dose aux patients en plus des DC chargées avec des peptides ou des lysats cellulaires (Slingsluff et al., 2003; Stift et al., 2003). L'IL-2 favorisera la prolifération des lymphocytes T et activera les cellules NK et CD8. Mais elle pourrait parallèlement activer la

prolifération des lymphocytes Treg, ce qui serait préjudiciable pour la réponse antitumorale (Malek and Bayer, 2004). L'instauration d'une réponse immune dépend en effet fortement des cytokines présentes lors de la rencontre entre les DC et les lymphocytes T, comme nous l'avons évoqué précédemment.

Dans le contexte de l'immunothérapie des cancers, il faut aussi envisager que des lymphocytes Treg présents peuvent entraver l'activation de nouveaux lymphocytes T. Une étude de Pasare et al. chez la souris a montré que l'activation des DC par les TLR4 et 9 permettait de juguler l'effet des Treg, par un mécanisme impliquant L'IL-6 (Pasare and Medzhitov, 2003). L'activation produite par un virus pourrait avoir des effets similaires (Yang et al., 2004). Cependant, l'activation des DC via leur TLR doit être d'une durée suffisamment longue pour obtenir une activation des lymphocytes T en présence de lymphocytes Treg (Yang et al., 2004). Les données de tous ces modèles précliniques permettent donc d'envisager de nombreuses voies d'immunothérapie des cancers, mais il est difficile d'en tirer des conclusions définitives sur la meilleure stratégie à adopter.

4 Quelques données de l'immunothérapie

De nombreux protocoles sont testés en clinique à travers le monde et il est difficile d'être exhaustif. On peut citer deux revues regroupant différents essais : la publication de Rosenberg qui recense les essais de l'institut national du cancer (NCI) entre 1995 et 2004, et celle de Figdor à la suite du congrès à Amsterdam réunissant 240 experts en immunothérapie de plusieurs pays (Figdor et al., 2004; Rosenberg et al., 2004).

Types de cancer	Nombre d'études	Pourcentage
1- mélanome métastatic	27	40
2- carcinome renal	7	10
3- cancer de la prostate	5	7
4- cancers avancés	3	4
5- cancer du col de l'utérus	3	4
6- carcinome du foie	3	4
7- cancer colorectal	2	3
8- cancer gastrointestinal	2	3
9- cancer exprimant l'Ag CEA	2	3
10- mélanome localisé	2	3
11- cancer du sein	1	1
12- myélome multiple	1	1
13- leucémie myéloïde aigue	1	1
14- leucémie myéloïde chronique	1	1
15- leucémie lymphoïde chronique	1	1
16- lymphome B	1	1
17- sarcome	1	1
18- cancer de la vessie	1	1
19- gliome malin	1	1
20- mésothéliome	1	1
21- neuroblastome	1	1

Tableau 6: Les différents types de cancers traités par immunothérapie utilisant les DC.
D'après les données supplémentaires de(Figdor et al., 2004).

Comme le montre le tableau 6, les mélanomes sont les cancers les plus traités par immunothérapie à l'aide de DC, suivis des carcinomes rénaux. Les résultats du NCI confirment cette tendance. Il n'y a que peu d'essais dans les autres types de cancers, un seul protocole concerne les lymphomes B.

Méthode de chargement	Nombre d'études	Pourcentage
lysats cellulaires	24	38
peptides	24	38
transfection ARN	4	6
protéines recombinantes	2	3
cellules tumorales in situ	2	3
a-galactosylcéramide	2	3
idiotype	2	3
fusion cellules tumorales/DC	1	2
cellules apoptotiques	1	2
exosomes et peptides	1	2

Tableau 7: Modes de chargement des DC.
D'après les données supplémentaires de(Figdor et al., 2004).

Ces essais cliniques suivent des protocoles très différents les uns des autres. Pour le chargement des DC, on peut noter que les lysats cellulaires et les peptides sont les plus souvent utilisés. On peut remarquer deux études utilisant l'idiotype et une utilisant des cellules apoptotiques. Celles-ci sont peu utilisées du fait de leur effet tolérogène potentiel. Les cellules

nécrotiques et les cellules opsonisées ne sont pas du tout utilisées.

Sur les 541 protocoles de vaccination du NCI, on peut noter que les réponses complètes ne représentent que 1% des cas et les réponses partielles que 2% (Rosenberg et al., 2004). Cependant, malgré une absence de réponses cliniques satisfaisantes, les patients développent des réponses immunologiques.

Quelques données dans le mélanome

Dans le mélanome, il a été possible de montrer que des lymphocytes antitumoraux sont générés après la vaccination. Grâce aux peptides et à la technologie des tétramers, on peut facilement suivre l'évolution de la réponse antitumorale. L'équipe de Roméro et al. a montré que les patients ont initialement des lymphocytes T CD8 antitumoraux anti-Melan-A de phénotype naïf. Après vaccination avec le peptide additionné d'un adjuvant, les lymphocytes T antitumoraux présentent un phénotype « mémoire effecteur ». Ex vivo, les CTL sont capables de lyser des cellules de lignées qui expriment Melan-A dans un contexte HLA correct. Des résultats cliniques ont pu être observés : diminution ou stabilisation de la masse tumorale, mais pas de rémission complète (Romero et al., 2002). Une autre équipe (Coulie et al., 2002) rapporte des résultats semblables. Les résultats cliniques ne sont cependant pas souvent corrélés à l'apparition de lymphocytes T CD8 dirigés contre le peptide utilisé dans la vaccination.

Dans les lymphomes et myélomes

Existence de lymphocytes antitumoraux in vitro

Dans les lymphomes, on ne dispose pas de tétramère pour montrer la présence de lymphocytes antitumoraux. Mais dans notre laboratoire, nous avons montré que les lymphocytes T antitumoraux des patients étaient capables de répondre dans des conditions favorables d'activation (Chaperot et al., 2000b). Dans le myélome, des lymphocytes CD8+ antitumoraux peuvent aussi être activés in vitro par des DC chargées avec des cellules tumorales autologues ou un lysat cellulaire et acquièrent des capacités cytolytiques (Dhodapkar et al., 2002b; Wen et al., 2002). L'utilisation d'un lysat permet de générer des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ spécifiques, dirigés contre l'idiotype (Wen et al., 2002). Ces données montrent donc que des lymphocytes antitumoraux sont présents chez les patients et qu'ils peuvent être activés pour lyser les cellules tumorales.

Vaccination

Dans les lymphomes et myélomes plusieurs protocoles de vaccination avec l'idiotype (Id) ont été testés. Dans les myélomes multiples, des essais cliniques ont été réalisés tout d'abord par injection de l'Id. Les DC étaient mobilisées grâce à une injection de GM-CSF pour certains patients. Pour favoriser l'induction d'une réponse lymphocytaire Th1, de l'IL-12 et le facteur M

du sérum autologue étaient ajoutés pour tous les patients de l'étude. Les auteurs ont observé une réduction du clone de cellules B malignes circulant par PCR en temps réel (Rasmussen et al., 2003). Un protocole de phase I basé sur l'injection de moDC pulsées par l'idiotype et la KLH a récemment été publié dans le myélome. Il montre la génération d'une réponse humorale et cellulaire chez certains patients (Reichardt et al., 2003).

Le premier essai de vaccination avec des DC pulsées avec l'idiotype a été publié par Hsu (Hsu et al., 1996) dans les LNHB. Les résultats étaient encourageants pour l'immunothérapie, avec des réponses cliniques partielles ou totales. Cette étude a été poursuivie, incluant 35 patients atteints de LNHB folliculaires qui présentaient des métastases. Les DC ont été prélevées par cytophérèse puis pulsées avec l'Id couplé à la KLH qui sert de protéine « porteuse » et augmente la réponse immune anti-Id. Les auteurs ont montré qu'une réponse humorale était générée et que des CTL étaient activés. Ils ont observé également une régression de la masse tumorale dans certains cas (Timmerman et al., 2002).

L'ensemble de ces résultats cliniques dans le lymphome et le mélanome suggère qu'il est possible d'activer une réponse efficace antitumorale. Les peptides sont les plus utilisés dans les protocoles de vaccination utilisant des DC. Cependant, dans le lymphome, il n'est pas possible d'utiliser des peptides, comme dans le traitement des mélanomes, car aucun TAA n'a pu être isolé, sauf la télomérase et l'idiotype. Pour pulser les APC dans une vaccination dans le lymphome, nous proposons donc d'utiliser les cellules tumorales entières comme source d'antigènes. Malgré un nombre important d'études cliniques rapportées, aucun protocole ne semble vraiment plus efficace qu'un autre pour l'induction d'une réponse antitumorale. Les DC sont souvent utilisées, mais les m Φ sont aussi capables d'activer une réponse lymphocytaire. Quant aux PDC, elles semblent également intéressantes. Quelle APC devrait-on utiliser préférentiellement pour obtenir une réponse antitumorale optimale? Quelle préparation pour les cellules tumorales doit-on utiliser afin de charger efficacement les APC dans un protocole clinique ?

Dans une étude préliminaire, notre équipe a montré que des MDC et des M Φ fonctionnels pouvaient être générés dans des conditions thérapeutiques à partir des monocytes circulants des patients porteurs d'un LNHB (Chaperot et al., 2000a). Il nous restait à définir comment les utiliser dans le cadre d'une vaccination dans le LNHB. Nous avons également étendu notre étude aux PDC, encore peu étudiées pour leur capacité de capture de cellules entières et de cross-présentation d'Ag. Les PDC sont des cellules peu abondantes dans le sang, et leur purification à partir du sang ne permet pas d'obtenir de grandes quantités. Pour notre étude nous avons utilisé une lignée de PDC obtenue à partir de cellules de leucémie à DC plasmacytoïdes (Chaperot et al.,

2001), générée dans notre laboratoire. Grâce à ces différents outils, nous avons étudié le potentiel des trois types d'APC dans le contexte de l'immunothérapie des LNHB, et de la réponse antivirale.

Objectifs du travail

Parmi plusieurs protocoles possibles de vaccination, nous avons choisi de générer et de charger les APC ex vivo, avec des cellules entières de lymphomes B. Ces APC pourraient ensuite être injectées chez les patients pour activer des lymphocytes T. Dans cette optique, la première étape a consisté à recueillir les cellules B de lymphomes, qui constituent notre source d'antigènes, à partir de biopsies d'organes lymphoïdes envahis. Travaillant en collaboration avec le service d'hématologie du CHU, nous avons eu accès aux biopsies qui nous ont été données avec le consentement éclairé des patients. Nous avons commencé par valider les techniques de séparation de cellules B de lymphome et de préparations des cellules B utilisables en clinique (Article 1). Nous nous sommes attachés à montrer que les cellules tumorales selon leur préparation (induction en nécrose, ou en apoptose, ou opsonisation par le Rituximab) sont phagocytées par les APC (macrophages et moDC). Puis nous avons étudié la cross-présentation des Ag contenus dans les lymphocytes B par les APC dans un modèle allogénique de cellules infectées par le virus de l'influenza puis dans un modèle autologue de réponse antitumorale (Article 2). Enfin nous avons amorcé une étude semblable sur les PDC. Sont-elles capables, elles aussi, de capturer du matériel provenant de cellules entières et d'en cross-présenter les Ag aux lymphocytes T (Article 3)?

A côté de ces travaux qui seront détaillés, le laboratoire a développé d'autres projets de recherches qui sont présentés en annexe. Nous avons étudié les mécanismes d'action du Rituximab (Article 4), l'utilisation d'anticorps anti α -Gal en immunothérapie (Article 5), et la caractérisation de la lignée GEN2 (Article 6).

Article 1 : Purification de cellules B pour charger les cellules présentatrices d'antigènes.

Introduction et objectifs : Le principe des nouvelles approches d'immunothérapie dans le cancer est de solliciter *in vivo* une réponse immunitaire antitumorale en injectant des cellules présentatrices d'antigènes chargées *in vitro* avec des antigènes tumoraux. Dans plusieurs types de cancers, des peptides tumoraux sont utilisés. Dans le cas du lymphome B, on ne connaît pas d'antigène tumoral facilement accessible et largement exprimé. L'utilisation de la cellule tumorale entière peut représenter dans ce cas une alternative et être une source d'antigènes tumoraux. Dans l'objectif d'une mise point d'un protocole clinique, l'obtention d'une grande quantité de cellules tumorales B purifiées dans des conditions utilisables en thérapeutique est nécessaire. Dans un deuxième temps, il est nécessaire de définir le type de traitement (apoptose, nécrose, opsonisation, ...) qui sera utilisé pour les préparations cellulaires vaccinales.

Méthodes : Le système de séparation commercialisé par NEXELL (ISOLEX 300SA) déjà validé pour un usage en clinique a été utilisé. Nous avons mis au point une technique de séparation négative qui utilise des anticorps anti-CD2 et des billes magnétique. Le dispositif consiste en un circuit clos de poches reliées entre elles, permettant de travailler dans des conditions stériles. Plusieurs préparations de cellules tumorales ont été obtenues selon les stratégies suivantes ; chauffage pour l'obtention de cellules nécrotiques, congélation-décongélation suivie d'une filtration pour le lysat cellulaire, irradiation γ pour les cellules apoptotiques, et incubation avec le Rituximab (anti-CD20 déjà utilisé en clinique) pour opsoniser les cellules.

Résultats : Le système ISOLEX permet de travailler avec des grandes quantités de cellules (en moyenne 590 millions) et d'enrichir la suspension cellulaire en cellules B de lymphome. Nous obtenons un rendement moyen de 74%. La pureté obtenue est de 87% contre 52% avant la séparation. Nous avons ensuite mis au point les conditions de préparation des suspensions cellulaires compatibles avec un usage clinique : nécrose (chauffage 45 min à 56°C), apoptose (irradiation γ à 45 Gy puis incubation pendant 18 heures), opsonisation (Rituximab à

1µg/ml), lysat cellulaire (5 cycles de congélation/décongélation). Nous avons ensuite montré que les cellules nécrotiques, apoptotiques, et opsonisées étaient phagocytées par des macrophages.

Conclusion : Des suspensions cellulaires enrichies en cellules tumorales peuvent être obtenues à partir de biopsies ganglionnaires et spléniques en utilisant le système de séparation ISOLEX. Les cellules tumorales purifiées peuvent être induites en nécrose, apoptose, et opsonisées et sont phagocytées ensuite par les cellules présentatrices d'antigènes.

Résultats complémentaires et discussion

Identification des cellules contaminantes

La technique de séparation des cellules B repose sur une sélection négative des cellules qui expriment la molécule CD2. Cependant à la fin de la séparation il reste un certain pourcentage de cellules contaminantes que nous avons voulu identifier. Alors que le marquage CD2+ est fort et homogène sur les cellules avant purification (figure R1A), les résultats ont montré que les cellules contaminantes étaient des lymphocytes T CD3+ qui exprimaient faiblement la molécule CD2 (Figure R1B). Cette faible expression n'a pas permis une rétention assez forte sur les billes pour éliminer ces cellules. Un second passage sur les billes pourrait peut-être améliorer la pureté de la suspension finale mais au détriment du rendement.

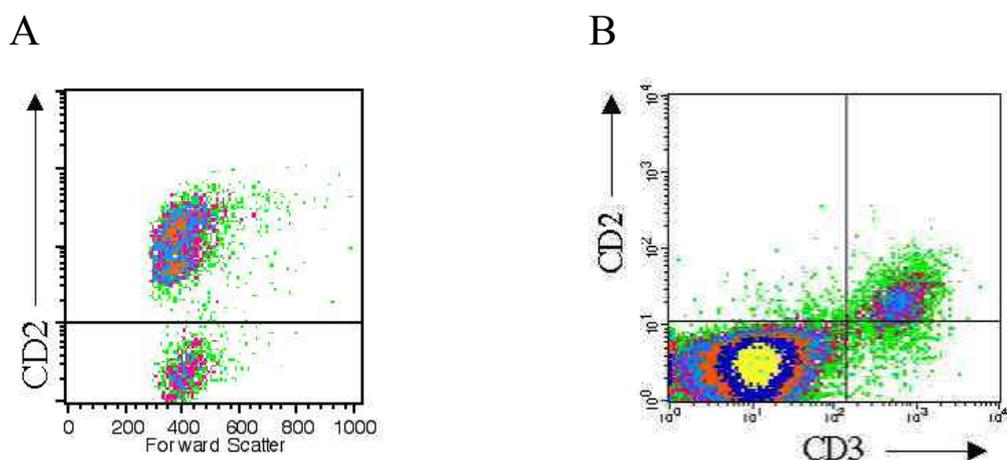


Figure R1: Phénotype des cellules avant séparation (A) et après séparation (B).

Avant séparation, les cellules sont marquées avec un Ac secondaire anti-souris IgG afin de détecter les cellules ayant fixées le CD2. Après séparation, les cellules sont marquées par un CD3 couplé au FITC, et un CD2 couplé au PE. Les cellules contaminantes apparaissent CD3 + et CD2 faible.

Préparation des cellules B et Paramètres de phagocytose

Les caractéristiques de l'apoptose induite

Cinétique d'induction d'apoptose

Pour l'obtention des cellules apoptotiques, les cellules sont irradiées à 45 Gy puis incubées à 37°C pendant 18 heures. Nous avons étudié la répartition des cellules en apoptose précoce et en nécrose secondaire en suivant la cinétique de fixation de l'Annexine V (An) sur les phosphatidylsérines et de l'incorporation de l'Iodure de Propidium (IP, un intercalant de l'ADN)

(Figure R2A). Les cellules vivantes (An-/IP-) diminuent au cours du temps après irradiation (Figure R2B). A partir de 2 heures d'incubation, nous observons une augmentation du pourcentage des cellules qui fixent l'An à la surface et gardent leur intégrité membranaire (cellules An+/IP-). Ce sont des cellules en apoptose précoce. Ce pourcentage atteint une valeur plateau d'environ 10 % entre 2 et 4 heures, tandis le pourcentage des cellules An+/IP+ augmente de façon constante, ce sont des cellules dites en nécrose secondaire. Les cellules B de lymphomes induites en apoptose par irradiation à 45 Gy ne restent donc pas longtemps au stade d'apoptose précoce et perdent rapidement leur intégrité membranaire.

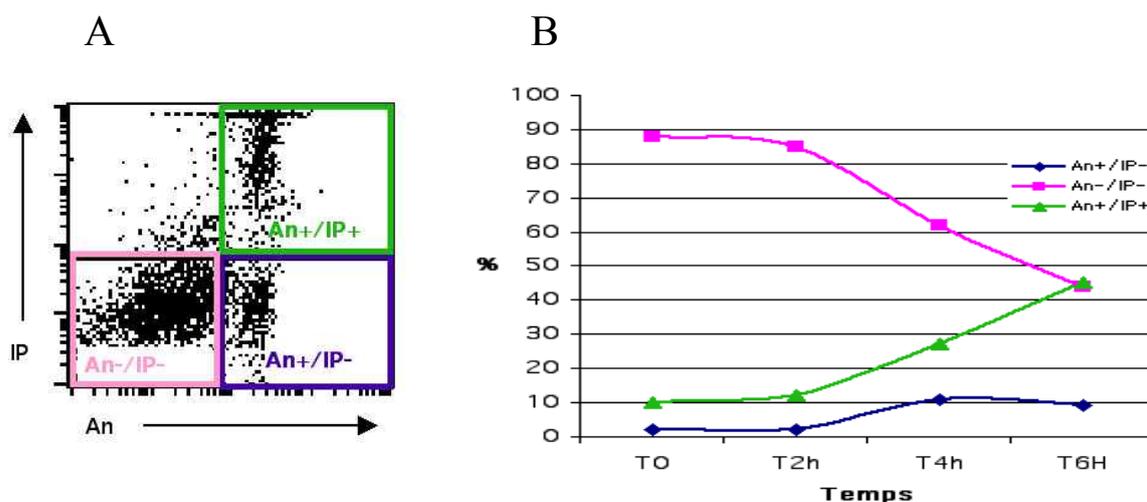


Figure R2 : Evolution des différentes populations cellulaires lors de l'apoptose.

(A) Dot plot représentant les différentes populations cellulaires. Les cellules sont marquées à l'Annexine V (An) et à l'Iodure de Propidium (IP), un intercalant de l'ADN. Les cellules vivantes sont An-/IP-, les cellules en apoptose précoce sont An+/IP-, et les cellules en nécrose secondaire An+/IP+. (B) Cinétique d'apoptose. Les cellules ont été irradiées à 45 Gy puis incubées à 37°C pendant 2, 4 ou 6 heures, puis marquées à l'Annexine V et à l'Iodure de Propidium. (résultat représentatif de deux expériences)

Implication des caspases

Nous avons ensuite confirmé que l'irradiation γ entraînait bien un processus apoptotique par la mise en évidence du clivage des caspases potentiellement impliquées. Dans la figure R3, nous montrons que l'irradiation des cellules tumorales de lymphomes entraîne le clivage de la caspase-9 et de la caspase-3 contrairement au traitement induisant la nécrose ou à celui utilisé pour obtenir des lysats cellulaires. Les cellules Jurkat traitées dans des conditions similaires et en présence de Fas sont utilisées comme contrôles. Pour la condition témoin des cellules du patient « Leo », on peut remarquer un faible clivage de la caspase-9, dû vraisemblablement à de l'apoptose spontanée.

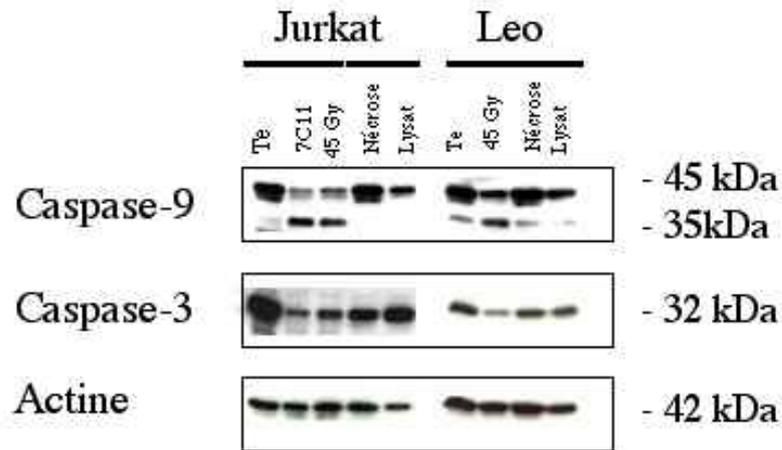


Figure R3 : Clivage des caspases 9 et 3 dans les différentes préparations cellulaires.

Les cellules tumorales d'un patient (Leo) et de la lignée Jurkat sont soit : non traitées (Te), incubées avec un Ac anti-Fas (7C11), irradiées à 45Gy, induites en nécrose par chauffage à 56°C pendant 45min, ou lysées par 5 cycles de congélation-décongélation puis filtrées. L'expression des caspases 9 et 3 a été examinée par Western Blot.

Les paramètres de l'opsonisation

Nous avons déterminé que 1 µg/ml est une concentration de Rituximab suffisante pour obtenir une bonne opsonisation des cellules tumorales. Nous voulions ensuite vérifier la stabilité de la fixation de l'anticorps sur sa cible. Après incubation avec le CD20, nous avons incubé les cellules opsonisées pendant 1, 2 et 3 heures à 37°C en milieu puis révélé la présence de l'anti-CD20 avec un anticorps secondaire. Les résultats présentés dans la figure R4 montrent que l'intensité du marquage anti-CD20 diminue constamment dès 1h en conservant malgré tout un niveau important de molécules fixées ($MFI \geq 150$). D'après des résultats récents (Teeling et al., 2004), cette diminution s'expliquerait par une dissociation de l'anticorps sur sa cible. Cette dissociation du Rituximab est importante dans le cadre des mécanismes d'action in vivo de l'anticorps injectés et en particulier pour les mécanismes de cytotoxicité dépendante du complément (CDC) et de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) comme nous l'avons montré in vitro dans une étude récente (Manches et al., 2003). Dans notre étude où l'endocytose des cellules opsonisées par les cellules présentatrices d'antigènes aurait lieu in vitro, ce phénomène ne devrait pas avoir d'incidence sur le niveau de phagocytose.

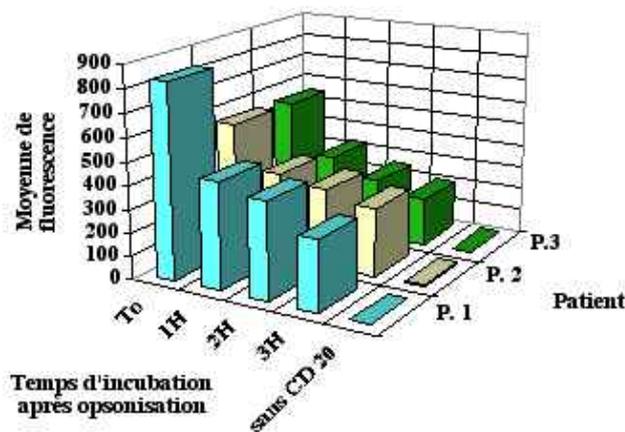


Figure R4 : Stabilité de l'opsonisation.

Les cellules de 3 patients sont opsonisées en milieu 10% SVF avec l'anti-CD20 (Rituximab). Après lavage, elles sont incubées pendant 1, 2, ou 3h à 37°C. Le CD20 est ensuite révélé par un marquage secondaire avec un Ac anti-IgG humaines. Les moyennes de fluorescence (MFI) sont obtenues en soustrayant la moyenne de fluorescence du témoin (cellules sans Ac primaire).

Les paramètres de la phagocytose

Récepteurs impliqués et influence du sérum

L'analyse en microscopie optique des macrophages montre des images de phagocytose des cellules traitées. Les cellules B apparaissent comme contenues dans une vésicule, qui est appelée phagosome en théorie. Ce phagosome fusionnera avec des lysosomes, vésicules chargées d'enzymes protéolytiques qui dégraderont les cellules tumorales. Ce mécanisme est initié par l'interaction de récepteurs avec leurs ligands. Les récepteurs qui peuvent le mieux induire la phagocytose des cellules opsonisées par des anticorps sont les récepteurs aux IgG : les molécules CD16 (F γ RIII), CD32 (F γ RII), et CD64 (F γ RI) exprimées toutes les trois par les macrophages. Cependant, tous les récepteurs Fc ne sont pas inducteurs de la phagocytose ; F γ RIIB a un effet inhibiteur sur la phagocytose via F γ RIIA en particulier, mais influence moins l'internalisation via les autres récepteurs (Hunter et al., 1998).

Nous avons observé que selon le sérum utilisé, la phagocytose était plus ou moins importante (Figure R5).

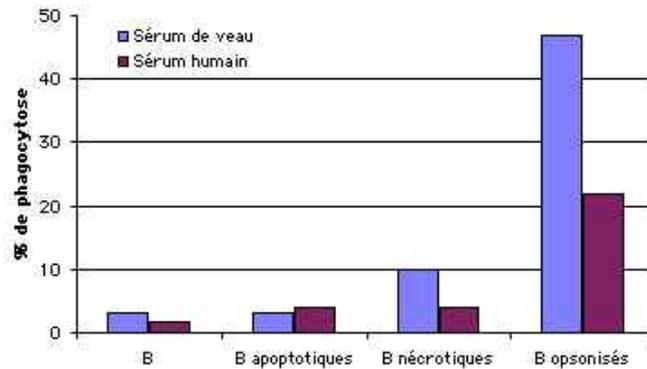


Figure R5 : Phagocytose par le macrophage dans des sérums différents.

Les cellules sont préparées puis incubées avec les macrophages pendant 3 heures, en milieu 10% SVF ou 10% SH décomplémenté. La phagocytose est évaluée par un comptage au microscope optique. (expérience représentative de 2 expériences)

En effet, en sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté, la phagocytose des cellules opsonisées est plus importante qu'en sérum humain (SH) décomplémenté. La diminution de la phagocytose de cellules opsonisées pourrait être expliquée par la présence d'IgG humaines qui se fixeraient sur les récepteurs Fc, bloquant ainsi la reconnaissance des cellules opsonisées. Nous avons montré par des expériences d'inhibition, que les récepteurs responsables de l'internalisation sont différents suivant le sérum utilisé (Figure R6). Dans les deux types de sérum, le CD16 de faible affinité pour les IgG ne semble pas être impliqué dans la phagocytose. Alors que le CD64 joue un rôle prédominant lorsque les expériences sont réalisées en SVF, en SH, c'est la phagocytose via CD32 qui est plus importante. Le CD64 a une forte affinité pour les IgG humaines. Lorsque les macrophages sont mis en milieu RPMI 10% SH, les molécules CD64 seraient rapidement bloquées par les IgG humaines. La partie constante du CD20 ne pourrait donc pas accéder à ces récepteurs saturés. Il reste donc à la surface des macrophages les molécules CD32 fonctionnelles, de moyenne affinité pour les IgG qui joueraient alors un rôle prépondérant. En SVF, il n'y a pas cette compétition et la partie constante du Rituximab peut lier le récepteur de forte affinité CD64 en priorité.

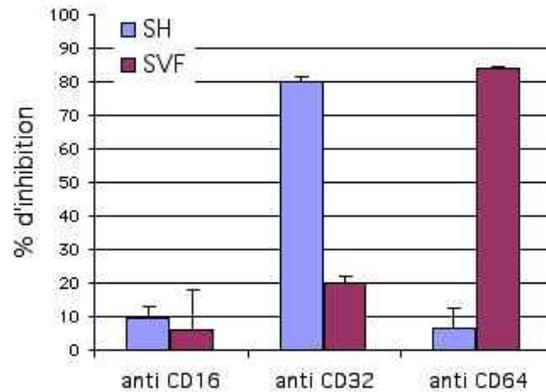


Figure R6: Inhibition de la phagocytose des cellules opsonisées.

Les cellules sont opsonisées par le Rituximab, lavées, puis incubées pendant 3 heures à 37°C avec les macrophages, en RPMI avec 10% de sérum humain (SH) ou de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémentés, en absence ou en présence d'Ac bloquant anti CD16, CD32 et CD64 à une concentration de (5µg/ml). La phagocytose est évaluée en microscopie optique. Puis le taux d'inhibition est calculé de la façon suivante : (% de phagocytose sans Ac - % de phagocytose avec Ac)/% de phagocytose sans Ac * 100. Ces résultats sont les moyennes de deux expériences.

Pour les autres types de cellules (nécrotiques ou apoptotiques) les molécules impliquées dans la phagocytose sont différentes. Pour les cellules apoptotiques, les molécules $\alpha\beta3$, et CD36 pourraient être impliquées(Fadok et al., 1998b). Les cellules apoptotiques et vivantes sont peu phagocytées par les macrophages en SVF comme en SH. En revanche, la phagocytose des cellules nécrotiques semble aussi être diminuée en SH (résultats non montrés). CD36 et $\alpha\beta3$ pourraient se complexer avec d'autres molécules comme la trombospondine et ainsi être bloquées(Moodley et al., 2003).

Conclusion

Nous avons donc mis au point une technique de séparation des cellules B de lymphomes, et plusieurs préparations de cellules tumorales pour obtenir des cellules apoptotiques, nécrotiques ou opsonisées compatibles avec un usage en clinique. Il nous faut maintenant étudier la capture de ces cellules par les DC et les macrophages, puis la capacité de ces APC à cross-présenter des Ag tumoraux afin de comparer l'efficacité des deux types d'APC et l'utilisation des différentes préparations dans la cross-présentation. Nous pourrions ainsi définir plus précisément quelle APC et quelle préparation cellulaire seraient les plus adaptées à l'immunothérapie dans le lymphome.

Article 2 : Les cellules entières permettent la cross-présentation d'Ag associés aux tumeurs

Introduction et objectifs : Malgré les progrès en chimiothérapie et en radiothérapie, certaines formes de lymphomes sont résistantes aux traitements classiques. Des stratégies d'immunothérapie utilisant des cellules présentatrices d'antigènes (APC) ont été proposées aux patients résistants aux traitements. Les APC jouent un rôle clef dans l'initiation de la réponse immune. Cellules sentinelles, elles sont capables de capturer et de présenter les antigènes pour activer les lymphocytes T naïfs. Dans l'optique d'une application clinique, nous avons étudié la possibilité d'utiliser des cellules présentatrices d'antigènes (macrophages et cellules dendritiques) pulsées avec des cellules entières de lymphomes B traitées de différentes façons afin de générer une réponse antitumorale dans le lymphome B non Hodgkinien.

Méthodes : Nous avons étudié la phagocytose de cellules B tumorales, préparées comme précédemment décrit (Lui et al., 2004), par les APC en cytométrie en flux et en microscopie optique. Pour étudier la présentation d'Ag aux lymphocytes T CD8+, nous avons ensuite mis en place deux modèles : un modèle allogénique utilisant le virus de l'influenza pour étudier la cross-présentation d'antigènes viraux provenant de cellules B infectées, et un modèle autologue utilisant une lignée cellulaire dérivée des cellules tumorales primaires n'exprimant pas les molécules HLA afin de montrer la cross-présentation d'Ag tumoraux. La présentation aux lymphocytes CD8 est évaluée grâce à un dosage d'IFN γ .

Résultats : Les APC endocytent de façon différente les cellules B. Les macrophages sont bien plus efficaces dans la phagocytose de cellules tumorales entières que les DC. La cytométrie en flux est plus performante que la microscopie optique pour mesurer la phagocytose car elle permet de visualiser à la fois la capture de cellules entières mais aussi la capture de fragments cellulaires plus petits, non visibles en microscopie optique. Les cellules opsonisées sont les mieux phagocytées par le macrophage et la cellule dendritique. Les cellules vivantes non opsonisées peuvent servir également de source d'Ag, de même que les cellules nécrotiques ou apoptotiques. Les dosages d'IFN γ secrété par les lymphocytes CD8 montrent que les cellules

dendritiques cross-présentent les antigènes des lymphocytes B vivants, apoptotiques, et opsonisés mais pas ceux provenant des cellules nécrotiques. Quant aux macrophages, ils ne cross-présentent pas d'Ag quelle que soit la préparation des cellules B.

Conclusion : Nos résultats réalisés *in vitro* sont donc en faveur de l'utilisation des DC en immunothérapie. Nous avons également étudié la possibilité d'employer les m Φ , mais ceux-ci se sont révéllé être peu efficace pour la cross-présentation d'Ag, et ne sont donc pas recommandés dans le cadre d'une induction d'une réponse lymphocytaire CD8+. Pour le chargement des DC, contrairement aux cellules nécrotiques, les cellules apoptotiques, opsonisées et même non préparées permettent la cross-présentation d'Ag tumoraux par le DC et représentent des sources potentielles d'Ag tumoraux pour les DC.

Résultats complémentaires et discussion

Les paramètres de la phagocytose

Stabilité du marquage PKH26

Pour étudier de façon plus précise l'endocytose de matériel de lymphocytes B par les APC, nous avons choisi de marquer nos cellules malignes avec un marqueur membranaire fluorescent le PKH26, molécule hydrophobe qui s'insère dans la bicouche lipidique des membranes. Avant d'utiliser les cellules marquées au PKH26, nous avons vérifié la stabilité du marquage après le chauffage, et l'induction de l'apoptose (figure R7). Les cellules sont marquées par le PKH26, avant de subir les différentes préparations. Après chauffage à 56°C pendant 45 minutes, ou irradiation suivie d'une incubation à 37°C pendant 18 heures, les cellules apoptotiques et nécrotiques restent marquées avec la même intensité de fluorescence que les cellules qui n'ont pas subi de traitement. Ce marquage permet de montrer une capture de membrane non visible en microscopie optique.

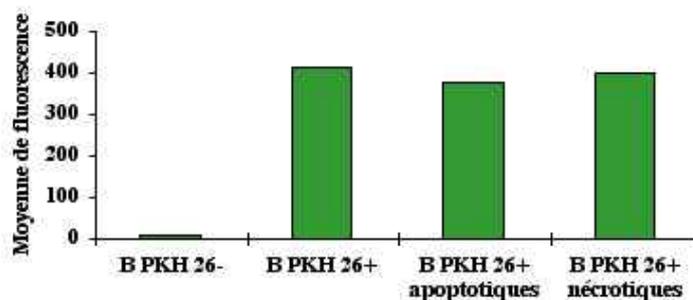


Figure R7 : Stabilité du marquage au PKH 26 après traitement.

Les cellules de lymphomes sont soit -non marquées (notées B PKH 26-), -marquées au PKH26 (notées B PKH26+, elles correspondent aux cellules T0) selon le protocole du fabricant. Les cellules sont ensuite soit chauffées à 56°C pendant 45 minutes, pour les cellules nécrotiques, ou irradiées puis incubées pendant 18 heures à 37°C, pour les cellules apoptotiques. La fluorescence est ensuite analysée par cytométrie en flux.

Les différentes voies d'endocytose

Les cellules présentatrices d'antigènes sont capables d'endocyter, c'est-à-dire d'internaliser des antigènes solubles ou particulaires. Cette endocytose peut avoir lieu, selon plusieurs modes : la pinocytose et la phagocytose. La pinocytose est la voie qui permet l'entrée de liquide ou d'antigènes solubles dans la cellule. La phagocytose met en jeu le cytosquelette d'actine et permet la capture de particules. Les récepteurs jouent un rôle important dans la phagocytose des pathogènes, pour leur reconnaissance et l'induction de leur internalisation, en

guidant la formation des pseudopodes autour de la particule à ingérer, mécanisme dit « zipper »(Swanson and Baer, 1995). Dans ce travail, nous avons considéré que la voie d'endocytose utilisée par les macrophages et les cellules dendritiques était de la phagocytose en raison de la nature des éléments à endocyter (des cellules). Cependant, la démonstration de l'endocytose de matériel cellulaire de cellules non traitées par les MØ et les DC ainsi que l'observation microscopique en fluorescence révélant la capture de matériel cellulaire sous forme vésiculaire plus ou moins importante rappelle un phénomène appelé « nibbling » ou « grignotage » décrit pour les DC(Harshyne et al., 2001). Ce processus a été décrit dans plusieurs systèmes et correspond à une capture de matériel cellulaire par des cellules dendritiques à partir de cellules vivantes par un mécanisme encore mal compris(Harshyne et al., 2001; Russo et al., 2000). Contrairement à d'autres(Harshyne et al., 2001), nous montrons dans cette étude que les macrophages sont aussi capables d'acquérir des fragments de membrane de cellules B. La comparaison est cependant difficile en fonction des systèmes utilisés. En effet, la nature lymphoïde et les capacités potentielles d'endocytose des cellules tumorales de lymphomes rendent notre système tout à fait particulier. Récemment, l'équipe de Harshyne a montré que les SRA jouaient un rôle dans ce phénomène(Harshyne et al., 2003). Notre étude pourrait se poursuivre en identifiant les molécules impliquées dans ce transfert de membrane entre macrophages, DC et cellules B.

L'endocytose de matériel cellulaire à partir des cellules tumorales « préparées » est plus attendue, mais le phénomène de grignotage pourrait aussi être impliqué en particulier pour les DC. Pour les cellules apoptotiques, l'apoptose induit à la surface de la cellule des molécules spécifiques de la mort cellulaire qui favorisent leur reconnaissance et le « grignotage » par les APC. Dans cette hypothèse ce serait les récepteurs aux phosphatidylsérines qui entreraient en jeu, ou d'autres récepteurs qui sont nombreux (présentés dans l'introduction), comme $\alpha\beta 5$ ou CD36. L'internalisation de fragment de membrane des cellules B opsonisées pourrait se faire peut-être via les récepteurs aux Fc. Les DC générées à partir de monocytes n'expriment que le CD32(Banki et al., 2003; Chaperot et al., 2000a)(résultat non montré). Il est probable que d'autres récepteurs interviennent aussi, et permettent non pas la phagocytose mais le « grignotage » de cellules opsonisées. Une expérience d'inhibition à l'aide d'anticorps bloquants pourrait permettre de déterminer le(s) récepteur(s) d'intérêt.

Effets de la capture des cellules B sur le phénotype des DC et macrophages

Il a été décrit que l'activation ou la maturation des cellules présentatrice d'antigènes

pouvait être modulée après incubation avec certaines préparations cellulaires (Chen et al., 2004b; Rovere et al., 1998; Sauter et al., 2000; Selenko et al., 2001). Nous avons voulu savoir si l'on retrouvait ces observations dans notre modèle. Après incubation pendant 24 heures avec les différentes préparations de lymphocytes B malins, les DC et les macrophages ont été marqués pour étudier l'expression de marqueurs d'activation.

Activation des macrophages

La figure R8 montre les phénotypes réalisés sur les macrophages dans différentes conditions. Par rapport aux macrophages cultivés en milieu, l'expression de HLA-I et de HLA-DR n'augmente pas en présence de cellules B quelle que soit la préparation des cellules B. Pour les molécules de costimulation, il n'y a pas de modification marquante de l'expression de CD40 et de CD80. L'expression du CD86 semble diminuer un peu en présence de cellules nécrotiques et apoptotiques, et plus fortement en présence de cellules B vivantes.

En présence de cellules B, les macrophages ne semblent donc pas être activés. Il n'y a pas d'augmentation de leur capacité de présentation d'Ag par une augmentation d'expression des molécules du CMH de classe I et II, ni de leur capacité à activer les lymphocytes T par l'expression des molécules de costimulation en particulier de CD40. En revanche on peut remarquer une diminution de l'expression de CD86 en présence de cellules vivantes. Il y a peut-être là un effet inhibiteur des cellules vivantes de lymphomes B sur les macrophages. Il faudrait faire d'autres expériences pour vérifier ces résultats et évaluer l'effet de la diminution de CD86 sur l'activation des lymphocytes T.

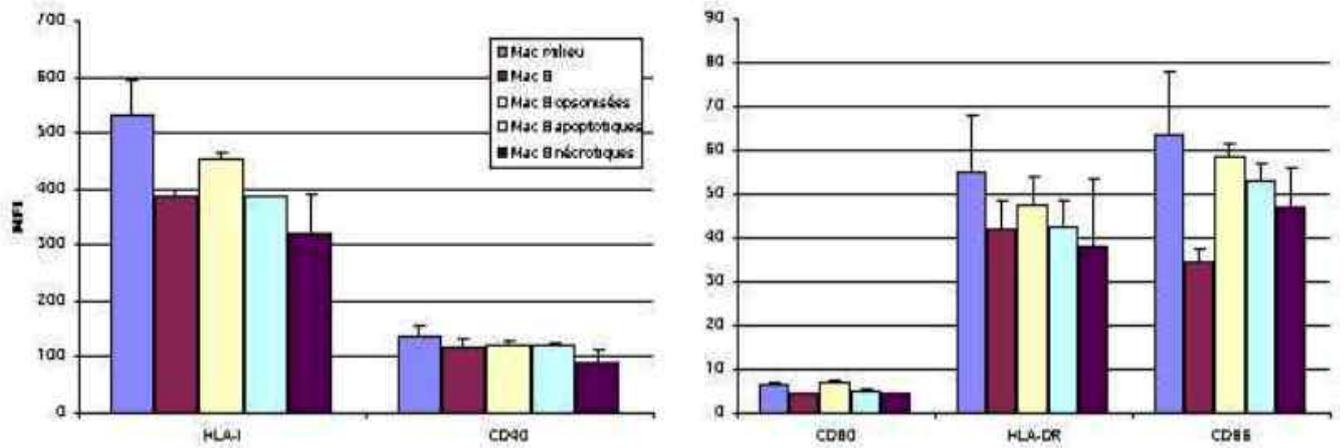


Figure R8: Effet des différentes préparations cellulaires sur les macrophages.

Les MØ sont obtenus à partir de monocytes. Les MØ et les cellules B de patients, préparées comme précédemment décrit, sont incubés pendant 24 heures, à une concentration de 1×10^6 cellules/ml. Les cellules sont ensuite marquées avec des Ac puis l'analyse en cytométrie de flux est faite sur les macrophages qui se distinguent des lymphocytes grâce à leur taille et granularité. Ces résultats sont les moyennes de 2 expériences avec des cellules B et des macrophages de patients et de donneurs différents.

Les macrophages influencent la réponse lymphocytaire T générée par les cytokines qu'ils sécrètent. Dans une étude (Anderson and Mosser, 2002) chez la souris, les auteurs montrent en effet que des macrophages pulsés avec l'ovalbumine sous forme soluble induisaient des lymphocytes Th1 tandis que sous forme de complexes immuns, ils généraient des lymphocytes Th2. L'engagement des récepteurs Fc semblent donc favoriser une réponse Th2. Ils ont également montré que les cytokines, comme l'IL-12 et l'IL-10, étaient impliquées dans l'orientation Th1 et Th2 respectivement. D'après les travaux de Fadock et al., les cellules apoptotiques auraient un effet anti-inflammatoire et induiraient la production de prostaglandine E2, TGF- β et de PAF (platelet-activating-factor) par les macrophages (Fadok et al., 1998a). Nous avons fait deux expériences de dosage de cytokines, pour déterminer le profil des cytokines sécrétées, mais nous n'avons pas pu obtenir de résultats significatifs.

Pour maîtriser l'immunothérapie, il est important de connaître quel type de réponse immune les macrophages vont induire, et leur capacité à recruter les autres cellules de l'immunité, les lymphocytes T ou des cellules de l'immunité innée comme les cellules NK ou les monocytes, de même que leur capacité de migration vers le ganglion, grâce à l'expression de CCR7. Il serait donc important de compléter cette étude par le dosage de cytokines comme l'IL-12, l'IL-10, TGF- β , de chimiokines comme CCL18 qui attire les lymphocytes naïfs (Adema et al., 1997). D'autre part, il nous faudrait par la suite tester les effets de la préactivation des macrophages en présence d'interféron γ sur leurs capacités de phagocytose et de présentation d'antigène.

Activation des cellules dendritiques

Nous avons étudié l'expression de la molécule de costimulation CD40, et de CD83, marqueur de la maturation des DC en coculture avec les différentes préparations de cellules B, en présence de CD40L et en milieu (Figure R9). Les DC en présence de cellules B seules ne sont pas activées : il n'y a pas d'augmentation marquante de l'expression de CD83 ni de CD40. En présence de CD40L, les DC mûrissent avec une augmentation de CD40 et de CD83 quelle que soit la préparation des cellules B. La présence des cellules B ne modifie donc pas la maturation des DC.

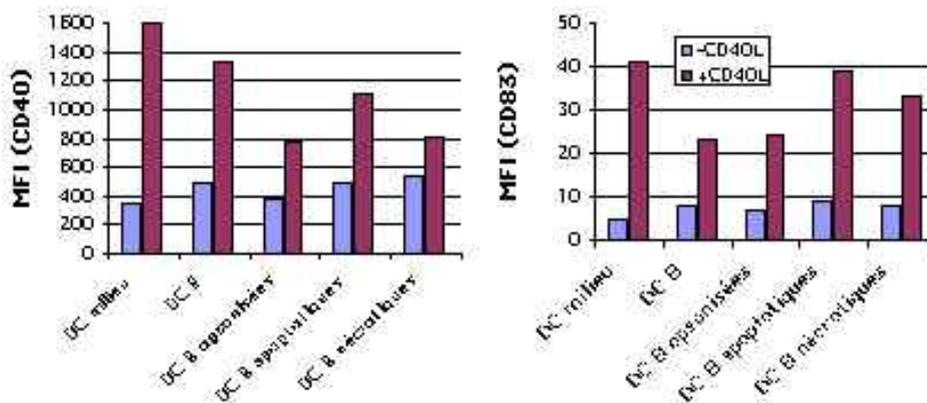


Figure R9 : Phénotypage des DC après incubation avec les cellules B.

Les DC sont générées à partir de monocytes en présence d'IL-4 et de GM-CSF. Les cellules de lymphomes sont préparées comme décrit précédemment et mises en culture pendant 24 heures en présence de DC (1×10^6 cellules/ml) dans un rapport DC/B=1/5. Les DC sont ensuite marquées avec les Ac puis les résultats sont analysés par cytométrie en flux. Les moyennes de fluorescence ont été obtenues sur la population de DC isolée grâce à leur taille et granularité. Cette expérience a été faite deux fois. L'absence de maturation en présence des différentes préparations de cellules B, et l'activation des DC en présence du CD40L sont reproductibles d'une expérience à l'autre.

Une étude montre que le cross-linking de CD32 grâce à des Ac immobilisés permet la maturation des moDC par la voie NF- κ b (Banki et al., 2003). Nous n'avons pas observé de maturation des DC en présence des cellules B opsonisées. La différence provient peut-être de l'utilisation d'anticorps anti-CD32, qui donne un signal différent des cellules opsonisées. En revanche notre étude corrèle avec les résultats de Dhodapkar (Dhodapkar et al., 2002a) qui montre que la phagocytose de cellules de myélome opsonisées n'induit pas la maturation des DC générées à partir de monocytes. Nous n'avons pas pu montrer non plus d'effet activateur des cellules nécrotiques contrairement aux résultats de plusieurs travaux de la littérature. Les cellules nécrotiques ont été décrites comme étant une source d'Ag et de signaux de « danger » parce qu'elles expriment différentes sortes de molécules activatrices des DC. Sauter et al. ont montré que le surnageant de cellules nécrotiques (obtenues par 5 cycles de congélation-décongélation)

était capable de donner un signal de maturation(Sauter et al., 2000), contrairement aux cellules apoptotiques qui ne faisaient pas mûrir les DC. Basu et al. proposent que les molécules pouvant activer les DC seraient les Heat Shock Protein (HSP), générées lors de l'induction de la nécrose (Basu et al., 2000), non produites lors de l'apoptose. Dans ces deux travaux, les auteurs induisent la nécrose par la congélation-décongélation. Dans notre étude, nous avons chauffé les cellules B à 56°C, température qui est trop élevée certainement pour la production de novo de HSP, ou les détruit si elles sont présentes dans les cellules tumorales. D'autres travaux montrent la synthèse et la libération de molécules comme l'acide urique, dont la production augmente lorsque les cellules sont abîmées et stressées par des UV ou la cycloheximide, mais pas lorsqu'elles sont chauffées 20 minutes à 45°C(Shi et al., 2003). L'acide urique, résultat de la dégradation de l'ADN par des enzymes, ne serait donc pas produit à 56°C. On pourrait penser que parmi les molécules libérées lors de la lyse, HMGB, molécule liant l'ADN, pourrait être présente dans le surnageant et activer les DC(Scaffidi et al., 2002). Les travaux ont montré que les cellules en nécrose secondaire ne libèrent pas cette molécule, car elle serait déjà utilisée dans la condensation de l'ADN lors de l'apoptose. Dans la nécrose primaire induite par congélation-décongélation les cellules libèrent HMGB. Les cellules chauffées deviennent rapidement perméables à l'IP, perdent leur intégrité membranaire au moins cytoplasmique mais gardent leur forme générale. Comme HMGB est une protéine nucléaire, la destruction de la structure cellulaire par chauffage n'est peut-être pas suffisante pour la libération de cette molécule, la membrane nucléaire et la structure cellulaire ne seraient pas assez endommagées. Le mode d'induction de la nécrose joue donc un rôle important dans l'immunogénicité des cellules. Le chauffage à 56°C ne permettrait donc pas la libération des molécules activatrices décrites dans la littérature.

Plusieurs travaux ont montré que les cellules apoptotiques sont phagocytées par les DC, et certains suggèrent que cette phagocytose entraîne la maturation des DC(Rovere et al., 1999). Cependant la plupart des auteurs ajoutent un adjuvant pour faire mûrir les DC(Albert et al., 1998; Shaif-Muthana et al., 2000; Subklewe et al., 2001). Les cellules apoptotiques peuvent induire une augmentation de la sécrétion d'IL-10 in vitro(Voll et al., 1997) ou in vivo chez la souris(Ronchetti et al., 1999). A l'opposé, les cellules nécrotiques peuvent libérer des molécules comme HMGB qui induit la sécrétion d'IL-12(Messmer et al., 2004). Il serait donc intéressant de doser les cytokines secrétées par les DC en présence des différentes populations de cellules tumorales pour mieux comprendre quel type de réponse est générée, pro ou anti-inflammatoire.

La cross-présentation

Notre étude compare la capacité des DC et des macrophages à cross-présenter des Ag

contenus dans les lymphocytes B. Les macrophages sont capables de phagocyter plusieurs cellules B en particulier les cellules opsonisées, mais en revanche ils ne cross-présentent pas les antigènes. Nous avons analysé les capacités de dégradation des cellules ingérées en fonction du temps en comparant les résultats provenant de l'observation microscopique et de la cytométrie (Figure R10). En microscopie optique, le pourcentage de phagocytose augmente jusqu'à 6h, les macrophages pouvant phagocyter plusieurs lymphocytes B à la fois. A 18h, on n'observe plus de cellules B phagocytées par des macrophages, celles-ci ayant été vraisemblablement dégradées. En cytométrie en flux, le pourcentage de doubles positifs augmente de façon continue jusqu'à 18h où l'on retrouve 80% de phagocytose. Ce résultat indique que le matériel cellulaire provenant des lymphocytes B non visible en microscopie optique est conservé dans les MØ après dégradation.

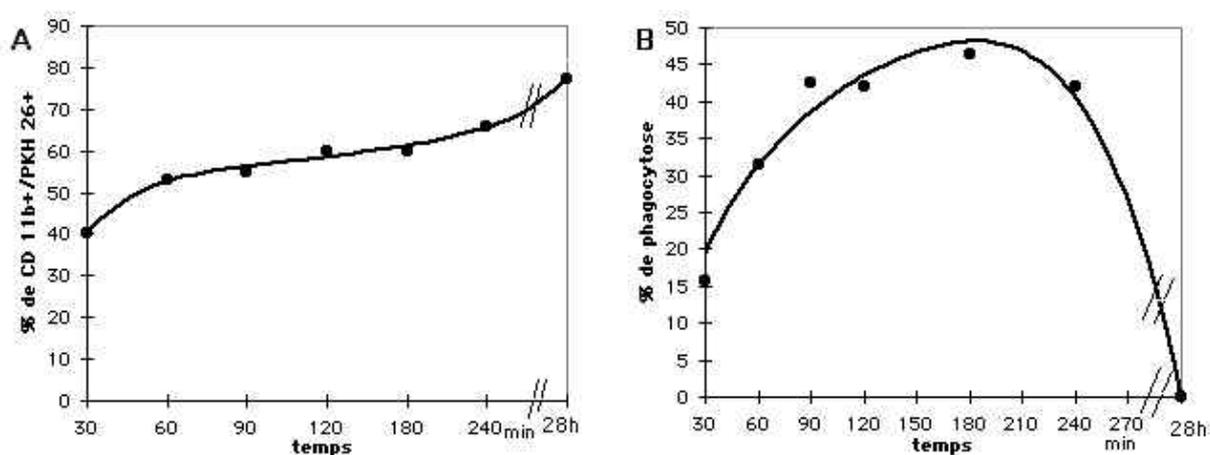


Figure R10: Les macrophages dégradent les cellules phagocytées.

Les cellules B sont marquées par le PKH26 et opsonisées par le CD20, puis incubées avec les macrophages. Après différents temps d'incubation, une partie des cellules (A) est marquée avec le CD11b couplé au FITC pour marquer les macrophages, et analysée en cytométrie de flux, les cellules ayant phagocyté sont les cellules CD11b+/PKH26+, l'autre partie (B) est centrifugée sur des lames, et colorée en MGG. Le pourcentage de macrophages ayant phagocyté est alors déterminé par comptage.

Les cellules B donc sont donc phagocytées et digérées par les macrophages, mais les Ag ne sont pas cross-présentés. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Albert et al. (Albert et al., 1998). Il est possible cependant que les macrophages puissent cross-présenter des Ag après activation avec l'IFN γ (Houde et al., 2003). L'IFN γ a pour effet d'induire la formation de l'immunoprotéasome ainsi que son association avec le phagosome. Il serait intéressant de voir si les macrophages pulsés avec des cellules de lymphomes et activés avec l'IFN γ peuvent cross-présenter des antigènes viraux et tumoraux et quel type de réponse immune ils engendrent.

Concernant les cellules dendritiques, nous avons montré que les DC pouvaient cross-présenter aux lymphocytes T CD8+, les Ag viraux et tumoraux provenant de cellules vivantes, opsonisées et apoptotiques mais pas de cellules nécrotiques. Il semblerait que le traitement par

chauffage empêche les protéines des cellules nécrotiques d'être cross-présentées, peut-être parce qu'elles ne peuvent emprunter la voie de la cross-présentation, du fait de la dénaturation causée par la chaleur. Compte tenu du mode d'induction de la nécrose et du mode de génération des DC, notre étude corrèle avec une autre étude où les cellules nécrotiques de mélanome sont induites en nécrose par chauffage (Shaif-Muthana et al., 2000). Cette étude montre aussi que les DC pulsées avec des cellules nécrotiques sont moins efficaces que les cellules apoptotiques dans la génération de lymphocytes T antitumoraux.

Conclusion

Nous montrons que les macrophages non-activés ne sont pas intéressants pour un vaccin antitumoral, car ils ne cross-présentent pas les Ag provenant des cellules tumorales entières. L'évaluation d'une activation par l'IFN γ reste cependant à faire. En revanche, les DC sont capables de cross-présenter des Ag de cellules vivantes, opsonisées ou apoptotiques mais pas des cellules nécrotiques. Il semble important maintenant d'étudier la réponse CD4 ainsi que la capacité des cellules présentatrices d'antigènes à générer in vitro l'induction de lymphocytes T antitumoraux après capture de matériel tumoral. L'analyse de la réponse générée (Th1, Th2 ou Treg) est également à envisager.

Si une application clinique devait se mettre en place, le schéma thérapeutique serait de préparer des suspensions cellulaires vaccinales composées de cellules dendritiques chargées avec une préparation purifiée de cellules tumorales. D'après nos résultats, l'utilisation de cellules nécrotiques est exclue. En revanche, nous pouvons proposer d'utiliser simplement les cellules tumorales irradiées suivies d'une incubation de 3h avec les DC pour permettre la capture d'Ag. L'irradiation γ des cellules éviterait en effet de ne pas avoir à purifier secondairement la préparation DC/B tumoraux pour éliminer les cellules tumorales non phagocytées.

Article 3: Les cellules dendritiques plasmacytoïdes cross-présentent des Ag viraux issus de cellules infectées

Introduction et objectifs : Nous avons montré précédemment que les MDC étaient capables de cross-présenter des Ag cellulaires (viraux et tumoraux). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont aussi des APC. Elles sont retrouvées en particulier au niveau des sites tumoraux sans que l'on connaisse pour le moment leur rôle exact dans la réponse antitumorale. Nous avons donc voulu connaître les capacités de capture et de présentation d'Ag des PDC dans une optique de réponse immune antitumorale. L'absence de méthode d'obtention de PDC in vitro en grande quantité ainsi que la difficulté d'en purifier à partir de prélèvements sanguins ou ganglionnaires freinent le développement de la connaissance des fonctions de ces cellules. Notre laboratoire a généré deux lignées cellulaires à partir de cellules tumorales d'un patient atteint d'une leucémie à PDC (Chaperot et al., 2001). Grâce à l'utilisation d'une de ces lignées, appelée GEN3, nous avons voulu poursuivre notre étude sur l'endocytose des différentes préparations de cellules tumorales par les APC et la cross-présentation d'Ag cellulaires. Nous avons pu mieux définir les capacités d'endocytose des PDC normales vis à vis d'Ag solubles et cellulaire ainsi que leur propriété de cross-présentation d'antigènes viraux provenant de cellules infectées.

Méthode : Nous avons tout d'abord étudié le phénotype des PDC en ciblant sur les molécules pouvant être impliquées dans l'endocytose et la présentation d'Ag. Puis les capacités de pinocytose de la lignée GEN3 et des PDC normales ont également été évaluées en utilisant des marqueurs tels que le Lucifer Yellow (LY), le dextran couplé au FITC (Dex) et l'ovalbumine couplée au FITC (OVA). La phagocytose de cellules a ensuite été évaluée comme décrit précédemment en utilisant des lymphocytes B marqués au PKH26 et traités de différentes façons (apoptose, nécrose, opsonisation). Enfin, les lymphocytes B ont été infectés par le virus de l'influenza et la cross-présentation d'Ag viraux par les PDC aux lymphocytes T CD8⁺ anti-influenza a été évaluée par un dosage d'IFN γ .

Résultats : Les PDC normales et les cellules de la lignée GEN3 expriment les molécules HLA-I et HLA-II mais pas ou peu les molécules CD1a, CD1c et CD1d. En ce qui concerne les

récepteurs potentiellement impliqués dans l'endocytose, les PDC expriment faiblement CD32 et $\alpha\beta 5$, et plus fortement CD36. Les molécules CD16, CD64, le récepteur au mannose (MR), DC-SIGN, CD11b, CD11c et CD91 sont pas ou très faiblement exprimés. L'expression de l'intégrine $\alpha\beta 3$ diffère entre la lignée PDC (positive) et les cellules normales (négative). En terme fonctionnel, les deux types de cellules présentent des capacités de pinocytose faibles comparées aux macrophages et aux cellules dendritiques myéloïdes. Contrairement aux DC myéloïdes, les PDC ne phagocytent pas les cellules tumorales ou non tumorales entières qu'elles soient non traitées ou induites en apoptose, en nécrose ou opsonisées. En revanche, nous montrons que les PDC et GEN3 sont capables d'endocyter des fragments cellulaires à partir de cellules infectées par le virus de l'influenza. De façon tout à fait intéressante, cette endocytose s'accompagne d'une activation cellulaire et permet la cross-présentation d'antigènes viraux.

Conclusion : Comme certains travaux le suggèrent, nous montrons que les PDC ont de faibles capacités d'endocytose mais ne sont pas capables d'endocyter du matériel cellulaire. En revanche, quand ces cellules sont en présence de cellules infectées par le virus de l'influenza, les PDC sont capables d'endocyter du matériel cellulaire et de présenter les antigènes viraux aux lymphocytes T.

Résultats complémentaires et discussion

Nous avons vu précédemment que les cellules de la lignée GEN3 avaient un phénotype semblable à celui des PDC normales. Les deux types de PDC expriment les molécules HLA, mais pas les molécules de la famille CD1 et peu de molécules potentiellement impliquées dans l'endocytose. Les PDC normales peuvent s'activer en présence d'IL-3 ou de virus. Nous avons voulu savoir si l'activation de notre lignée GEN3 par ces activateurs, pouvait modifier l'expression des molécules de présentation d'antigènes ou des récepteurs impliqués dans l'endocytose ainsi que leur capacité d'endocytose elle-même.

Effet de l'IL-3 et du virus de l'influenza sur phénotype de la lignée PDC

Les cellules de la lignée GEN3 ont été incubées en présence d'IL-3 ou du virus de l'influenza pendant 18 heures, puis l'expression de différentes molécules a été examinée par cytométrie en flux. Contrairement aux molécules de présentation d'antigène (figure R11), l'expression des récepteurs d'endocytose (CD16, CD32, CD64, MR, DC-SIGN, CD11b, CD11c, CD36, $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ et $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ et CD91) n'est pas modifiée (résultats non montrés). La figure R11 montre l'augmentation forte de l'expression de CD1a en présence d'IL-3 (54% de cellules CD1a +) tandis que le virus n'induit qu'une faible expression (10% de cellules CD1a +) comme en milieu. Les molécules HLA de classe I sont augmentées en présence de virus, ce qui est bien associé à leur capacité de présentation d'antigènes viraux (Fonteneau et al., 2003).

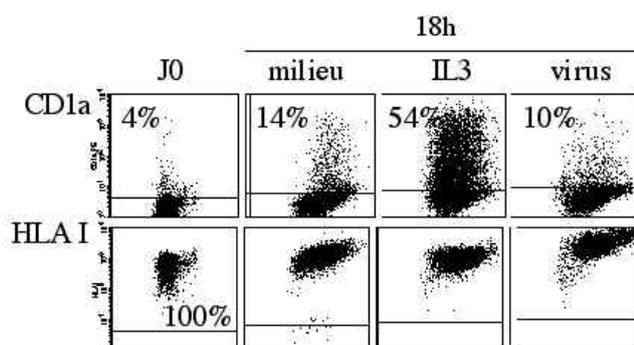


Figure R11 : Effet de l'IL-3 et du virus sur le phénotype des cellules de la lignée GEN3.

Les PDC ont été incubées en milieu ou en présence d'IL-3, ou de virus de l'influenza inactivé pendant 18 heures, à une concentration de 1×10^6 cellules/ml. Les cellules fraîches sont également étudiées (J0). L'expression de CD1a et HLA-I est analysée en cytométrie de flux.

L'augmentation de l'expression de la molécule CD1a sous l'effet de l'IL-3 est

intéressante dans le contexte de la présentation d'antigènes lipidiques. On sait que cette molécule peut présenter des lipides provenant de bactéries comme *Mycobacterium Leprae*, ou Tuberculosis après endocytose (Hunger et al., 2004; Moody et al., 2004). Ainsi, les PDC pourraient jouer un rôle dans la réponse anti-bactérienne. Il n'y a pas à notre connaissance de travaux décrivant l'interaction entre PDC et bactéries. Nous avons essayé d'étudier les capacités de phagocytose de bactéries par la lignée PDC, mais nous n'avons pas pu mettre au point sur ces cellules avec le test commercial disponible. Du fait de la faible expression de CD1a, la PDC pourrait également présenter d'autres types de lipides comme les sulfatides, qui sont des glycosphingolipides présents chez l'homme. Les lipides présentés par les molécules CD1 peuvent activer des cellules comme les lymphocytes NK T (Brigl and Brenner, 2004).

Effet de l'IL-3 et du virus sur les capacités d'endocytose

Dans l'expérience présentée dans la figure R12, nous avons préincubé les GEN3 en présence d'IL-3 et du virus de l'influenza pendant 18 heures, puis examiné leur capacité de pinocytose. Les résultats montrent que ni la culture, ni l'activation par l'IL-3 ou le virus n'ont d'effet sur les capacités de pinocytose des molécules telles que le Lucifer Yellow ou l'Ovabumine-FITC. L'absence d'endocytose du dextran est à rapprocher de l'absence d'expression du récepteur au mannose. Ces résultats opposent les PDC aux DC myéloïdes qui diminuent leur capacité d'endocytose et de phagocytose lors de la maturation (Sallusto et al., 1995). Cependant, il faut rappeler que les DC myéloïdes ont des propriétés d'endocytose nettement plus importantes.

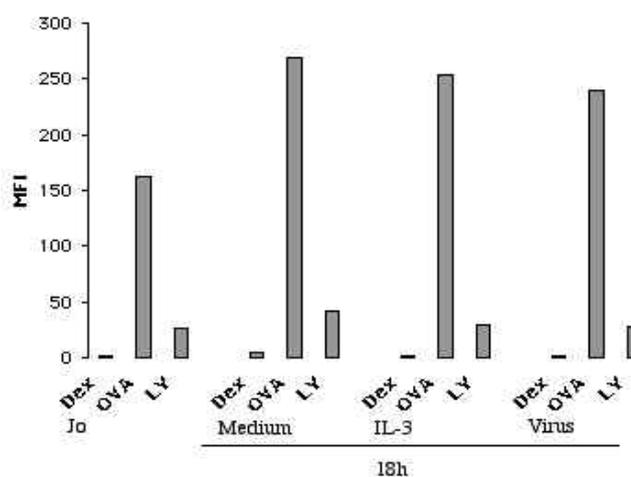


Figure R12 : Effet du virus et de l'IL-3 sur la capacité d'endocytose des cellules de la lignée GEN3.

Les PDC ont été préincubées avec de l'IL-3 (10 ng/ml) ou du virus de l'influenza inactivé pendant 18 heures. Les cellules ont été lavées puis mises en présence de dextran (dex), d'Ovabumine (OVA) (les deux couplés au FITC à 0,1 µg/ml), et de lucifer yellow (LY) (1µg/ml) pendant 2 heures. (résultats représentatifs de 2 expériences) La fluorescence est analysée en cytométrie de flux.

Effet du virus de l'influenza sur la capacité de capture de cellules entières

Nous avons voulu savoir si un signal de maturation fort comme l'infection par le virus de l'influenza pouvait modifier les capacités d'endocytose de matériel cellulaire des cellules infectées par les PDC. Sous l'action du virus, les cellules de la lignée GEN3 s'activent et expriment les molécules CD40 et CD83 (en figure R13A). Après activation des PDC dans ces conditions pendant 18h, les cellules B infectées marquées au PKH26 sont ajoutées. Les PDC matures présentent alors une capacité bien plus faible d'endocytose de matériel cellulaire : le pourcentage de PDC/PKH26+ chutant de 50% pour les PDC non activées à 16% pour les PDC activées (figure R13A).

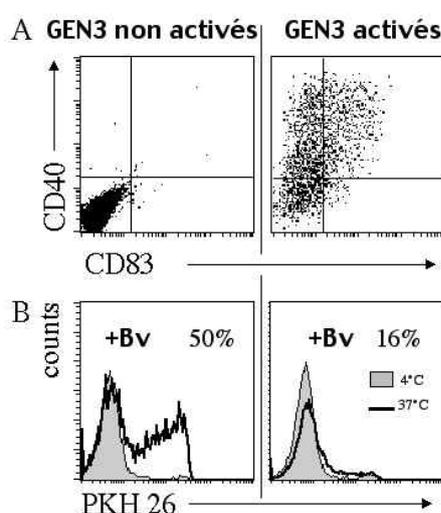


Figure R13 : Effets de l'activation des PDC sur leur capacité d'endocytose.

(A) Les cellules de la lignée GEN3 sont activées ou non en présence de virus de l'influenza pendant 18h, puis marquées par CD40 et CD83 et analysées en cytométrie de flux. (B) Les PDC activées ou non sont mises en présence de lymphocytes B infectés et marqués au PKH26. Les cellules sont ensuite marquées avec le CD36 FITC pour identifier les PDC, et avec le CD20 et CD19 couplés au PC5 pour identifier les lymphocytes B. L'analyse des cellules PKH26+ est réalisée sur les cellules CD36+CD20-CD19-, comme détaillé dans l'article 3. Ces résultats sont représentatifs de 2 expériences.

Il apparaît ainsi que les cellules de la lignée PDC, sous l'effet de l'activation par un virus aient une capacité diminuée d'endocytose de cellules infectées. Nous avons montré que cette endocytose dépendait de l'hémagglutinine sans déterminer toutefois la nature de la molécule exprimée par les PDC fixant l'hémagglutinine. Des études réalisées sur les cellules NK ont montré que celles-ci étaient activées par l'interaction de l'hémagglutinine avec les molécules activatrices NKp46 et NKp44, molécules de la superfamille des Ig(Mandelboim et al., 2001) (Arnon et al., 2001; Pessino et al., 1998). Cette reconnaissance repose sur l'interaction de l'hémagglutinine avec les acides sialiques des molécules NKp(Arnon et al., 2004). L'observation que le récepteur NKp44 est internalisé après liaison avec son ligand sur les cellules NK est intéressante(Campbell et al., 2004). Des données très préliminaires semblent indiquer que

la molécule NKp44 est exprimée sur les cellules de la lignée GEN3. Ceci laisse penser que cette molécule pourrait être responsable de l'endocytose des cellules infectées en fixant l'hémagglutinine. Des expériences d'inhibition utilisant un anticorps bloquant sont envisagées pour confirmer cette hypothèse. D'autre part, la diminution de l'expression de NKp44 à la surface des PDC infectées directement suite à l'interaction avec l'hémagglutinine du virus ou indirectement par internalisation suite à l'activation pourrait expliquer la perte des capacités endocytaires des PDC. Là encore, des expériences complémentaires sont nécessaires et envisagées. Il serait intéressant d'étudier l'effet de l'activation par une autre voie comme la voie du TLR9 du CpG ODN sur ces capacités d'endocytose.

La cross-présentation d'Ag viraux par les GEN3

Nous avons ensuite montré que les cellules de la lignée GEN3 étaient capables de cross-présenter des peptides viraux (provenant de cellules infectées) aux lymphocytes CD8+. De façon un peu surprenante la production d'IFN γ dans ce dernier cas était plus importante que celle obtenue avec les PDC directement infectées. Cette différence de production n'est pas reliée à l'expression des molécules du CMH de classe I similaire dans les 2 cas. En revanche, nous savons que l'activation par le virus entraîne une mortalité des PDC qui n'a pas lieu quand les PDC sont mises en contact avec les cellules infectées. On peut alors penser que l'activation trop forte entraînant une certaine mortalité cellulaire nuit à l'efficacité de présentation.

Par ailleurs, nous avons évoqué la possibilité que la cross-présentation observée ne serait pas la conséquence d'une endocytose de matériel cellulaire de cellules infectées mais d'une capture de virus "collé" aux cellules B. Cependant les expérimentations présentées dans l'article 2 concernant l'infection des cellules B, ont montré à l'aide d'un anticorps anti-nucléoprotéine (NP) de la matrice virale, un marquage cytoplasmique et non membranaire excluant la présence de virus simplement collé à la membrane.

Nous avons montré une cross-présentation d'Ag viraux par les cellules de la lignée GEN3. Il serait intéressant de savoir si les PDC sont aussi capables de cross-présenter des Ag tumoraux; ce qui serait particulièrement intéressant dans l'immunothérapie antitumorale. Le mécanisme et les signaux inducteurs de la cross-présentation par les PDC n'ont pas encore été étudiés mais, comme le suggèrent plusieurs études dans d'autres modèles (Datta et al., 2003; Le Bon et al., 2003), les voies des l'IFN α/β -récepteurs et des TLR sont certainement impliqués dans les PDC.

Sécrétion d'IFN α après endocytose de matériel de cellules infectées

De façon intéressante, nous avons observé (dans une expérience préliminaire qui reste à confirmer) la production d'IFN α par les cellules de la lignée GEN3 après endocytose de matériel cellulaire de lymphocytes B infectés. Cette sécrétion est spécifique des conditions où le virus est présent. Des études récentes ont montré que le TLR-7 était impliqué dans l'induction de la sécrétion d'IFN de type I et que son ligand naturel était l'ARN simple brin contenu dans le virus (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004). Lors de l'endocytose de matériel cellulaire, il est fort probable que, dans des cellules présentatrices d'antigènes que sont les PDC, certains éléments viraux comme les ARN soient orientés vers les compartiments endosomaux contenant le TLR-7, induisant ainsi une cascade de signaux de transcription aboutissant notamment à la sécrétion d'IFN α . Ces hypothèses restent toutefois à vérifier, en particulier sur les PDC normales.

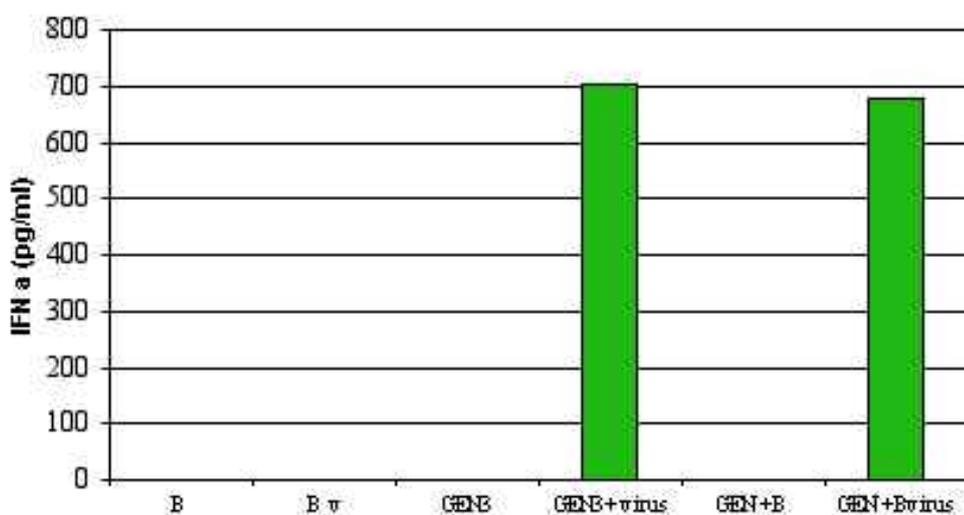


Figure R14 : Sécrétion d'IFN α après contact avec des lymphocytes B infectés.

Les cellules B sont infectées (Bv) ou non (B), pendant 18 heures par le virus de l'influenza. Après infection, les cellules B sont lavées et incubées avec les GEN3 (GEN+B, GEN+Bvirus) pendant 24 heures puis les surnageants sont récupérés pour un dosage d'IFN α par ELISA (résultats représentatifs de deux expériences).

Conclusion

Nous avons montré dans cette étude que les PDC ont une capacité d'endocytose faible, comparée aux macrophages ou aux MDC. Cette particularité est associée à l'absence d'expression de nombreux récepteurs potentiellement impliqués dans cette endocytose. Les DC et les m Φ sont capables de capturer des Ag de cellules non infectées. Les PDC au contraire ne sont pas capables de capturer des Ag de cellules non-infectées, ce qui suggère qu'elles ne peuvent pas être utilisées suivant les mêmes protocoles que mis au point pour les MDC m

immunothérapie antitumorale. En revanche, nous avons observé que les PDC sont capables d'endocyter du matériel de cellules infectées par le virus de l'influenza. Cette endocytose est dépendante du calcium et semble impliquer l'hémagglutinine du virus. Le mécanisme de cette endocytose : phagocytose ou nibbling est encore à définir. De façon tout à fait intéressante, nous montrons que les PDC s'activent secondairement à cette endocytose et qu'elles sont capables de traiter les antigènes viraux pour les présenter efficacement à des lymphocytes T CD8+. Cette propriété permet d'attribuer aux PDC un rôle crucial dans la capture des Ag viraux à partir de cellules infectées et leur présentation au système immunitaire. Ceci est particulièrement intéressant quand on sait que les PDC ne sont pas résidentes dans les muqueuses ou la peau, site d'entrée des virus. Cependant, elles ont la capacité de migrer rapidement du sang vers les tissus périphériques au cours d'une inflammation ou vers les organes lymphoïdes secondaires. Ainsi les PDC recrutées au niveau du site d'entrée du virus pourraient même en absence de virus libre "scanner" les cellules présentes et détecter l'infection par la reconnaissance de molécules virales, comme l'hémagglutinine, exprimées par les cellules infectées. Cette reconnaissance entraînerait l'endocytose de matériel cellulaire contenant les particules virales afin de traiter les antigènes viraux et les présenter aux lymphocytes T pour déclencher la réponse adaptative. Comme après endocytose les cellules s'activent et expriment CCR7 en particulier, elles pourraient alors migrer dans les organes lymphoïdes secondaires et stimuler les lymphocytes T naïfs. Enfin, la sécrétion d'IFN α après endocytose permettrait de polariser la réponse vers la voie Th1. Ces propriétés d'endocytose, de cross-présentation, de migration, et de sécrétion d'IFN α sont des propriétés intéressantes et exploitables en immunothérapie pour activer des lymphocytes T cytotoxiques. L'utilisation de ces données pour une application antitumorale pourrait être envisagée lorsqu'on connaîtra mieux les mécanismes responsables de la capture d'Ag.

Il serait également intéressant d'élargir cette étude en utilisant d'autres virus, comme par exemple un autre virus de la famille des orthomyxoviridae dont le virus de l'influenza fait partie (Dimitrov, 2004), ou un virus d'une autre famille, comme le HSV (Herpes simplex Virus), pour confirmer ce rôle des PDC dans diverses infections virales.

Nous avons essentiellement montré un rôle des PDC dans l'immunité anti-virale, mais leurs propriétés pourraient être utilisées en immunothérapie antitumorale.

Perspectives et conclusion

Perspectives

Utilisation de DC myéloïdes dans les LNHB

Notre étude a pour objectif à terme la mise au point d'un protocole de vaccination dans les LNHB utilisant des cellules présentatrice d'antigènes « pulsées » avec des cellules entières. Cette stratégie de vaccination utilisant les cellules entières est particulièrement intéressante dans le LNHB car, mis à part la télomérase, aucun antigène tumoral commun n'a été isolé dans le lymphome.

D'après nos résultats, l'utilisation de DC myéloïdes apparaît plus appropriée que celle des macrophages, car les DC présentent mieux les antigènes. En terme de préparation cellulaire il semble intéressant d'utiliser simplement des cellules irradiées. La génération d'APC et la purification de cellules tumorales semblent facilement être réalisables en conditions cliniques puisqu'il existe déjà des systèmes validés. Un contact cellulaire de 2h dans un rapport DC/cellules tumorales de 1/3 avant injection pourrait être proposé. Bien sûr, il reste encore à valider un certain nombre de paramètres pour un protocole clinique: par exemple la voie, la dose et la fréquence d'injection, le suivi immunologique des patients, ... Depuis le premier essai clinique utilisant les DC pulsées avec l'idiotype, qui date de 1996(Hsu et al., 1996), les résultats réalisés dans les lymphomes (et dans les autres types de cancers également) sont assez décevants. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces données. Dans la plupart des études cliniques, les patients présentent des métastases et sont en stade très avancé de la maladie. Ils ont souvent subi d'autres traitements (chimiothérapie, radiothérapie, traitement hormonal, chirurgie (Rosenberg et al., 2004)) qui ont affaibli leur système immunitaire. Ce sont donc des situations où le malade n'est peut-être plus en état de monter une réponse immune efficace. Une meilleure sélection des patients capables de répondre semble être nécessaire en fonction par exemple de leur « statut » immunitaire mais aussi du stade de leur maladie et de la nature des traitements reçus au préalable.

Dans un certain nombre de patients atteints de cancers traités par DC, des réponses immunologiques comme la production d'anticorps ou la génération de lymphocytes T

cytotoxiques ont pu être détectées (Reichardt et al., 2003) sans pour autant obtenir des réponses. Cela suggère que les cellules malignes ont développé des moyens d'échappement aux différentes voies de destruction cellulaire, ou que les effecteurs ne peuvent pas accéder aux sites tumoraux. Plus récemment, le rôle de lymphocytes T régulateurs dans l'inhibition d'une réponse antitumorale efficace est fortement suspectée (Curiel et al., 2004b; Viguiier et al., 2004). Dans notre travail, si nous avons montré une cross-présentation d'antigènes tumoraux, des études complémentaires restent à réaliser afin de déterminer quel type de réponse immune les DC chargées avec les cellules vont induire et en particulier s'assurer que l'utilisation de cellules tumorales irradiées permettra de générer des lymphocytes CD4⁺ Th1 plutôt que des lymphocytes CD4⁺ régulateurs.

Les lymphocytes T régulateurs, par des mécanismes encore mal connus, inhiberaient l'action des lymphocytes effecteurs. Dans quelques études cliniques, en même temps que l'injection de DC, de l'IL-2 est ajoutée comme adjuvant. Or l'IL-2 pourrait activer les lymphocytes Treg qui expriment le CD25, la chaîne α du récepteur à l'IL-2. Des études chez la souris ont bien montré que l'IL-2 était particulièrement importante pour les lymphocytes Treg, tandis que les lymphocytes T CD8 et CD4 pouvaient proliférer en présence d'autres cytokines lors d'une réponse immune (Malek and Bayer, 2004). Les travaux de Rosenberg réalisés dans les tumeurs solides reposant sur le transfert adoptif de lymphocytes T CD8 antitumoraux générés *ex vivo* sont assez instructifs. Dans leur protocole, les lymphocytes préexistants des patients (en particulier les Treg) sont éliminés avant l'injection des lymphocytes T effecteurs. Ils ont observé une longue survie des lymphocytes injectés associée à une réponse clinique antitumorale : diminution marquante de la masse tumorale et des métastases, ainsi que des signes d'autoimmunité (Dudley et al., 2002). Une autre étude de la même équipe montre que l'élimination de lymphocytes Treg avec à l'aide d'un Ac anti CTLA-4 avant et pendant la vaccination peut améliorer la réponse lors d'une vaccination avec des peptides. Deux rémissions complètes et plusieurs réponses partielles (diminution de la taille des tumeurs) ont été observées. Parallèlement les patients développent des symptômes d'autoimmunité témoignant de la génération de lymphocytes T cytotoxiques reconnaissant des antigènes aussi exprimés sur les cellules normales (Phan et al., 2003).

Ces études suggèrent que la présence de lymphocytes T régulateurs serait un obstacle de plus à franchir pour l'induction d'une réponse antitumorale efficace. Il y a certainement plusieurs mécanismes empêchant la génération d'une immunité antitumorale. Comme la figure ci-dessous l'illustre, plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour améliorer la réponse immune lors d'une vaccination avec des DC : inhiber les lymphocytes Treg, en bloquant des molécules de costimulation de comme CTLA-4 et PD-1 impliquées dans la tolérance, favoriser l'arrivée des

cellules effectrices sur les sites tumoraux et métastatiques par des signaux pro-inflammatoires, inhiber la prolifération des cellules tumorales et l'action des molécules anti-apoptotiques...

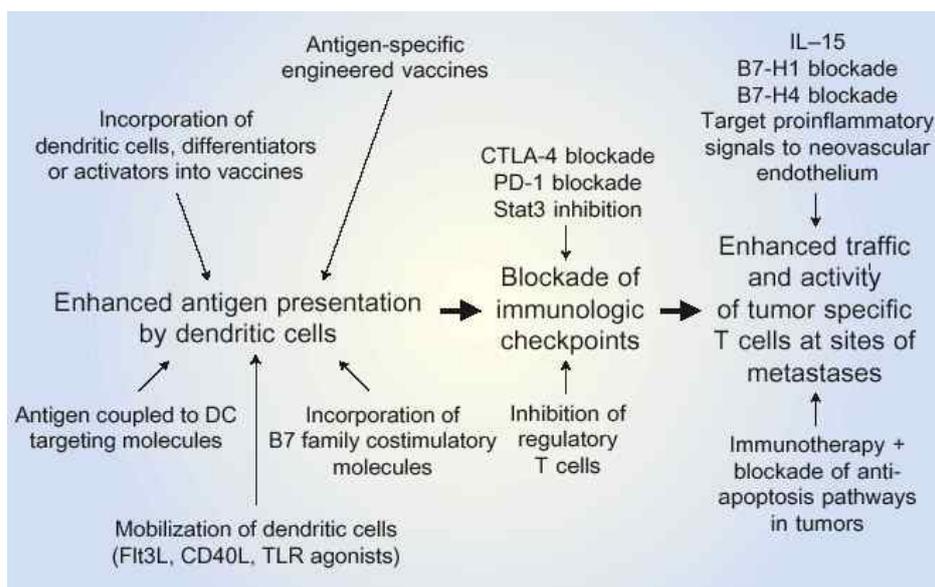


Figure 10 : Multiples points d'intervention pour l'amélioration de l'immunothérapie antitumorale. De (Pardoll and Allison, 2004). On peut intervenir à différents moments de la réponse immune pour favoriser une réponse efficace, du chargement des DC (Ag couplé à des molécules pour cibler les DC), à la migration des cellules effectrices aux sites tumoraux (favoriser la vascularisation pour permettre l'arrivée des cellules effectrices) en passant par l'induction de la réponse lymphocytaire (inhiber les lymphocytes Treg).

Utilisation des PDC en thérapie ?

Parmi les APC, les PDC sont également des cellules capables de présenter des antigènes, en particulier des antigènes viraux (Fonteneau et al., 2003). Leur utilisation en thérapeutique n'est pas d'actualité pour plusieurs raisons : il n'existe pas aujourd'hui de système simple et peu coûteux d'obtention de PDC en quantité suffisante pour une utilisation clinique, et leur capacité à induire des réponses « tolérogènes » dans certaines situations (Gilliet and Liu, 2002; Moseman et al., 2004) appelle à la prudence.

Néanmoins, une activation/maturation des PDC in situ par des adjuvants bien choisis est peut-être plus facilement envisageable. Ainsi, il a été décrit à plusieurs reprises chez l'homme l'utilisation d'imiquimod comme adjuvant de l'immunité dans des tumeurs cutanées comme le carcinome baso-cellulaire et le mélanome (Geisse et al., 2004; Shackleton et al., 2004; Steinmann et al., 2000). L'imiquimod est une molécule chimique aux propriétés anti-virales qui se fixe au TLR7 qui est exprimé chez l'homme sur les PDC mais pas sur les DC myéloïdes. Les PDC activées par des ligands du TLR7 s'activent et produisent de l'IFN α ainsi que d'autres facteurs solubles capables d'activer la réponse immunitaire (Heil et al., 2004; Ito et al., 2002; Jurk et al., 2002). Ainsi l'imiquimod pourrait être utilisé comme adjuvant pour une vaccination avec des antigènes tumoraux afin de stimuler efficacement l'immunité antitumorale in vivo comme le

propose l'équipe de Shackleton (Shackleton et al., 2004).

Nous avons montré que les PDC étaient capables d'endocyter du matériel cellulaire de cellules infectées et de cross-présenter des antigènes viraux. Il nous reste à définir si un tel système est capable d'induire une réponse naïve de type Th1. On peut cependant déjà se demander si les capacités antivirales des PDC ne pourraient pas être mises à profit dans l'immunité antitumorale. Les PDC infectées par des virus sécrètent des chimiokines comme CXCL10 et CCL4 qui induisent la migration des T activés et des NK (Bendriss-Vermare et al., ; Megjugorac et al., 2004). D'autre part, en réponse à l'infection virale les PDC sécrètent de grandes quantités d'IFN α , cytokine qui augmente la cytotoxicité des NK (Orange and Biron, 1996), augmente l'expression des molécules HLA (Luft et al., 2002) et active la réponse T adaptative (Le Bon et al., 2003). Les PDC pourraient donc être intéressantes par leur capacité de cross-présentation des antigènes et le recrutement d'autres cellules de l'immunité. Nous sommes par exemple en train de tester l'utilisation de virosomes-Melan-A sur les PDC. Les virosomes sont en quelques sortes des virus d'Influenza vides dans lesquels on peut ajouter des peptides tumoraux (Poltl-Frank et al., 1999). Ils conservent en particulier l'expression des molécules d'hémagglutinine qui semble importante pour l'entrée de la particule virale dans la cellule.

Si la génération ex-vivo des PDC apparaît pour le moment difficile (Blom et al., 2000), il a été décrit que l'utilisation de Flt-3 ligand ((Maraskovsky et al., 2000; Shackleton et al., 2004)) ou de G-CSF (Arpinati et al., 2003) in vivo permettait d'augmenter à la fois le nombre DC myéloïdes et de PDC dans le sang. Ainsi, il est peut-être envisageable, après traitement cytokinique de solliciter les PDC soit in vivo par injection de préparations vaccinales adéquates, soit in vitro après purification et manipulation cellulaires afin de réaliser un vaccin cellulaire. Les résultats à venir sur la physiologie des PDC et leur rôle dans l'immunologie antitumorale permettront peut-être de choisir une des 2 stratégies. Chez les patients atteints de mélanome, les PDC des patients restent fonctionnelles (Salio et al., 2003). Pulsées avec des peptides ex vivo elles sont capables d'activer des lymphocytes T (Salio et al., 2003). Ces travaux laissent supposer que les PDC ont un rôle à jouer en immunologie antitumorale.

Conclusion

Bien que les résultats des essais cliniques restent décevants, une meilleure compréhension du système immunitaire pourra permettre d'améliorer les protocoles de vaccination pour une amélioration de la survie des patients atteints de cancers.

Les travaux que nous avons réalisés dans ce travail permettent d'envisager un protocole de traitement basé sur l'utilisation de cellules dendritiques myéloïdes et de cellules tumorales

irradiée dans le lymphome B. Cependant, il sera peut-être difficile de mobiliser les hématologues pour mettre en place un tel protocole. En effet il y a deux obstacles majeurs à la réalisation d'un tel projet : 1) la déception des cliniciens face à l'espoir énorme qu'avait suscité les premiers essais de vaccination avec les cellules dendritiques dans le lymphome en particulier et 2) l'efficacité certaine du traitement par le Rituximab, l'anticorps chimérique anti-CD20.

Cependant, le traitement par le Rituximab, n'entraîne pas de guérison et un certain nombre de patients restent réfractaires aux traitements ou sont en échec thérapeutique. D'autres stratégies thérapeutiques peuvent être proposées. Ainsi l'activation des cellules dendritiques in vivo pourrait être une nouvelle piste de recherche.

Références

- Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampe, R., and Cresswell, P. (2003). Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 12889-12894.
- Adams, M., Navabi, H., Jasani, B., Man, S., Fiander, A., Evans, A. S., Donninger, C., and Mason, M. (2003). Dendritic cell (DC) based therapy for cervical cancer: use of DC pulsed with tumour lysate and matured with a novel synthetic clinically non-toxic double stranded RNA analogue poly [I]:poly [C(12)U] (Ampligen R). *Vaccine* *21*, 787-790.
- Adema, G. J., Hartgers, F., Verstraten, R., de Vries, E., Marland, G., Menon, S., Foster, J., Xu, Y., Nooyen, P., McClanahan, T., *et al.* (1997). A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* *387*, 713-717.
- Aderem, A., and Ulevitch, R. J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* *406*, 782-787.
- Aderem, A., and Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* *17*, 593-623.
- Akbari, O., Freeman, G. J., Meyer, E. H., Greenfield, E. A., Chang, T. T., Sharpe, A. H., Berry, G., DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T. (2002). Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* *8*, 1024-1032.
- Akiyama, K., Ebihara, S., Yada, A., Matsumura, K., Aiba, S., Nukiwa, T., and Takai, T. (2003). Targeting apoptotic tumor cells to Fc gamma R provides efficient and versatile vaccination against tumors by dendritic cells. *J Immunol* *170*, 1641-1648.
- Albert, M. L. (2004). Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation? *Nat Rev Immunol* *4*, 223-231.
- Albert, M. L., Jegathesan, M., and Darnell, R. B. (2001). Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* *2*, 1010-1017.
- Albert, M. L., Kim, J. I., and Birge, R. B. (2000). alphavbeta5 integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Cell Biol* *2*, 899-905.
- Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L., and Bhardwaj, N. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* *188*, 1359-1368.
- Alexandroff, A. B., Jackson, A. M., O'Donnell, M. A., and James, K. (1999). BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *Lancet* *353*, 1689-1694.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* *413*, 732-738.
- Allavena, P., Sica, A., Vecchi, A., Locati, M., Sozzani, S., and Mantovani, A. (2000). The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor

tissues. *Immunol Rev* 177, 141-149.

Amoscato, A. A., Prenovitz, D. A., and Lotze, M. T. (1998). Rapid extracellular degradation of synthetic class I peptides by human dendritic cells. *J Immunol* 161, 4023-4032.

Ancuta, P., Rao, R., Moses, A., Mehle, A., Shaw, S. K., Luscinskas, F. W., and Gabuzda, D. (2003). Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16⁺ monocytes. *J Exp Med* 197, 1701-1707.

Anderson, C. F., and Mosser, D. M. (2002). Cutting edge: biasing immune responses by directing antigen to macrophage Fc gamma receptors. *J Immunol* 168, 3697-3701.

Andersson, U., Wang, H., Palmblad, K., Aveberger, A. C., Bloom, O., Erlandsson-Harris, H., Janson, A., Kokkola, R., Zhang, M., Yang, H., and Tracey, K. J. (2000). High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med* 192, 565-570.

Andre, P., Biassoni, R., Colonna, M., Cosman, D., Lanier, L. L., Long, E. O., Lopez-Botet, M., Moretta, A., Moretta, L., Parham, P., *et al.* (2001). New nomenclature for MHC receptors. *Nat Immunol* 2, 661.

Arnon, T. I., Achdout, H., Lieberman, N., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Katz, G., Bar-Ilan, A., Bloushstein, N., Lev, M., Joseph, A., *et al.* (2004). The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46. *Blood* 103, 664-672.

Arnon, T. I., Lev, M., Katz, G., Chernobrov, Y., Porgador, A., and Mandelboim, O. (2001). Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol* 31, 2680-2689.

Arpinati, M., Chirumbolo, G., Urbini, B., Perrone, G., Rondelli, D., and Anasetti, C. (2003). Role of plasmacytoid dendritic cells in immunity and tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Immunol* 11, 345-356.

Azuma, I., and Seya, T. (2001). Development of immunoadjuvants for immunotherapy of cancer. *Int Immunopharmacol* 1, 1249-1259.

Bahram, S., Bresnahan, M., Geraghty, D. E., and Spies, T. (1994). A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6259-6263.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.

Banki, Z., Kacani, L., Mullauer, B., Wilflingseder, D., Obermoser, G., Niederegger, H., Schennach, H., Sprinzl, G. M., Sepp, N., Erdei, A., *et al.* (2003). Cross-linking of CD32 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells via NF-kappa B signaling pathway. *J Immunol* 170, 3963-3970.

Baribaud, F., Pohlmann, S., Leslie, G., Mortari, F., and Doms, R. W. (2002). Quantitative expression and virus transmission analysis of DC-SIGN on monocyte-derived dendritic cells. *J Virol* 76, 9135-9142.

Bartholeyns, J., Lopez, M., and Andreesen, R. (1991). Adoptive immunotherapy of solid tumors with activated macrophages: experimental and clinical results. *Anticancer Res* 11, 1201-1204.

Baskar, S., Kobrin, C. B., and Kwak, L. W. (2004). Autologous lymphoma vaccines induce human T cell responses against multiple, unique epitopes. *J Clin Invest* 113, 1498-1510.

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

Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M., and Srivastava, P. K. (2000). Necrotic but not

- apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* *12*, 1539-1546.
- Bauer, M., Redecke, V., Ellwart, J. W., Scherer, B., Kremer, J. P., Wagner, H., and Lipford, G. B. (2001a). Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J Immunol* *166*, 5000-5007.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* *285*, 727-729.
- Bauer, S., Kirschning, C. J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., and Lipford, G. B. (2001b). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 9237-9242.
- Bave, U., Magnusson, M., Eloranta, M. L., Perers, A., Alm, G. V., and Ronnblom, L. (2003). Fc gamma RIIa is expressed on natural IFN-alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) and is required for the IFN-alpha production induced by apoptotic cells combined with lupus IgG. *J Immunol* *171*, 3296-3302.
- Bellone, G., Aste-Amezaga, M., Trinchieri, G., and Rodeck, U. (1995). Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1. *J Immunol* *155*, 1066-1073.
- Bellone, G., Turletti, A., Artusio, E., Mareschi, K., Carbone, A., Tibaudi, D., Robecchi, A., Emanuelli, G., and Rodeck, U. (1999). Tumor-associated transforming growth factor-beta and interleukin-10 contribute to a systemic Th2 immune phenotype in pancreatic carcinoma patients. *Am J Pathol* *155*, 537-547.
- Bendandi, M. (2000). Anti-idiotypic vaccines for human follicular lymphoma. *Leukemia* *14*, 1333-1339.
- Bendriss-Vermare, N., Barthelemy, C., Durand, I., Bruand, C., Dezutter-Dambuyant, C., Mouliau, N., Berrih-Aknin, S., Caux, C., Trinchieri, G., and Briere, F. (2001). Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. *J Clin Invest* *107*, 835-844.
- Bendriss-Vermare, N., Burg, S., Kanzler, H., Chaperot, L., Duhon, T., de Bouteiller, O., D'agostini, M., Bridon, J. M., Durand, I., Sederstrom, J. M., *et al.* Type 1 and type 2-promoting signals of plasmacytoid dendritic cells induce NK and CD4 memory T cell migration.
- Bladergroen, B. A., Meijer, C. J., ten Berge, R. L., Hack, C. E., Muris, J. J., Dukers, D. F., Chott, A., Kazama, Y., Oudejans, J. J., van Berkum, O., and Kummer, J. A. (2002). Expression of the granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, by tumor cells in patients with non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma: a novel protective mechanism for tumor cells to circumvent the immune system? *Blood* *99*, 232-237.
- Blom, B., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y. J. (2000). Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J Exp Med* *192*, 1785-1796.
- Blomberg, S., Eloranta, M. L., Cederblad, B., Nordlin, K., Alm, G. V., and Ronnblom, L. (2001). Presence of cutaneous interferon-alpha producing cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* *10*, 484-490.
- Bluestone, J. A., and Abbas, A. K. (2003). Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* *3*, 253-257.
- Bogdan (2001). Macrophages. *encyclopedia of life sciences*.
- Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P. P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P. A., Mantovani, A., and Sinigaglia, F. (1998). Differential expression of

chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 187, 129-134.

Bong, A. B., Bonnekoh, B., Franke, I., Schon, M. P., Ulrich, J., and Gollnick, H. (2002). Imiquimod, a topical immune response modifier, in the treatment of cutaneous metastases of malignant melanoma. *Dermatology* 205, 135-138.

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

Bonnerot, C., Briken, V., Brachet, V., Lankar, D., Cassard, S., Jabri, B., and Amigorena, S. (1998). syk protein tyrosine kinase regulates Fc receptor gamma-chain-mediated transport to lysosomes. *Embo J* 17, 4606-4616.

Bossi, G., Trambas, C., Booth, S., Clark, R., Stinchcombe, J., and Griffiths, G. M. (2002). The secretory synapse: the secrets of a serial killer. *Immunol Rev* 189, 152-160.

Bots, M., Kolfshoten, I. G., Bres, S. A., Rademaker, M. T., De Roo, G. M., Kruse, M., Franken, K. L., Hahne, M., Froelich, C. J., Melief, C. J., *et al.* (2004). SPI-CI and SPI-6 cooperate in the protection from effector cell-mediated cytotoxicity. *Blood*.

Brigl, M., and Brenner, M. B. (2004). CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* 22, 817-890.

Brown, R. D., Pope, B., Murray, A., Esdale, W., Sze, D. M., Gibson, J., Ho, P. J., Hart, D., and Joshua, D. (2001). Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin-10. *Blood* 98, 2992-2998.

Buelens, C., Willems, F., Delvaux, A., Pierard, G., Delville, J. P., Velu, T., and Goldman, M. (1995). Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *Eur J Immunol* 25, 2668-2672.

Buggins, A. G., Milojkovic, D., Arno, M. J., Lea, N. C., Mufti, G. J., Thomas, N. S., and Hirst, W. J. (2001). Microenvironment produced by acute myeloid leukemia cells prevents T cell activation and proliferation by inhibition of NF-kappaB, c-Myc, and pRb pathways. *J Immunol* 167, 6021-6030.

Caldwell, S., Heitger, A., Shen, W., Liu, Y., Taylor, B., and Ladisch, S. (2003). Mechanisms of ganglioside inhibition of APC function. *J Immunol* 171, 1676-1683.

Campbell, K. S., Yusa, S., Kikuchi-Maki, A., and Catina, T. L. (2004). NKp44 triggers NK cell activation through DAP12 association that is not influenced by a putative cytoplasmic inhibitory sequence. *J Immunol* 172, 899-906.

Cascino, I., Papoff, G., De Maria, R., Testi, R., and Ruberti, G. (1996). Fas/Apo-1 (CD95) receptor lacking the intracytoplasmic signaling domain protects tumor cells from Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 156, 13-17.

Castriconi, R., Cantoni, C., Della Chiesa, M., Vitale, M., Marcenaro, E., Conte, R., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (2003). Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4120-4125.

Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., and Banchereau, J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180, 1263-1272.

- Cecil, A. A., and Klemsz, M. J. (2004). p38 activation through Toll-like receptors modulates IFN-gamma-induced expression of the Tap-1 gene only in macrophages. *J Leukoc Biol* 75, 560-568.
- Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (2000). Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* 1, 305-310.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5, 919-923.
- Chaperot, L., Bendriss, N., Manches, O., Gressin, R., Maynadie, M., Trimoreau, F., Orfeuvre, H., Corront, B., Feuillard, J., Sotto, J. J., *et al.* (2001). Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 97, 3210-3217.
- Chaperot, L., Chokri, M., Jacob, M. C., Drillat, P., Garban, F., Egelhofer, H., Molens, J. P., Sotto, J. J., Bensa, J. C., and Plumas, J. (2000a). Differentiation of antigen-presenting cells (dendritic cells and macrophages) for therapeutic application in patients with lymphoma. *Leukemia* 14, 1667-1677.
- Chaperot, L., Delfau-Larue, M. H., Jacob, M. C., Molens, J. P., Roussel, B., Agrawal, S., Farcet, J. P., Gressin, R., Sotto, J. J., Bensa, J. C., and Plumas, J. (1999a). Differentiation of antitumor-specific cytotoxic T lymphocytes from autologous tumor infiltrating lymphocytes in non-Hodgkin's lymphomas. *Exp Hematol* 27, 1185-1193.
- Chaperot, L., Jacob, M. C., Le Vacon, F., Giroux, C., Molens, J. P., Sotto, J. J., Bensa, J. C., and Plumas, J. (1997). Relationships between susceptibility to LAK cell-mediated lysis, conjugate formation and expression of adhesion molecules in B-cell derived non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 28, 133-143.
- Chaperot, L., Jacob, M. C., Molens, J. P., Manches, O., Bensa, J. C., and Plumas, J. (2000b). From the study of tumor cell immunogenicity to the generation of antitumor cytotoxic cells in non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 38, 247-263.
- Chaperot, L., Manches, O., Mi, J. Q., Moine, A., Jacob, M. C., Gressin, R., Molens, J. P., Sotto, J. J., Leroux, D., Bensa, J. C., and Plumas, J. (2002). Differentiation of anti-tumour cytotoxic T lymphocytes from autologous peripheral blood lymphocytes in non-Hodgkin's lymphomas. *Br J Haematol* 119, 425-431.
- Chaperot, L., Plumas, J., Jacob, M. C., Bost, F., Molens, J. P., Sotto, J. J., and Bensa, J. C. (1999b). Functional expression of CD80 and CD86 allows immunogenicity of malignant B cells from non-Hodgkin's lymphomas. *Exp Hematol* 27, 479-488.
- Chen, L. C., Dollbaum, C., and Smith, H. S. (1989). Loss of heterozygosity on chromosome 1q in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7204-7207.
- Chen, W. (2003). Expert Opinion on therapeutic patents, 1787.
- Chen, W., Antonenko, S., Sederstrom, J. M., Liang, X., Chan, A. S., Kanzler, H., Blom, B., Blazar, B. R., and Liu, Y. J. (2004a). Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors. *Blood* 103, 2547-2553.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198, 1875-1886.
- Chen, X., Doffek, K., Sugg, S. L., and Shilyansky, J. (2004b). Phosphatidylserine regulates the maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 173, 2985-2994.

- Chen, Y. T., Scanlan, M. J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A. O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old, L. J. (1997). A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 1914-1918.
- Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J., and Palucka, A. K. (2000). IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* *1*, 510-514.
- Chomarat, P., Dantin, C., Bennett, L., Banchereau, J., and Palucka, A. K. (2003). TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. *J Immunol* *171*, 2262-2269.
- Chow, A., Toomre, D., Garrett, W., and Mellman, I. (2002). Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. *Nature* *418*, 988-994.
- Christoforidis, S., McBride, H. M., Burgoyne, R. D., and Zerial, M. (1999). The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* *397*, 621-625.
- Cocco, R. E., and Ucker, D. S. (2001). Distinct modes of macrophage recognition for apoptotic and necrotic cells are not specified exclusively by phosphatidylserine exposure. *Mol Biol Cell* *12*, 919-930.
- Conner, S. D., and Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* *422*, 37-44.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., and Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* *22*, 633-640.
- Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C. L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., and Chalupny, N. J. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* *14*, 123-133.
- Costello, R. T., Fauriat, C., Sivori, S., Marcenaro, E., and Olive, D. (2004). NK cells: innate immunity against hematological malignancies? *Trends Immunol* *25*, 328-333.
- Coulie, P. G., Karanikas, V., Lurquin, C., Colau, D., Connerotte, T., Hanagiri, T., Van Pel, A., Lucas, S., Godelaine, D., Lonchay, C., *et al.* (2002). Cytolytic T-cell responses of cancer patients vaccinated with a MAGE antigen. *Immunol Rev* *188*, 33-42.
- Coventry, B., and Heinzl, S. (2004). CD1a in human cancers: a new role for an old molecule. *Trends Immunol* *25*, 242-248.
- Cox, D., Berg, J. S., Cammer, M., Chingwundoh, J. O., Dale, B. M., Cheney, R. E., and Greenberg, S. (2002). Myosin X is a downstream effector of PI(3)K during phagocytosis. *Nat Cell Biol* *4*, 469-477.
- Croft, M. (2003). Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* *3*, 609-620.
- Curiel, T. J., Cheng, P., Mottram, P., Alvarez, X., Moons, L., Evdemon-Hogan, M., Wei, S., Zou, L., Kryczek, I., Hoyle, G., *et al.* (2004a). Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Res* *64*, 5535-5538.
- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., *et al.* (2004b). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* *10*, 942-949.
- Datta, S. K., Redecke, V., Prilliman, K. R., Takabayashi, K., Corr, M., Tallant, T., DiDonato, J., Dziarski, R., Akira, S., Schoenberger, S. P., and Raz, E. (2003). A subset of Toll-like receptor

- ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunol* *170*, 4102-4110.
- de Fraissinette, A., Schmitt, D., and Thivolet, J. (1989). Langerhans cells of human mucosa. *J Dermatol* *16*, 255-262.
- de la Rosa, G., Longo, N., Rodriguez-Fernandez, J. L., Puig-Kroger, A., Pineda, A., Corbi, A. L., and Sanchez-Mateos, P. (2003). Migration of human blood dendritic cells across endothelial cell monolayers: adhesion molecules and chemokines involved in subset-specific transmigration. *J Leukoc Biol* *73*, 639-649.
- de Saint-Vis, B., Vincent, J., Vandenabeele, S., Vanbervliet, B., Pin, J. J., Ait-Yahia, S., Patel, S., Mattei, M. G., Banchereau, J., Zurawski, S., *et al.* (1998). A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* *9*, 325-336.
- de Waal Malefyt, R., Yssel, H., and de Vries, J. E. (1993). Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4⁺ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol* *150*, 4754-4765.
- Delamarre, L., Holcombe, H., and Mellman, I. (2003). Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. *J Exp Med* *198*, 111-122.
- Delneste, Y., Magistrelli, G., Gauchat, J., Haeuw, J., Aubry, J., Nakamura, K., Kawakami-Honda, N., Goetsch, L., Sawamura, T., Bonnefoy, J., and Jeannin, P. (2002). Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* *17*, 353-362.
- Denecker, G., Vercammen, D., Steemans, M., Vanden Berghe, T., Brouckaert, G., Van Loo, G., Zhivotovsky, B., Fiers, W., Grooten, J., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (2001). Death receptor-induced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspases and mitochondria. *Cell Death Differ* *8*, 829-840.
- Derynck, R., Akhurst, R. J., and Balmain, A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* *29*, 117-129.
- Dhodapkar, K. M., Krasovsky, J., Williamson, B., and Dhodapkar, M. V. (2002a). Antitumor monoclonal antibodies enhance cross-presentation of cellular antigens and the generation of myeloma-specific killer T cells by dendritic cells. *J Exp Med* *195*, 125-133.
- Dhodapkar, M. V., Krasovsky, J., and Olson, K. (2002b). T cells from the tumor microenvironment of patients with progressive myeloma can generate strong, tumor-specific cytolytic responses to autologous, tumor-loaded dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 13009-13013.
- Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovsky, J., Munz, C., and Bhardwaj, N. (2001). Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* *193*, 233-238.
- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* *303*, 1529-1531.
- Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* *188*, 373-386.
- Dieu-Nosjean, M. C., Vicari, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1999). Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J Leukoc Biol* *66*,

252-262.

- Dimitrov, D. S. (2004). Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* 2, 109-122.
- Disis, M. L., Rinn, K., Knutson, K. L., Davis, D., Caron, D., dela Rosa, C., and Schiffman, K. (2002). Flt3 ligand as a vaccine adjuvant in association with HER-2/neu peptide-based vaccines in patients with HER-2/neu-overexpressing cancers. *Blood* 99, 2845-2850.
- Draberova, L., Dudkova, L., Boubelik, M., Tolarova, H., Smid, F., and Draber, P. (2003). Exogenous administration of gangliosides inhibits Fc epsilon RI-mediated mast cell degranulation by decreasing the activity of phospholipase C gamma. *J Immunol* 171, 3585-3593.
- Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4, 11-22.
- Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Robbins, P. F., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R., Restifo, N. P., Hubicki, A. M., *et al.* (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-854.
- Dunbar, P. R., Smith, C. L., Chao, D., Salio, M., Shepherd, D., Mirza, F., Lipp, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., Evans, A., *et al.* (2000). A shift in the phenotype of melan-A-specific CTL identifies melanoma patients with an active tumor-specific immune response. *J Immunol* 165, 6644-6652.
- Dunn, G. P., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22, 329-360.
- Dutoit, V., Rubio-Godoy, V., Dietrich, P. Y., Quiqueres, A. L., Schnuriger, V., Rimoldi, D., Lienard, D., Speiser, D., Guillaume, P., Batard, P., *et al.* (2001). Heterogeneous T-cell response to MAGE-A10(254-262): high avidity-specific cytolytic T lymphocytes show superior antitumor activity. *Cancer Res* 61, 5850-5856.
- Dutronec, Y., and Porcelli, S. A. (2002). The CD1 family and T cell recognition of lipid antigens. *Tissue Antigens* 60, 337-353.
- Dyall, R., Bowne, W. B., Weber, L. W., LeMaout, J., Szabo, P., Moroi, Y., Piskun, G., Lewis, J. J., Houghton, A. N., and Nikolic-Zugic, J. (1998). Heteroclitic immunization induces tumor immunity. *J Exp Med* 188, 1553-1561.
- Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D. W., and Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 165, 6037-6046.
- England, R. D., Kullberg, M. C., Cornette, J. L., and Berzofsky, J. A. (1995). Molecular analysis of a heteroclitic T cell response to the immunodominant epitope of sperm whale myoglobin. Implications for peptide partial agonists. *J Immunol* 155, 4295-4306.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Guthrie, L., and Henson, P. M. (2001). Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. *J Immunol* 166, 6847-6854.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., and Henson, P. M. (1998a). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101, 890-898.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A., and Henson, P. M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405, 85-90.

- Fadok, V. A., and Chimini, G. (2001). The phagocytosis of apoptotic cells. *Semin Immunol* *13*, 365-372.
- Fadok, V. A., Warner, M. L., Bratton, D. L., and Henson, P. M. (1998b). CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *J Immunol* *161*, 6250-6257.
- Fanger, N. A., Wardwell, K., Shen, L., Tedder, T. F., and Guyre, P. M. (1996). Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol* *157*, 541-548.
- Farkas, L., Beiske, K., Lund-Johansen, F., Brandtzaeg, P., and Jahnsen, F. L. (2001). Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol* *159*, 237-243.
- Ferlazzo, G., Semino, C., Spaggiari, G. M., Meta, M., Mingari, M. C., and Melioli, G. (2000). Dendritic cells efficiently cross-prime HLA class I-restricted cytolytic T lymphocytes when pulsed with both apoptotic and necrotic cells but not with soluble cell-derived lysates. *Int Immunol* *12*, 1741-1747.
- Fiebiger, E., Meraner, P., Weber, E., Fang, I. F., Stingl, G., Ploegh, H., and Maurer, D. (2001). Cytokines regulate proteolysis in major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by dendritic cells. *J Exp Med* *193*, 881-892.
- Fields, P. E., Finch, R. J., Gray, G. S., Zollner, R., Thomas, J. L., Sturmhoefel, K., Lee, K., Wolf, S., Gajewski, T. F., and Fitch, F. W. (1998). B7.1 is a quantitatively stronger costimulus than B7.2 in the activation of naive CD8+ TCR-transgenic T cells. *J Immunol* *161*, 5268-5275.
- Figdor, C. G., de Vries, I. J., Lesterhuis, W. J., and Melief, C. J. (2004). Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med* *10*, 475-480.
- Figdor, C. G., van Kooyk, Y., and Adema, G. J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* *2*, 77-84.
- Findley, H. W., Gu, L., Yeager, A. M., and Zhou, M. (1997). Expression and regulation of Bcl-2, Bcl-xl, and Bax correlate with p53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* *89*, 2986-2993.
- Fithian, E., Kung, P., Goldstein, G., Rubinfeld, M., Fenoglio, C., and Edelson, R. (1981). Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* *78*, 2541-2544.
- Fiuza, C., Bustin, M., Talwar, S., Tropea, M., Gerstenberger, E., Shelhamer, J. H., and Suffredini, A. F. (2003). Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood* *101*, 2652-2660.
- Fonteneau, J. F., Gilliet, M., Larsson, M., Dasilva, I., Munz, C., Liu, Y. J., and Bhardwaj, N. (2003). Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* *101*, 3520-3526.
- Fournel, S., Aguerre-Girr, M., Huc, X., Lenfant, F., Alam, A., Toubert, A., Bensussan, A., and Le Bouteiller, P. (2000). Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. *J Immunol* *164*, 6100-6104.
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., *et al.* (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* *192*, 1027-1034.
- Freire-de-Lima, C. G., Nascimento, D. O., Soares, M. B., Bozza, P. T., Castro-Faria-Neto, H. C., de Mello, F. G., DosReis, G. A., and Lopes, M. F. (2000). Uptake of apoptotic cells drives the

- growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* *403*, 199-203.
- Gaipl, U. S., Kuenkele, S., Voll, R. E., Beyer, T. D., Kolowos, W., Heyder, P., Kalden, J. R., and Herrmann, M. (2001). Complement binding is an early feature of necrotic and a rather late event during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* *8*, 327-334.
- Galizia, G., Orditura, M., Romano, C., Lieto, E., Castellano, P., Pelosio, L., Imperatore, V., Catalano, G., Pignatelli, C., and De Vita, F. (2002). Prognostic significance of circulating IL-10 and IL-6 serum levels in colon cancer patients undergoing surgery. *Clin Immunol* *102*, 169-178.
- Gao, Y., Yang, W., Pan, M., Scully, E., Girardi, M., Augenlicht, L. H., Craft, J., and Yin, Z. (2003). Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. *J Exp Med* *198*, 433-442.
- Garcia-Garcia, E., and Rosales, C. (2002). Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* *72*, 1092-1108.
- Gardai, S. J., Xiao, Y. Q., Dickinson, M., Nick, J. A., Voelker, D. R., Greene, K. E., and Henson, P. M. (2003). By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell* *115*, 13-23.
- Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Perez-Villar, J. J., Lopez-Botet, M., Duggan-Keen, M., and Stern, P. L. (1997). Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* *18*, 89-95.
- Gary-Gouy, H., Harriague, J., Bismuth, G., Platzer, C., Schmitt, C., and Dalloul, A. H. (2002). Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production. *Blood* *100*, 4537-4543.
- Gati, A., Da Rocha, S., Guerra, N., Escudier, B., Moretta, A., Chouaib, S., Angevin, E., and Caignard, A. (2004). Analysis of the natural killer mediated immune response in metastatic renal cell carcinoma patients. *Int J Cancer* *109*, 393-401.
- Gaulard, P. (2000). Lymphomes non Hodgkiniens. *Médecine Thérapeutique* *6*, 343.
- Geijtenbeek, T. B., Krooshoop, D. J., Bleijs, D. A., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Grabovsky, V., Alon, R., Figdor, C. G., and van Kooyk, Y. (2000). DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* *1*, 353-357.
- Geisse, J., Caro, I., Lindholm, J., Golitz, L., Stampone, P., and Owens, M. (2004). Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *J Am Acad Dermatol* *50*, 722-733.
- Geissmann, F., Dieu-Nosjean, M. C., Dezutter, C., Valladeau, J., Kayal, S., Leborgne, M., Brousse, N., Saeland, S., and Davoust, J. (2002). Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin. *J Exp Med* *196*, 417-430.
- Geissmann, F., Revy, P., Regnault, A., Lepelletier, Y., Dy, M., Brousse, N., Amigorena, S., Hermine, O., and Durandy, A. (1999). TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol* *162*, 4567-4575.
- Ghielmini, M., Schmitz, S. F., Cogliatti, S. B., Pichert, G., Hummerjohann, J., Waltzer, U., Fey, M. F., Betticher, D. C., Martinelli, G., Peccatori, F., *et al.* (2004). Prolonged treatment with rituximab in patients with follicular lymphoma significantly increases event-free survival and response duration compared with the standard weekly x 4 schedule. *Blood* *103*, 4416-4423.
- Gibson, S. J., Lindh, J. M., Riter, T. R., Gleason, R. M., Rogers, L. M., Fuller, A. E., Oesterich, J. L., Gorden, K. B., Qiu, X., McKane, S. W., *et al.* (2002). Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cell Immunol* *218*, 74-86.

- Gilliet, M., and Liu, Y. J. (2002). Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* *195*, 695-704.
- Goldmann, O., Rohde, M., Chhatwal, G. S., and Medina, E. (2004). Role of macrophages in host resistance to group A streptococci. *Infect Immun* *72*, 2956-2963.
- Gordon (1999). *Fundamental Immunology*. In, pp. 533.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* *3*, 23-35.
- Gorelik, L., Fields, P. E., and Flavell, R. A. (2000). Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J Immunol* *165*, 4773-4777.
- Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., and Dustin, M. L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* *285*, 221-227.
- Granucci, F., Petralia, F., Urbano, M., Citterio, S., Di Tota, F., Santambrogio, L., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2003). The scavenger receptor MARCO mediates cytoskeleton rearrangements in dendritic cells and microglia. *Blood* *102*, 2940-2947.
- Gregoire, M., Ligeza-Poisson, C., Juge-Morineau, N., and Spisek, R. (2003). Anti-cancer therapy using dendritic cells and apoptotic tumour cells: pre-clinical data in human mesothelioma and acute myeloid leukaemia. *Vaccine* *21*, 791-794.
- Gregory, C. D. (2000). CD14-dependent clearance of apoptotic cells: relevance to the immune system. *Curr Opin Immunol* *12*, 27-34.
- Gregory, C. D., Murray, R. J., Edwards, C. F., and Rickinson, A. B. (1988). Downregulation of cell adhesion molecules LFA-3 and ICAM-1 in Epstein-Barr virus-positive Burkitt's lymphoma underlies tumor cell escape from virus-specific T cell surveillance. *J Exp Med* *167*, 1811-1824.
- Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., and Spies, T. (1996). Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 12445-12450.
- Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M. S., Riddell, S. R., and Spies, T. (2001). Costimulation of CD8alpha T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* *2*, 255-260.
- Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K. H., and Spies, T. (1999). Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 6879-6884.
- Groh, V., Steinle, A., Bauer, S., and Spies, T. (1998). Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* *279*, 1737-1740.
- Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* *419*, 734-738.
- Grouard, G., Risoan, M. C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y. J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* *185*, 1101-1111.
- Guedez, L., Mansoor, A., Birkedal-Hansen, B., Lim, M. S., Fukushima, P., Venzon, D., Stetler-Stevenson, W. G., and Stetler-Stevenson, M. (2001). Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 regulation of interleukin-10 in B-cell differentiation and lymphomagenesis. *Blood* *97*, 1796-1802.
- Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., and Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* *425*, 397-402.

- Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (2002). Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* *417*, 182-187.
- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Stein, H., Banks, P. M., Chan, J. K., Cleary, M. L., Delsol, G., De Wolf-Peeters, C., Falini, B., and Gatter, K. C. (1994). A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* *84*, 1361-1392.
- Harshyne, L. A., Watkins, S. C., Gambotto, A., and Barratt-Boyes, S. M. (2001). Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol* *166*, 3717-3723.
- Harshyne, L. A., Zimmer, M. I., Watkins, S. C., and Barratt-Boyes, S. M. (2003). A role for class A scavenger receptor in dendritic cell nibbling from live cells. *J Immunol* *170*, 2302-2309.
- Hart, J. P., Gunn, M. D., and Pizzo, S. V. (2004). A CD91-positive subset of CD11c+ blood dendritic cells: characterization of the APC that functions to enhance adaptive immune responses against CD91-targeted antigens. *J Immunol* *172*, 70-78.
- Hart, P. H., Bonder, C. S., Balogh, J., Dickensheets, H. L., Donnelly, R. P., and Finlay-Jones, J. J. (1999). Differential responses of human monocytes and macrophages to IL-4 and IL-13. *J Leukoc Biol* *66*, 575-578.
- Heath, W. R., and Carbone, F. R. (2001). Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* *1*, 126-134.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* *303*, 1526-1529.
- Hellstrom, I., Ledbetter, J. A., Scholler, N., Yang, Y., Ye, Z., Goodman, G., Pullman, J., Hayden-Ledbetter, M., and Hellstrom, K. E. (2001). CD3-mediated activation of tumor-reactive lymphocytes from patients with advanced cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 6783-6788.
- Hemmer, B., Stefanova, I., Vergelli, M., Germain, R. N., and Martin, R. (1998). Relationships among TCR ligand potency, thresholds for effector function elicitation, and the quality of early signaling events in human T cells. *J Immunol* *160*, 5807-5814.
- Henson, P. M., Bratton, D. L., and Fadok, V. A. (2001). The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 627-633.
- Herold, K. C., Lu, J., Rulifson, I., Vezys, V., Taub, D., Grusby, M. J., and Bluestone, J. A. (1997). Regulation of C-C chemokine production by murine T cells by CD28/B7 costimulation. *J Immunol* *159*, 4150-4153.
- Hiraki, A., Kaneshige, T., Kiura, K., Ueoka, H., Yamane, H., Tanaka, M., and Harada, M. (1999). Loss of HLA haplotype in lung cancer cell lines: implications for immunosurveillance of altered HLA class I/II phenotypes in lung cancer. *Clin Cancer Res* *5*, 933-936.
- Ho, C. L., Sheu, L. F., and Li, C. Y. (2003). Immunohistochemical expression of angiogenic cytokines and their receptors in reactive benign lymph nodes and non-Hodgkin lymphoma. *Ann Diagn Pathol* *7*, 1-8.
- Hoffmann, P. R., deCathelineau, A. M., Ogden, C. A., Leverrier, Y., Bratton, D. L., Daleke, D. L., Ridley, A. J., Fadok, V. A., and Henson, P. M. (2001a). Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol* *155*, 649-659.
- Hoffmann, T. K., Meidenbauer, N., Dworacki, G., Kanaya, H., and Whiteside, T. L. (2000). Generation of tumor-specific T-lymphocytes by cross-priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells. *Cancer Res* *60*, 3542-3549.

- Hoffmann, T. K., Meidenbauer, N., Muller-Berghaus, J., Storkus, W. J., and Whiteside, T. L. (2001b). Proinflammatory cytokines and CD40 ligand enhance cross-presentation and cross-priming capability of human dendritic cells internalizing apoptotic cancer cells. *J Immunother* *24*, 162-171.
- Hogg, K., and Carley, S. (2002). Towards evidence based emergency medicine: best BETs from the Manchester Royal Infirmary. Staples or sutures in children with scalp lacerations. *Emerg Med J* *19*, 328-329.
- Honey, K., and Rudensky, A. Y. (2003). Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol* *3*, 472-482.
- Honig, A., Rieger, L., Kapp, M., Sutterlin, M., Dietl, J., and Kammerer, U. (2004). Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for materno-fetal tolerance. *J Reprod Immunol* *61*, 79-86.
- Horwitz, D. A., Zheng, S. G., and Gray, J. D. (2003). The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4+ CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets. *J Leukoc Biol* *74*, 471-478.
- Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M. F., Thibault, P., Sacks, D., and Desjardins, M. (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* *425*, 402-406.
- Hsu, F. J., Benike, C., Fagnoni, F., Liles, T. M., Czerwinski, D., Taidi, B., Engleman, E. G., and Levy, R. (1996). Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* *2*, 52-58.
- Hsu, F. J., Caspar, C. B., Czerwinski, D., Kwak, L. W., Liles, T. M., Syrengelas, A., Taidi-Laskowski, B., and Levy, R. (1997). Tumor-specific idiotype vaccines in the treatment of patients with B-cell lymphoma--long-term results of a clinical trial. *Blood* *89*, 3129-3135.
- Hunger, R. E., Sieling, P. A., Ochoa, M. T., Sugaya, M., Burdick, A. E., Rea, T. H., Brennan, P. J., Belisle, J. T., Blauvelt, A., Porcelli, S. A., and Modlin, R. L. (2004). Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J Clin Invest* *113*, 701-708.
- Hunter, S., Indik, Z. K., Kim, M. K., Cauley, M. D., Park, J. G., and Schreiber, A. D. (1998). Inhibition of Fcgamma receptor-mediated phagocytosis by a nonphagocytic Fcgamma receptor. *Blood* *91*, 1762-1768.
- Huynh, M. L., Fadok, V. A., and Henson, P. M. (2002). Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* *109*, 41-50.
- Iezzi, G., Karjalainen, K., and Lanzavecchia, A. (1998). The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* *8*, 89-95.
- Iezzi, G., Scheidegger, D., and Lanzavecchia, A. (2001). Migration and function of antigen-primed nonpolarized T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* *193*, 987-993.
- Inaba, K., Turley, S., Iyoda, T., Yamaide, F., Shimoyama, S., Reis e Sousa, C., Germain, R. N., Mellman, I., and Steinman, R. M. (2000). The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med* *191*, 927-936.
- Inman, G. J., and Allday, M. J. (2000). Resistance to TGF-beta1 correlates with a reduction of TGF-beta type II receptor expression in Burkitt's lymphoma and Epstein-Barr virus-transformed B lymphoblastoid cell lines. *J Gen Virol* *81*, 1567-1578.
- Irisarri, M., Plumas, J., Bonnefoix, T., Jacob, M. C., Roucard, C., Pasquier, M. A., Sotto, J. J.,

- and Lajmanovich, A. (2000). Resistance to CD95-mediated apoptosis through constitutive c-FLIP expression in a non-Hodgkin's lymphoma B cell line. *Leukemia* *14*, 2149-2158.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* *388*, 190-195.
- Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Hori, T., Ota, M., Nakamura, K., Takebayashi, M., Miyaji, M., Yoshimura, T., Inaba, K., and Fukuhara, S. (2004). Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J Immunol* *172*, 4253-4259.
- Ito, T., Amakawa, R., Kaisho, T., Hemmi, H., Tajima, K., Uehira, K., Ozaki, Y., Tomizawa, H., Akira, S., and Fukuhara, S. (2002). Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* *195*, 1507-1512.
- Ito, T., Inaba, M., Inaba, K., Toki, J., Sogo, S., Iguchi, T., Adachi, Y., Yamaguchi, K., Amakawa, R., Valladeau, J., *et al.* (1999). A CD1a⁺/CD11c⁺ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol* *163*, 1409-1419.
- Jacob, M. C., Agrawal, S., Chaperot, L., Giroux, C., Gressin, R., Le Marc'Hadour, F., Favre, M., Sotto, J. J., Bensa, J. C., and Plumas, J. (1999). Quantification of cellular adhesion molecules on malignant B cells from non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* *13*, 1428-1433.
- Jager, E., Chen, Y. T., Drijfhout, J. W., Karbach, J., Ringhoffer, M., Jager, D., Arand, M., Wada, H., Noguchi, Y., Stockert, E., *et al.* (1998). Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med* *187*, 265-270.
- Jager, E., Gnjjatic, S., Nagata, Y., Stockert, E., Jager, D., Karbach, J., Neumann, A., Rieckenberg, J., Chen, Y. T., Ritter, G., *et al.* (2000a). Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8⁺ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1⁺ cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 12198-12203.
- Jager, E., Jager, D., Karbach, J., Chen, Y. T., Ritter, G., Nagata, Y., Gnjjatic, S., Stockert, E., Arand, M., Old, L. J., and Knuth, A. (2000b). Identification of NY-ESO-1 epitopes presented by human histocompatibility antigen (HLA)-DRB4*0101-0103 and recognized by CD4(+) T lymphocytes of patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. *J Exp Med* *191*, 625-630.
- Jager, E., Nagata, Y., Gnjjatic, S., Wada, H., Stockert, E., Karbach, J., Dunbar, P. R., Lee, S. Y., Jungbluth, A., Jager, D., *et al.* (2000c). Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 4760-4765.
- Jahnsen, F. L., Lund-Johansen, F., Dunne, J. F., Farkas, L., Haye, R., and Brandtzaeg, P. (2000). Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123^{high}) dendritic cells in human nasal allergy. *J Immunol* *165*, 4062-4068.
- Jameson, B., Baribaud, F., Pohlmann, S., Ghavimi, D., Mortari, F., Doms, R. W., and Iwasaki, A. (2002). Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques. *J Virol* *76*, 1866-1875.
- Jobe, K. L., Odman-Ghazi, S. O., Whalen, M. M., and Vercruyse, K. P. (2003). Interleukin-12 release from macrophages by hyaluronan, chondroitin sulfate A and chondroitin sulfate C oligosaccharides. *Immunol Lett* *89*, 99-109.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A. H. (2000). Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* *192*, 1213-1222.
- June, C. H., and Riley, J. L. (2004). The CD28 Family: a T Cell Rheostat for Therapeutic

Control of T Cell Activation. Blood.

- Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A. M., Wagner, H., Lipford, G., and Bauer, S. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* *3*, 499.
- Kadowaki, N., Antonenko, S., Lau, J. Y., and Liu, Y. J. (2000). Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* *192*, 219-226.
- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R. W., Kastelein, R. A., Bazan, F., and Liu, Y. J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* *194*, 863-869.
- Kaminski, M. S., Kitamura, K., Maloney, D. G., and Levy, R. (1987). Idiotype vaccination against murine B cell lymphoma. Inhibition of tumor immunity by free idiotype protein. *J Immunol* *138*, 1289-1296.
- Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 7556-7561.
- Kapsenberg, M. L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* *3*, 984-993.
- Kato, M., Neil, T. K., Fearnley, D. B., McLellan, A. D., Vuckovic, S., and Hart, D. N. (2000). Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cells. *Int Immunol* *12*, 1511-1519.
- Klein, J., and Sato, A. (2000). The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* *343*, 702-709.
- Klinman, D. M. (2004). Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol* *4*, 249-258.
- Koenen, H. J., and Joosten, I. (2000). Blockade of CD86 and CD40 induces alloantigen-specific immunoregulatory T cells that remain anergic even after reversal of hyporesponsiveness. *Blood* *95*, 3153-3161.
- Kohrgruber, N., Halanek, N., Groger, M., Winter, D., Rappersberger, K., Schmitt-Egenolf, M., Stingl, G., and Maurer, D. (1999). Survival, maturation, and function of CD11c- and CD11c+ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines. *J Immunol* *163*, 3250-3259.
- Kokhaei, P., Rezvany, M. R., Virving, L., Choudhury, A., Rabbani, H., Osterborg, A., and Mellstedt, H. (2003). Dendritic cells loaded with apoptotic tumour cells induce a stronger T-cell response than dendritic cell-tumour hybrids in B-CLL. *Leukemia* *17*, 894-899.
- Koopman, L. A., Corver, W. E., van der Slik, A. R., Giphart, M. J., and Fleuren, G. J. (2000). Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J Exp Med* *191*, 961-976.
- Kraal, G., van der Laan, L. J., Elomaa, O., and Tryggvason, K. (2000). The macrophage receptor MARCO. *Microbes Infect* *2*, 313-316.
- Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A. M., and Hartmann, G. (2001). Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* *31*, 3026-3037.
- Krug, A., Uppaluri, R., Facchetti, F., Dorner, B. G., Sheehan, K. C., Schreiber, R. D., Cella, M., and Colonna, M. (2002). IFN-producing cells respond to CXCR3 ligands in the presence of CXCL12 and secrete inflammatory chemokines upon activation. *J Immunol* *169*, 6079-6083.

- Krummel, M. F., and Allison, J. P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* *182*, 459-465.
- Kudo, Y., Boyd, C. A., Spyropoulou, I., Redman, C. W., Takikawa, O., Katsuki, T., Hara, T., Ohama, K., and Sargent, I. L. (2004). Indoleamine 2,3-dioxygenase: distribution and function in the developing human placenta. *J Reprod Immunol* *61*, 87-98.
- Kulkarni, A. B., Huh, C. G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K. C., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Ward, J. M., and Karlsson, S. (1993). Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 770-774.
- Kurnick, J. T., Ramirez-Montagut, T., Boyle, L. A., Andrews, D. M., Pandolfi, F., Durda, P. J., Butera, D., Dunn, I. S., Benson, E. M., Gobin, S. J., and van den Elsen, P. J. (2001). A novel autocrine pathway of tumor escape from immune recognition: melanoma cell lines produce a soluble protein that diminishes expression of the gene encoding the melanocyte lineage melan-A/MART-1 antigen through down-modulation of its promoter. *J Immunol* *167*, 1204-1211.
- Kuwana, M., Kaburaki, J., Wright, T. M., Kawakami, Y., and Ikeda, Y. (2001). Induction of antigen-specific human CD4(+) T cell anergy by peripheral blood DC2 precursors. *Eur J Immunol* *31*, 2547-2557.
- la Sala, A., Ferrari, D., Corinti, S., Cavani, A., Di Virgilio, F., and Girolomoni, G. (2001). Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses. *J Immunol* *166*, 1611-1617.
- Lajmanovich, A., Irisarri, M., Molens, J. P., Pasquier, M. A., Sotto, J. J., Bensa, J. C., Leroux, D., and Plumas, J. (2004). Impairment of death-inducing signalling complex formation in CD95-resistant human primary lymphoma B cells. *Br J Haematol* *124*, 746-753.
- Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* *1*, 311-316.
- Lanier, L. L. (1998). NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* *16*, 359-393.
- Lanier, L. L. (2001). A renaissance for the tumor immunosurveillance hypothesis. *Nat Med* *7*, 1178-1180.
- Lanier, L. L. (2003). Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol* *15*, 308-314.
- Lanzavecchia, A., Lezzi, G., and Viola, A. (1999). From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell* *96*, 1-4.
- Lauber, K., Blumenthal, S. G., Waibel, M., and Wesselborg, S. (2004). Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* *14*, 277-287.
- Le Bon, A., Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., Borrow, P., and Tough, D. F. (2003). Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol* *4*, 1009-1015.
- Le Bouteiller, P., Legrand-Abravanel, F., and Solier, C. (2003). Soluble HLA-G1 at the materno-foetal interface--a review. *Placenta* *24 Suppl A*, S10-15.
- LeBlanc, H., Lawrence, D., Varfolomeev, E., Totpal, K., Morlan, J., Schow, P., Fong, S., Schwall, R., Sinicropi, D., and Ashkenazi, A. (2002). Tumor-cell resistance to death receptor--induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. *Nat Med* *8*, 274-281.
- Lee, K. H., Holdorf, A. D., Dustin, M. L., Chan, A. C., Allen, P. M., and Shaw, A. S. (2002). T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* *295*, 1539-1542.
- Lee, P. P., Yee, C., Savage, P. A., Fong, L., Brockstedt, D., Weber, J. S., Johnson, D., Swetter,

- S., Thompson, J., Greenberg, P. D., *et al.* (1999). Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med* 5, 677-685.
- Levings, M. K., Gregori, S., Tresoldi, E., Cazzaniga, S., Bonini, C., and Roncarolo, M. G. (2004). Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Treg cells. *Blood*.
- Levings, M. K., Sangregorio, R., and Roncarolo, M. G. (2001). Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 193, 1295-1302.
- Lila, N., Rouas-Freiss, N., Dausset, J., Carpentier, A., and Carosella, E. D. (2001). Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cells suppresses the allo-proliferative response: a CD4+ T cell regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12150-12155.
- Lin, C. M., Wang, F. H., and Lee, P. K. (2002). Activated human CD4+ T cells induced by dendritic cell stimulation are most sensitive to transforming growth factor-beta: implications for dendritic cell immunization against cancer. *Clin Immunol* 102, 96-105.
- Liu, K., Iyoda, T., Saternus, M., Kimura, Y., Inaba, K., and Steinman, R. M. (2002). Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *J Exp Med* 196, 1091-1097.
- Liu, N., Ohnishi, N., Ni, L., Akira, S., and Bacon, K. B. (2003). CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells. *Nat Immunol* 4, 687-693.
- Lizee, G., Basha, G., Tiong, J., Julien, J. P., Tian, M., Biron, K. E., and Jefferies, W. A. (2003). Control of dendritic cell cross-presentation by the major histocompatibility complex class I cytoplasmic domain. *Nat Immunol* 4, 1065-1073.
- Loercher, A. E., Nash, M. A., Kavanagh, J. J., Platsoucas, C. D., and Freedman, R. S. (1999). Identification of an IL-10-producing HLA-DR-negative monocyte subset in the malignant ascites of patients with ovarian carcinoma that inhibits cytokine protein expression and proliferation of autologous T cells. *J Immunol* 163, 6251-6260.
- Loetscher, P., Ugucioni, M., Bordoli, L., Baggiolini, M., Moser, B., Chizzolini, C., and Dayer, J. M. (1998). CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 391, 344-345.
- Lu, J., Teh, C., Kishore, U., and Reid, K. B. (2002). Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. *Biochim Biophys Acta* 1572, 387-400.
- Luft, T., Luetjens, P., Hochrein, H., Toy, T., Masterman, K. A., Rizkalla, M., Maliszewski, C., Shortman, K., Cebon, J., and Maraskovsky, E. (2002). IFN-alpha enhances CD40 ligand-mediated activation of immature monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol* 14, 367-380.
- Lui, G., Manches, O., Chaperot, L., Ducrot, T., Molens, J. P., Sotto, J. J., Bensa, J. C., and Plumas, J. (2004). Preparation of purified lymphoma cells suitable for therapy. *Cytotherapy* 6, 235-243.
- MacPherson, and Liu, L. (1999). Dendritic Cells Biologie and Clinical Applications. In, pp. 141.
- Maeurer, M. J., Gollin, S. M., Martin, D., Swaney, W., Bryant, J., Castelli, C., Robbins, P., Parmiani, G., Storkus, W. J., and Lotze, M. T. (1996). Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. *J Clin Invest* 98, 1633-1641.
- Mak, T. W., Shahinian, A., Yoshinaga, S. K., Wakeham, A., Boucher, L. M., Pintilie, M., Duncan, G., Gajewska, B. U., Gronski, M., Eriksson, U., *et al.* (2003). Costimulation through the inducible costimulator ligand is essential for both T helper and B cell functions in T cell-dependent B cell responses. *Nat Immunol* 4, 765-772.

- Malek, T. R., and Bayer, A. L. (2004). Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol* 4, 665-674.
- Maloney, D. G., Grillo-Lopez, A. J., White, C. A., Bodkin, D., Schilder, R. J., Neidhart, J. A., Janakiraman, N., Foon, K. A., Liles, T. M., Dallaire, B. K., *et al.* (1997). IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90, 2188-2195.
- Manches, O., Lui, G., Chaperot, L., Gressin, R., Molens, J. P., Jacob, M. C., Sotto, J. J., Leroux, D., Bensa, J. C., and Plumas, J. (2003). In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 101, 949-954.
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T. I., Bushkin, Y., Davis, D. M., Strominger, J. L., Yewdell, J. W., and Porgador, A. (2001). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409, 1055-1060.
- Mannering, S. I., McKenzie, J. L., Fearnley, D. B., and Hart, D. N. (1997). HLA-DR1-restricted bcr-abl (b3a2)-specific CD4+ T lymphocytes respond to dendritic cells pulsed with b3a2 peptide and antigen-presenting cells exposed to b3a2 containing cell lysates. *Blood* 90, 290-297.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23, 549-555.
- Maraskovsky, E., Daro, E., Roux, E., Teepe, M., Maliszewski, C. R., Hoek, J., Caron, D., Lebsack, M. E., and McKenna, H. J. (2000). In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood* 96, 878-884.
- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301-305.
- Maurer, D. S., G. (1999). Dendritic Cells Biologie and Clinical Applications. In, pp. 111.
- Maus, U. A., Waelsch, K., Kuziel, W. A., Delbeck, T., Mack, M., Blackwell, T. S., Christman, J. W., Schlondorff, D., Seeger, W., and Lohmeyer, J. (2003). Monocytes are potent facilitators of alveolar neutrophil emigration during lung inflammation: role of the CCL2-CCR2 axis. *J Immunol* 170, 3273-3278.
- Mazzoni, A., and Segal, D. M. (2004). Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J Leukoc Biol* 75, 721-730.
- McAdam, A. J., Chang, T. T., Lumelsky, A. E., Greenfield, E. A., Boussiotis, V. A., Duke-Cohan, J. S., Chernova, T., Malenkovich, N., Jabs, C., Kuchroo, V. K., *et al.* (2000). Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells. *J Immunol* 165, 5035-5040.
- McKallip, R., Li, R., and Ladisch, S. (1999). Tumor gangliosides inhibit the tumor-specific immune response. *J Immunol* 163, 3718-3726.
- McWilliam, A. S., Stumbles, P. A., and Holt, P. G. (1999). Dendritic Cells Biologie and Clinical Applications. In, pp. 123.
- Megjugorac, N. J., Young, H. A., Amrute, S. B., Olshalsky, S. L., and Fitzgerald-Bocarsly, P. (2004). Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells. *J Leukoc Biol* 75, 504-514.
- Menier, C., Riteau, B., Carosella, E. D., and Rouas-Freiss, N. (2002). MICA triggering signal for NK cell tumor lysis is counteracted by HLA-G1-mediated inhibitory signal. *Int J Cancer* 100, 63-70.
- Messmer, D., Yang, H., Telusma, G., Knoll, F., Li, J., Messmer, B., Tracey, K. J., and Chiorazzi, N. (2004). High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation

and Th1 polarization. *J Immunol* 173, 307-313.

Mocikat, R., Braumuller, H., Gumy, A., Egeter, O., Ziegler, H., Reusch, U., Bubeck, A., Louis, J., Mailhammer, R., Riethmuller, G., *et al.* (2003). Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* 19, 561-569.

Mokoena, T., and Gordon, S. (1985). Human macrophage activation. Modulation of mannosyl, fucosyl receptor activity in vitro by lymphokines, gamma and alpha interferons, and dexamethasone. *J Clin Invest* 75, 624-631.

Mommaas, A. M., Mulder, A. A., Jordens, R., Out, C., Tan, M. C., Cresswell, P., Kluin, P. M., and Koning, F. (1999). Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptors and a fully developed endosomal/lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules. *Eur J Immunol* 29, 571-580.

Montaner, L. J., da Silva, R. P., Sun, J., Sutterwala, S., Hollinshead, M., Vaux, D., and Gordon, S. (1999). Type 1 and type 2 cytokine regulation of macrophage endocytosis: differential activation by IL-4/IL-13 as opposed to IFN-gamma or IL-10. *J Immunol* 162, 4606-4613.

Montoya, M. C., Sancho, D., Bonello, G., Collette, Y., Langlet, C., He, H. T., Aparicio, P., Alcover, A., Olive, D., and Sanchez-Madrid, F. (2002). Role of ICAM-3 in the initial interaction of T lymphocytes and APCs. *Nat Immunol* 3, 159-168.

Moodley, Y., Rigby, P., Bundell, C., Bunt, S., Hayashi, H., Misso, N., McAnulty, R., Laurent, G., Scaffidi, A., Thompson, P., and Knight, D. (2003). Macrophage recognition and phagocytosis of apoptotic fibroblasts is critically dependent on fibroblast-derived thrombospondin 1 and CD36. *Am J Pathol* 162, 771-779.

Moody, D. B., and Porcelli, S. A. (2003). Intracellular pathways of CD1 antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 3, 11-22.

Moody, D. B., Young, D. C., Cheng, T. Y., Rosat, J. P., Roura-Mir, C., O'Connor, P. B., Zajonc, D. M., Walz, A., Miller, M. J., Lavery, S. B., *et al.* (2004). T cell activation by lipopeptide antigens. *Science* 303, 527-531.

Morales, A., Chin, J. L., and Ramsey, E. W. (2001). Mycobacterial cell wall extract for treatment of carcinoma in situ of the bladder. *J Urol* 166, 1633-1637; discussion 1637-1638.

Morel, S., Levy, F., Burlet-Schiltz, O., Brasseur, F., Probst-Kepper, M., Peitrequin, A. L., Monsarrat, B., Van Velthoven, R., Cerottini, J. C., Boon, T., *et al.* (2000). Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 12, 107-117.

Morelli, A. E., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Zahorchak, A. F., Logar, A. J., Papworth, G. D., Wang, Z., Watkins, S. C., Falo, L. D., Jr., and Thomson, A. W. (2003). Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* 101, 611-620.

Moseman, E. A., Liang, X., Dawson, A. J., Panoskaltis-Mortari, A., Krieg, A. M., Liu, Y. J., Blazar, B. R., and Chen, W. (2004). Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 173, 4433-4442.

Murdoch, C., Giannoudis, A., and Lewis, C. E. (2004). Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 104, 2224-2234.

Murphy, K. M., and Reiner, S. L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2, 933-944.

Nau, G. J., Schlesinger, A., Richmond, J. F., and Young, R. A. (2003). Cumulative Toll-like

- receptor activation in human macrophages treated with whole bacteria. *J Immunol* *170*, 5203-5209.
- Nauta, A. J., Raaschou-Jensen, N., Roos, A., Daha, M. R., Madsen, H. O., Borrias-Essers, M. C., Ryder, L. P., Koch, C., and Garred, P. (2003). Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur J Immunol* *33*, 2853-2863.
- Nelson, E. L., Li, X., Hsu, F. J., Kwak, L. W., Levy, R., Clayberger, C., and Krensky, A. M. (1996). Tumor-specific, cytotoxic T-lymphocyte response after idiotype vaccination for B-cell, non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* *88*, 580-589.
- Norbury, C. C., Basta, S., Donohue, K. B., Tschärke, D. C., Princiotta, M. F., Berglund, P., Gibbs, J., Bennink, J. R., and Yewdell, J. W. (2004). CD8+ T cell cross-priming via transfer of proteasome substrates. *Science* *304*, 1318-1321.
- O'Garra, A., and Vieira, P. (2004). Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* *10*, 801-805.
- Oberling, F. (1997). Monocyte/macrophages as effector cells in cancer immunotherapy. *Transfus Sci* *18*, 243-250.
- Ogden, C. A., deCathelineau, A., Hoffmann, P. R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V. A., and Henson, P. M. (2001). C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med* *194*, 781-795.
- Olweus, J., BitMansour, A., Warnke, R., Thompson, P. A., Carballido, J., Picker, L. J., and Lund-Johansen, F. (1997). Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 12551-12556.
- Orange, J. S., and Biron, C. A. (1996). Characterization of early IL-12, IFN- α , and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* *156*, 4746-4756.
- Otten, H. G., van Ginkel, W. G., Hagenbeek, A., and Petersen, E. J. (2004). Prevalence and clinical significance of resistance to perforin- and FAS-mediated cell death in leukemia. *Leukemia* *18*, 1401-1405.
- Pan, Q., Gollapudi, A. S., and Dave, V. P. (2004). Biochemical evidence for the presence of a single CD3 δ and CD3 γ chain in surface T cell receptor/CD3 complex. *J Biol Chem*.
- Pardoll, D., and Allison, J. (2004). Cancer immunotherapy: breaking the barriers to harvest the crop. *Nat Med* *10*, 887-892.
- Pardoll, D. M., and Topalian, S. L. (1998). The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol* *10*, 588-594.
- Park, J. S., Svetkauskaite, D., He, Q., Kim, J. Y., Strassheim, D., Ishizaka, A., and Abraham, E. (2004). Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* *279*, 7370-7377.
- Pasare, C., and Medzhitov, R. (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* *299*, 1033-1036.
- Paul, P., Rouas-Freiss, N., Khalil-Daher, I., Moreau, P., Riteau, B., Le Gal, F. A., Avril, M. F., Dausset, J., Guillet, J. G., and Carosella, E. D. (1998). HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 4510-4515.
- Paul, S. (2003). Technology evaluation: CpG-7909, Coley. *Curr Opin Mol Ther* *5*, 553-559.
- Peiser, L., and Gordon, S. (2001). The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect* *3*, 149-159.

- Peiser, L., Mukhopadhyay, S., and Gordon, S. (2002). Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* *14*, 123-128.
- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., *et al.* (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* *190*, 1505-1516.
- Penna, G., Sozzani, S., and Adorini, L. (2001). Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* *167*, 1862-1866.
- Perez, O. D., Mitchell, D., Jager, G. C., and Nolan, G. P. (2004). LFA-1 signaling through p44/42 is coupled to perforin degranulation in CD56+CD8+ natural killer cells. *Blood* *104*, 1083-1093.
- Pessino, A., Sivori, S., Bottino, C., Malaspina, A., Morelli, L., Moretta, L., Biassoni, R., and Moretta, A. (1998). Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med* *188*, 953-960.
- Phan, G. Q., Yang, J. C., Sherry, R. M., Hwu, P., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Restifo, N. P., Haworth, L. R., Seipp, C. A., Freezer, L. J., *et al.* (2003). Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 8372-8377.
- Pileri, S. A., Ascani, S., Sabattini, E., Fraternali-Orcioni, G., Poggi, S., Piccioli, M., Piccaluga, P. P., Gamberi, B., Zinzani, P. L., Leoncini, L., and Falini, B. (2000a). The pathologist's view point. Part I--indolent lymphomas. *Haematologica* *85*, 1291-1307.
- Pileri, S. A., Ascani, S., Sabattini, E., Fraternali-Orcioni, G., Poggi, S., Piccioli, M., Piccaluga, P. P., Gamberi, B., Zinzani, P. L., Leoncini, L., and Falini, B. (2000b). The pathologist's view point. Part II --aggressive lymphomas. *Haematologica* *85*, 1308-1321.
- Pittet, M. J., Valmori, D., Dunbar, P. R., Speiser, D. E., Lienard, D., Lejeune, F., Fleischhauer, K., Cerundolo, V., Cerottini, J. C., and Romero, P. (1999). High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. *J Exp Med* *190*, 705-715.
- Platt, N., and Gordon, S. (1998). Scavenger receptors: diverse activities and promiscuous binding of polyanionic ligands. *Chem Biol* *5*, R193-203.
- Plumas, J., Chaperot, L., Jacob, M. C., Molens, J. P., Giroux, C., Sotto, J. J., and Bensa, J. C. (1995). Malignant B lymphocytes from non-Hodgkin's lymphoma induce allogeneic proliferative and cytotoxic T cell responses in primary mixed lymphocyte cultures: an important role of co-stimulatory molecules CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) in stimulation by tumor cells. *Eur J Immunol* *25*, 3332-3341.
- Plumas, J., Jacob, M. C., Chaperot, L., Molens, J. P., Sotto, J. J., and Bensa, J. C. (1998). Tumor B cells from non-Hodgkin's lymphoma are resistant to CD95 (Fas/Apo-1)-mediated apoptosis. *Blood* *91*, 2875-2885.
- Pollard, J. W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* *4*, 71-78.
- Poltl-Frank, F., Zurbriggen, R., Helg, A., Stuart, F., Robinson, J., Gluck, R., and Pluschke, G. (1999). Use of reconstituted influenza virus virosomes as an immunopotentiating delivery system for a peptide-based vaccine. *Clin Exp Immunol* *117*, 496-503.
- Rammensee, H. G., Weinschenk, T., Gouttefangeas, C., and Stevanovic, S. (2002). Towards patient-specific tumor antigen selection for vaccination. *Immunol Rev* *188*, 164-176.
- Randolph, G. J., Beaulieu, S., Lebecque, S., Steinman, R. M., and Muller, W. A. (1998).

- Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282, 480-483.
- Rasmussen, T., Hansson, L., Osterborg, A., Johnsen, H. E., and Mellstedt, H. (2003). Idiotype vaccination in multiple myeloma induced a reduction of circulating clonal tumor B cells. *Blood* 101, 4607-4610.
- Ratta, M., Fagnoni, F., Curti, A., Vescovini, R., Sansoni, P., Oliviero, B., Fogli, M., Ferri, E., Della Cuna, G. R., Tura, S., *et al.* (2002). Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood* 100, 230-237.
- Raulet, D. H. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 3, 781-790.
- Rebmann, V., Regel, J., Stolke, D., and Grosse-Wilde, H. (2003). Secretion of sHLA-G molecules in malignancies. *Semin Cancer Biol* 13, 371-377.
- Reichardt, V. L., Milazzo, C., Brugger, W., Einsele, H., Kanz, L., and Brossart, P. (2003). Idiotype vaccination of multiple myeloma patients using monocyte-derived dendritic cells. *Haematologica* 88, 1139-1149.
- Ren, Y., and Savill, J. (1998). Apoptosis: the importance of being eaten. *Cell Death Differ* 5, 563-568.
- Reome, J. B., Hylind, J. C., Dutton, R. W., and Dobrzanski, M. J. (2004). Type 1 and type 2 tumor infiltrating effector cell subpopulations in progressive breast cancer. *Clin Immunol* 111, 69-81.
- Riese, R. J., and Chapman, H. A. (2000). Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 12, 107-113.
- Rissoan, M. C., Duhon, T., Bridon, J. M., Bendriss-Vermare, N., Peronne, C., de Saint Vis, B., Briere, F., and Bates, E. E. (2002). Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 100, 3295-3303.
- Rissoan, M. C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R., and Liu, Y. J. (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283, 1183-1186.
- Robertson, M. J. (2002). Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* 71, 173-183.
- Robinson, S. P., Patterson, S., English, N., Davies, D., Knight, S. C., and Reid, C. D. (1999). Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 29, 2769-2778.
- Rocha, B., and Tanchot, C. (2004). CD8 T cell memory. *Semin Immunol* 16, 305-314.
- Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. (1999). Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* 1, 362-368.
- Romero, P., Valmori, D., Pittet, M. J., Zippelius, A., Rimoldi, D., Levy, F., Dutoit, V., Ayyoub, M., Rubio-Godoy, V., Michielin, O., *et al.* (2002). Antigenicity and immunogenicity of Melan-A/MART-1 derived peptides as targets for tumor reactive CTL in human melanoma. *Immunol Rev* 188, 81-96.
- Roncarolo, M. G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S., and Levings, M. K. (2001). Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 182, 68-79.
- Ronchetti, A., Rovere, P., Iezzi, G., Galati, G., Heltai, S., Protti, M. P., Garancini, M. P.,

- Manfredi, A. A., Rugarli, C., and Bellone, M. (1999). Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines. *J Immunol* *163*, 130-136.
- Roos, A., Xu, W., Castellano, G., Nauta, A. J., Garred, P., Daha, M. R., and van Kooten, C. (2004). Mini-review: A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells. *Eur J Immunol* *34*, 921-929.
- Rosenberg, S. A. (1999). A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* *10*, 281-287.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., and Restifo, N. P. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* *10*, 909-915.
- Rossi, D., and Gaidano, G. (2003). Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica* *88*, 212-218.
- Rouas-Freiss, N., Moreau, P., Menier, C., and Carosella, E. D. (2003). HLA-G in cancer: a way to turn off the immune system. *Semin Cancer Biol* *13*, 325-336.
- Rouhiainen, A., Kuja-Panula, J., Wilkman, E., Pakkanen, J., Stenfors, J., Tuominen, R. K., Lepantalo, M., Carpen, O., Parkkinen, J., and Rauvala, H. (2004). Regulation of monocyte migration by amphoterin (HMGB1). *Blood* *104*, 1174-1182.
- Rovere, P., Sabbadini, M. G., Vallinoto, C., Fascio, U., Zimmermann, V. S., Bondanza, A., Ricciardi-Castagnoli, P., and Manfredi, A. A. (1999). Delayed clearance of apoptotic lymphoma cells allows cross-presentation of intracellular antigens by mature dendritic cells. *J Leukoc Biol* *66*, 345-349.
- Rovere, P., Vallinoto, C., Bondanza, A., Crosti, M. C., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Rugarli, C., and Manfredi, A. A. (1998). Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J Immunol* *161*, 4467-4471.
- Rupper, A., Grove, B., and Cardelli, J. (2001). Rab7 regulates phagosome maturation in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* *114*, 2449-2460.
- Russo, V., Zhou, D., Sartirana, C., Rovere, P., Villa, A., Rossini, S., Traversari, C., and Bordignon, C. (2000). Acquisition of intact allogeneic human leukocyte antigen molecules by human dendritic cells. *Blood* *95*, 3473-3477.
- Sadanaga, N., Nagashima, H., Mashino, K., Tahara, K., Yamaguchi, H., Ohta, M., Fujie, T., Tanaka, F., Inoue, H., Takesako, K., *et al.* (2001). Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas. *Clin Cancer Res* *7*, 2277-2284.
- Sahin, U., Tureci, O., and Pfreundschuh, M. (1997). Serological identification of human tumor antigens. *Curr Opin Immunol* *9*, 709-716.
- Salio, M., Cella, M., Vermi, W., Facchetti, F., Palmowski, M. J., Smith, C. L., Shepherd, D., Colonna, M., and Cerundolo, V. (2003). Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-gamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. *Eur J Immunol* *33*, 1052-1062.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* *182*, 389-400.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* *179*, 1109-1118.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2000). Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic

through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* 177, 134-140.

Sallusto, F., Mackay, C. R., and Lanzavecchia, A. (1997). Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 277, 2005-2007.

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

Sanchez-Rovira, P., Jimenez, E., Carracedo, J., Barneto, I. C., Ramirez, R., and Aranda, E. (1998). Serum levels of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in patients with colorectal cancer: inhibitory effect on cytotoxicity. *Eur J Cancer* 34, 394-398.

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

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

Scanlan, M. J., Gure, A. O., Jungbluth, A. A., Old, L. J., and Chen, Y. T. (2002). Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 188, 22-32.

Scardino, A., Gross, D. A., Alves, P., Schultze, J. L., Graff-Dubois, S., Faure, O., Tourdot, S., Chouaib, S., Nadler, L. M., Lemonnier, F. A., *et al.* (2002). HER-2/neu and hTERT cryptic epitopes as novel targets for broad spectrum tumor immunotherapy. *J Immunol* 168, 5900-5906.

Schnurr, M., Scholz, C., Rothenfusser, S., Galambos, P., Dauer, M., Robe, J., Endres, S., and Eigler, A. (2002). Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and gammadelta T cells. *Cancer Res* 62, 2347-2352.

Schotte, R., Rissoan, M. C., Bendriss-Vermare, N., Bridon, J. M., Duhon, T., Weijer, K., Briere, F., and Spits, H. (2003). The transcription factor Spi-B is expressed in plasmacytoid DC precursors and inhibits T-, B-, and NK-cell development. *Blood* 101, 1015-1023.

Scott, R. S., McMahon, E. J., Pop, S. M., Reap, E. A., Caricchio, R., Cohen, P. L., Earp, H. S., and Matsushima, G. K. (2001). Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 411, 207-211.

Sebti, Y., Le Fric, G., Pangault, C., Gros, F., Drenou, B., Guilloux, V., Bernard, M., Lamy, T., Fauchet, R., and Amiot, L. (2003). Soluble HLA-G molecules are increased in lymphoproliferative disorders. *Hum Immunol* 64, 1093-1101.

Selenko, N., Maidic, O., Draxier, S., Berer, A., Jager, U., Knapp, W., and Stockl, J. (2001). CD20 antibody (C2B8)-induced apoptosis of lymphoma cells promotes phagocytosis by dendritic cells and cross-priming of CD8+ cytotoxic T cells. *Leukemia* 15, 1619-1626.

Seliger, B., Abken, H., and Ferrone, S. (2003). HLA-G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity. *Trends Immunol* 24, 82-87.

Sellati, T. J., Waldrop, S. L., Salazar, J. C., Bergstresser, P. R., Picker, L. J., and Radolf, J. D. (2001). The cutaneous response in humans to *Treponema pallidum* lipoprotein analogues involves cellular elements of both innate and adaptive immunity. *J Immunol* 166, 4131-4140.

Sethi, T., Rintoul, R. C., Moore, S. M., MacKinnon, A. C., Salter, D., Choo, C., Chilvers, E. R., Dransfield, I., Donnelly, S. C., Strieter, R., and Haslett, C. (1999). Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med* 5, 662-668.

- Shackleton, M., Davis, I. D., Hopkins, W., Jackson, H., Dimopoulos, N., Tai, T., Chen, Q., Parente, P., Jefford, M., Masterman, K. A., *et al.* (2004). The impact of imiquimod, a Toll-like receptor-7 ligand (TLR7L), on the immunogenicity of melanoma peptide vaccination with adjuvant Flt3 ligand. *Cancer Immun* 4, 9.
- Shaif-Muthana, M., McIntyre, C., Sisley, K., Rennie, I., and Murray, A. (2000). Dead or alive: immunogenicity of human melanoma cells when presented by dendritic cells. *Cancer Res* 60, 6441-6447.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-1111.
- Sharma, S., Stolina, M., Lin, Y., Gardner, B., Miller, P. W., Kronenberg, M., and Dubinett, S. M. (1999). T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J Immunol* 163, 5020-5028.
- Sharpe, A. H., and Freeman, G. J. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2, 116-126.
- Shen, L., and Rock, K. L. (2004). Cellular protein is the source of cross-priming antigen in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3035-3040.
- Shi, Y., Evans, J. E., and Rock, K. L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425, 516-521.
- Shigematsu, H., Reizis, B., Iwasaki, H., Mizuno, S., Hu, D., Traver, D., Leder, P., Sakaguchi, N., and Akashi, K. (2004). Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin. *Immunity* 21, 43-53.
- Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y. J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835-1837.
- Siegel, P. M., and Massague, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 807-821.
- Slingluff, C. L., Jr., Petroni, G. R., Yamshchikov, G. V., Barnd, D. L., Eastham, S., Galavotti, H., Patterson, J. W., Deacon, D. H., Hibbitts, S., Teates, D., *et al.* (2003). Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells. *J Clin Oncol* 21, 4016-4026.
- Smith, M. R. (2003). Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* 22, 7359-7368.
- Somersan, S., Larsson, M., Fonteneau, J. F., Basu, S., Srivastava, P., and Bhardwaj, N. (2001). Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 167, 4844-4852.
- Sorg, R. V., Kogler, G., and Wernet, P. (1999). Identification of cord blood dendritic cells as an immature CD11c- population. *Blood* 93, 2302-2307.
- Sozzani, S., Allavena, P., D'Amico, G., Luini, W., Bianchi, G., Kataura, M., Imai, T., Yoshie, O., Bonocchi, R., and Mantovani, A. (1998). Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 161, 1083-1086.
- Spits, H., Couwenberg, F., Bakker, A. Q., Weijer, K., and Uittenbogaart, C. H. (2000). Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J Exp Med* 192, 1775-1784.

- Starr, T. K., Jameson, S. C., and Hogquist, K. A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21, 139-176.
- Steinman, R. M., Turley, S., Mellman, I., and Inaba, K. (2000). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 191, 411-416.
- Steinmann, A., Funk, J. O., Schuler, G., and von den Driesch, P. (2000). Topical imiquimod treatment of a cutaneous melanoma metastasis. *J Am Acad Dermatol* 43, 555-556.
- Stephens, J. R., and Thomson, A. W. (1999). Dendritic Cells Biology and Clinical Applications. In, pp. 154.
- Stift, A., Friedl, J., Dubsky, P., Bachleitner-Hofmann, T., Schueller, G., Zontsich, T., Benkoe, T., Radelbauer, K., Brostjan, C., Jakesz, R., and Gnant, M. (2003). Dendritic cell-based vaccination in solid cancer. *J Clin Oncol* 21, 135-142.
- Stockert, E., Jager, E., Chen, Y. T., Scanlan, M. J., Gout, I., Karbach, J., Arand, M., Knuth, A., and Old, L. J. (1998). A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J Exp Med* 187, 1349-1354.
- Street, S. E., Cretney, E., and Smyth, M. J. (2001). Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 97, 192-197.
- Street, S. E., Trapani, J. A., MacGregor, D., and Smyth, M. J. (2002). Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J Exp Med* 196, 129-134.
- Subklewe, M., Paludan, C., Tsang, M. L., Mahnke, K., Steinman, R. M., and Munz, C. (2001). Dendritic cells cross-present latency gene products from Epstein-Barr virus-transformed B cells and expand tumor-reactive CD8(+) killer T cells. *J Exp Med* 193, 405-411.
- Swanson, J. A., and Baer, S. C. (1995). Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol* 5, 89-93.
- Swanson, J. A., and Watts, C. (1995). Macropinocytosis. *Trends Cell Biol* 5, 424-428.
- Szcepek, A. J., Belch, A. R., and Pilarski, L. M. (2001). Expression of IL-6 and IL-6 receptors by circulating clonotypic B cells in multiple myeloma: potential for autocrine and paracrine networks. *Exp Hematol* 29, 1076-1081.
- Tailleux, L., Schwartz, O., Herrmann, J. L., Pivert, E., Jackson, M., Amara, A., Legres, L., Dreher, D., Nicod, L. P., Gluckman, J. C., *et al.* (2003). DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *J Exp Med* 197, 121-127.
- Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21, 335-376.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11, 443-451.
- Tamura, Y., Peng, P., Liu, K., Daou, M., and Srivastava, P. K. (1997). Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science* 278, 117-120.
- Tartour, E., Blay, J. Y., Dorval, T., Escudier, B., Mosseri, V., Douillard, J. Y., Deneux, L., Gorin, I., Negrier, S., Mathiot, C., *et al.* (1996). Predictors of clinical response to interleukin-2--based immunotherapy in melanoma patients: a French multiinstitutional study. *J Clin Oncol* 14, 1697-1703.
- Teeling, J. L., French, R. R., Cragg, M. S., van den Brakel, J., Pluyter, M., Huang, H., Chan, C., Parren, P. W., Hack, C. E., Dechant, M., *et al.* (2004). Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 104, 1793-1800.

- Timmerman, J. M., Czerwinski, D. K., Davis, T. A., Hsu, F. J., Benike, C., Hao, Z. M., Taidi, B., Rajapaksa, R., Caspar, C. B., Okada, C. Y., *et al.* (2002). Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 99, 1517-1526.
- Torre-Amione, G., Beauchamp, R. D., Koeppen, H., Park, B. H., Schreiber, H., Moses, H. L., and Rowley, D. A. (1990). A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1486-1490.
- Trapani, J. A., and Smyth, M. J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2, 735-747.
- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 133-146.
- Trombetta, E. S., Ebersold, M., Garrett, W., Pypaert, M., and Mellman, I. (2003). Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* 299, 1400-1403.
- Turley, S. J., Inaba, K., Garrett, W. S., Ebersold, M., Unternaehrer, J., Steinman, R. M., and Mellman, I. (2000). Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* 288, 522-527.
- Underhill, D. M., and Ozinsky, A. (2002). Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 20, 825-852.
- Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M., and Aderem, A. (1999). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401, 811-815.
- Urosevic, M., Willers, J., Mueller, B., Kempf, W., Burg, G., and Dummer, R. (2002). HLA-G protein up-regulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10 expression in large cell T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas. *Blood* 99, 609-617.
- Utsugi, M., Dobashi, K., Ishizuka, T., Endou, K., Hamuro, J., Murata, Y., Nakazawa, T., and Mori, M. (2003). c-Jun N-terminal kinase negatively regulates lipopolysaccharide-induced IL-12 production in human macrophages: role of mitogen-activated protein kinase in glutathione redox regulation of IL-12 production. *J Immunol* 171, 628-635.
- Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van Den Eynde, B. J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*.
- Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., *et al.* (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12, 71-81.
- Valmori, D., Gileadi, U., Servis, C., Dunbar, P. R., Cerottini, J. C., Romero, P., Cerundolo, V., and Levy, F. (1999). Modulation of proteasomal activity required for the generation of a cytotoxic T lymphocyte-defined peptide derived from the tumor antigen MAGE-3. *J Exp Med* 189, 895-906.
- van de Wiel-van Kemenade, E., Ligtenberg, M. J., de Boer, A. J., Buijs, F., Vos, H. L., Melief, C. J., Hilkens, J., and Figdor, C. G. (1993). Episialin (MUC1) inhibits cytotoxic lymphocyte-target cell interaction. *J Immunol* 151, 767-776.
- Van Der Bruggen, P., Zhang, Y., Chau, P., Stroobant, V., Panichelli, C., Schultz, E. S., Chapiro, J., Van Den Eynde, B. J., Brasseur, F., and Boon, T. (2002). Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. *Immunol Rev* 188, 51-64.

- van der Burg, S. H., Visseren, M. J., Brandt, R. M., Kast, W. M., and Melief, C. J. (1996). Immunogenicity of peptides bound to MHC class I molecules depends on the MHC-peptide complex stability. *J Immunol* *156*, 3308-3314.
- Van Pel, A., van der Bruggen, P., Coulie, P. G., Brichard, V. G., Lethe, B., van den Eynde, B., Uyttenhove, C., Renauld, J. C., and Boon, T. (1995). Genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Immunol Rev* *145*, 229-250.
- van Sorge, N. M., van der Pol, W. L., and van de Winkel, J. G. (2003). FcγR polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens* *61*, 189-202.
- Vanbervliet, B., Bendriss-Vermare, N., Massacrier, C., Homey, B., de Bouteiller, O., Briere, F., Trinchieri, G., and Caux, C. (2003). The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *J Exp Med* *198*, 823-830.
- Vanbervliet, B., Homey, B., Durand, I., Massacrier, C., Ait-Yahia, S., de Bouteiller, O., Vicari, A., and Caux, C. (2002). Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *Eur J Immunol* *32*, 231-242.
- Vandivier, R. W., Ogden, C. A., Fadok, V. A., Hoffmann, P. R., Brown, K. K., Botto, M., Walport, M. J., Fisher, J. H., Henson, P. M., and Greene, K. E. (2002). Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J Immunol* *169*, 3978-3986.
- Veckman, V., Miettinen, M., Matikainen, S., Lande, R., Giacomini, E., Coccia, E. M., and Julkunen, I. (2003). Lactobacilli and streptococci induce inflammatory chemokine production in human macrophages that stimulates Th1 cell chemotaxis. *J Leukoc Biol* *74*, 395-402.
- Verbovetski, I., Bychkov, H., Trahtemberg, U., Shapira, I., Hareuveni, M., Ben-Tal, O., Kutikov, I., Gill, O., and Mevorach, D. (2002). Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7. *J Exp Med* *196*, 1553-1561.
- Vermi, W., Bonecchi, R., Facchetti, F., Bianchi, D., Sozzani, S., Festa, S., Berenzi, A., Cella, M., and Colonna, M. (2003). Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J Pathol* *200*, 255-268.
- Verneris, M. R., Karami, M., Baker, J., Jayaswal, A., and Negrin, R. S. (2004). Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8⁺ T cells. *Blood* *103*, 3065-3072.
- Vigouroux, S., Yvon, E., Biagi, E., and Brenner, M. K. (2004). Antigen-induced regulatory T cells. *Blood* *104*, 26-33.
- Viguiier, M., Lemaitre, F., Verola, O., Cho, M. S., Gorochov, G., Dubertret, L., Bachelez, H., Kourilsky, P., and Ferradini, L. (2004). Foxp3 expressing CD4⁺CD25^(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* *173*, 1444-1453.
- Vincent, T., and Mechti, N. (2004). IL-6 regulates CD44 cell surface expression on human myeloma cells. *Leukemia* *18*, 967-975.
- Viola, A., and Lanzavecchia, A. (1996). T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* *273*, 104-106.
- Voll, R. E., Herrmann, M., Roth, E. A., Stach, C., Kalden, J. R., and Girkontaite, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* *390*, 350-351.
- von Andrian, U. H., and Mempel, T. R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat*

Rev Immunol 3, 867-878.

Vonderheide, R. H., Domchek, S. M., Schultze, J. L., George, D. J., Hoar, K. M., Chen, D. Y., Stephans, K. F., Masutomi, K., Loda, M., Xia, Z., *et al.* (2004). Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8⁺ T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 10, 828-839.

Vyas, Y. M., Maniar, H., and Dupont, B. (2002). Visualization of signaling pathways and cortical cytoskeleton in cytolytic and noncytolytic natural killer cell immune synapses. *Immunol Rev* 189, 161-178.

Wakkach, A., Cottrez, F., and Groux, H. (2001). Differentiation of regulatory T cells 1 is induced by CD2 costimulation. *J Immunol* 167, 3107-3113.

Walker, L. S., Gulbranson-Judge, A., Flynn, S., Brocker, T., Raykundalia, C., Goodall, M., Forster, R., Lipp, M., and Lane, P. (1999). Compromised OX40 function in CD28-deficient mice is linked with failure to develop CXC chemokine receptor 5-positive CD4 cells and germinal centers. *J Exp Med* 190, 1115-1122.

Wang, R. F. (2002). Enhancing antitumor immune responses: intracellular peptide delivery and identification of MHC class II-restricted tumor antigens. *Immunol Rev* 188, 65-80.

Wang, R. F., and Wang, H. Y. (2002). Enhancement of antitumor immunity by prolonging antigen presentation on dendritic cells. *Nat Biotechnol* 20, 149-154.

Weber, C., Draude, G., Weber, K. S., Wubert, J., Lorenz, R. L., and Weber, P. C. (1999). Downregulation by tumor necrosis factor- α of monocyte CCR2 expression and monocyte chemotactic protein-1-induced transendothelial migration is antagonized by oxidized low-density lipoprotein: a potential mechanism of monocyte retention in atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 145, 115-123.

Wen, Y. J., Min, R., Tricot, G., Barlogie, B., and Yi, Q. (2002). Tumor lysate-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma: promising effector cells for immunotherapy. *Blood* 99, 3280-3285.

Wijburg, O. L., van den Dobbelsteen, G. P., Vadolas, J., Sanders, A., Strugnell, R. A., and van Rooijen, N. (1998). The role of macrophages in the induction and regulation of immunity elicited by exogenous antigens. *Eur J Immunol* 28, 479-487.

Willimann, K., Legler, D. F., Loetscher, M., Roos, R. S., Delgado, M. B., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., and Moser, B. (1998). The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *Eur J Immunol* 28, 2025-2034.

Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V. S., Davoust, J., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1997). Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med* 185, 317-328.

Witting, A., Muller, P., Herrmann, A., Kettenmann, H., and Nolte, C. (2000). Phagocytic clearance of apoptotic neurons by Microglia/Brain macrophages in vitro: involvement of lectin-, integrin-, and phosphatidylserine-mediated recognition. *J Neurochem* 75, 1060-1070.

Wu, J., Song, Y., Bakker, A. B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L. L., and Phillips, J. H. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285, 730-732.

Xerri, L., Devilard, E., Hassoun, J., Haddad, P., and Birg, F. (1997). Malignant and reactive cells from human lymphomas frequently express Fas ligand but display a different sensitivity to Fas-mediated apoptosis. *Leukemia* 11, 1868-1877.

Yang, Y., Huang, C. T., Huang, X., and Pardoll, D. M. (2004). Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. *Nat Immunol* 5,

508-515.

Yvon, E. S., Vigouroux, S., Rousseau, R. F., Biagi, E., Amrolia, P., Dotti, G., Wagner, H. J., and Brenner, M. K. (2003). Overexpression of the Notch ligand, Jagged-1, induces alloantigen-specific human regulatory T cells. *Blood* *102*, 3815-3821.

Zeng, Y., Feng, H., Graner, M. W., and Katsanis, E. (2003). Tumor-derived, chaperone-rich cell lysate activates dendritic cells and elicits potent antitumor immunity. *Blood* *101*, 4485-4491.

Zhang, Y., Chau, P., Stroobant, V., Eggermont, A. M., Corthals, J., Maillere, B., Thielemans, K., Marchand, M., Boon, T., and Van Der Bruggen, P. (2003). A MAGE-3 peptide presented by HLA-DR1 to CD4+ T cells that were isolated from a melanoma patient vaccinated with a MAGE-3 protein. *J Immunol* *171*, 219-225.

Zheng, P., Guo, Y., Niu, Q., Levy, D. E., Dyck, J. A., Lu, S., Sheiman, L. A., and Liu, Y. (1998). Proto-oncogene PML controls genes devoted to MHC class I antigen presentation. *Nature* *396*, 373-376.

Zhou, L. J., and Tedder, T. F. (1995). Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* *154*, 3821-3835.

Zhou, X. Y., Yashiro-Ohtani, Y., Nakahira, M., Park, W. R., Abe, R., Hamaoka, T., Naramura, M., Gu, H., and Fujiwara, H. (2002). Molecular mechanisms underlying differential contribution of CD28 versus non-CD28 costimulatory molecules to IL-2 promoter activation. *J Immunol* *168*, 3847-3854.

Zingoni, A., Soto, H., Hedrick, J. A., Stoppacciaro, A., Storlazzi, C. T., Sinigaglia, F., D'Ambrosio, D., O'Garra, A., Robinson, D., Rocchi, M., *et al.* (1998). The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells. *J Immunol* *161*, 547-551.

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