



HAL
open science

Altérations fonctionnelles et phénotypiques des cellules dendritiques plasmacytoïdes et des lymphocytes T régulateurs dans le cancer de l'ovaire

Sana Intidhar Labidi Labidi-Galy

► **To cite this version:**

Sana Intidhar Labidi Labidi-Galy. Altérations fonctionnelles et phénotypiques des cellules dendritiques plasmacytoïdes et des lymphocytes T régulateurs dans le cancer de l'ovaire. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10183 . tel-00861852

HAL Id: tel-00861852

<https://theses.hal.science/tel-00861852>

Submitted on 13 Sep 2013

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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

ECOLE DOCTORALE : BIOLOGIE MOLECULAIRE INTEGRATIVE ET CELLULAIRE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 03 Octobre 2011

par

Mme Sana Intidhar LABIDI-GALY

**Altérations fonctionnelles et phénotypiques des cellules
dendritiques plasmacytoïdes et des lymphocytes T
régulateurs dans le cancer de l'ovaire**

**Directeur de thèse : Pr Jean-Yves BLAY
Co-directrices: Dr Nathalie BENDRISS-VERMARE
Dr Isabelle RAY-COQUARD**

JURY:

Pr Jean-François NICOLAS, Président

Dr Salem CHOUAIB, Rapporteur

Pr Régis JOSIEN, Rapporteur

Pr Frédérique PENAULT-LLORCA, Examineur

Pr Jean-Yves BLAY, Directeur de thèse

Dr Nathalie BENDRISS-VERMARE, Co-directrice de thèse

Dr Isabelle RAY-COQUARD, Co-directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Secrétaire Général

M. A. Bonmartin

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. le Professeur J-F. Mornex

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles
Mérieux

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie
Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Département GEP

Directeur : M. N. Siauve

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Département Physique

Directeur : Mme S. Fleck

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme le Professeur I. Daniel

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. Collignon

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Directeur : M. P. Fournier

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1
Institut de Science Financière et d'Assurances
Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. G. Pignault
Directeur : M. le Professeur C. Coulet
Directeur : M. le Professeur J-C. Augros
Directeur : M. R. Bernard

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes sincères remerciements au Dr Salem Chouaib et au Pr Régis Josien et d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Votre analyse critique et vos commentaires ont été d'une grande aide pour la finalisation de mon manuscrit. Je remercie également le Pr Jean-François Nicolas et Pr Frédérique Penault-Llorca et d'avoir accepté d'évaluer mon travail. C'est un grand honneur pour moi d'être jugé par vous. J'adresse également un grand merci au Dr Bertrand Dubois et au Pr Frédérique Penault-Llorca pour leur participation à mon comité de thèse. Nos entretiens annuels ont été très constructifs et d'une aide inestimable.

J'exprime également toute ma reconnaissance à Nathalie. Je ne sais pas par où commencer. Travailler avec toi pendant ces quatre années ont été une expérience exceptionnelle. En partant je réalise la chance d'avoir travaillé avec une personne aussi rigoureuse et exigeante. J'ai énormément appris, en particulier la rigueur d'une grande scientifique, qualité qui nous manque souvent en tant que médecin. Je pense que tu t'es rendue compte que je n'étais pas la technicienne la plus douée du labo, loin de là, mais j'espère avoir apporté ma contribution avec un regard différent en tant que clinicienne. Travailler sur des cellules aussi rares et fragiles que les pDC a été un véritable défi mais qui a été couronné de succès grâce à ton expertise et ton « contrôle qualité ».

Certes, nos rapports n'ont pas toujours été faciles, avec quelques moments de grande tension mais qui sont à mettre sur nos origines « méditerranéennes » et notre tendance à prendre les choses à cœur mais sans rancune. Au-delà de tes qualités professionnelles, j'ai été marquée par tes qualités humaines exceptionnelles. Ta sincérité et ta générosité dans tes rapports avec les autres m'ont profondément marqués.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à Isabelle. Tout d'abord d'avoir cru en moi en tant que médecin « faisant fonction d'interne », de m'avoir proposé d'être assistante au Centre avant même d'avoir passé le concours d'équivalence. Tu as été d'un soutien sans failles pendant ces quatre années, en acceptant que je m'engage dans une thèse de sciences, ce qui imposait que je me libère à temps partiel de l'activité clinique et en mobilisant ton réseau aussi bien auprès des cliniciens du CLB mais également au niveau de la région pour que je puisse récupérer des prélèvements tumoraux dans les différents hôpitaux et cliniques. J'ai

énormément appris à tes côtés, aussi bien sur le plan médical que sur les rapports humains et ça a été une véritable chance pour moi d'avoir travaillé avec toi.

Je tiens à te remercier Jean-Yves d'avoir été mon « mentor » depuis mon master jusqu'à la fin de la thèse. Comme tout le monde, j'ai été impressionnée par ton intelligence et ta capacité de travail qui te placent largement au-dessus de nous tous mais ceci n'est pas un scoop en soi. Ton soutien m'a ouvert des portes qui dans d'autres lieux auraient été infranchissables et va me permettre de poursuivre une carrière de médecin-chercheur au sein de la meilleure université du monde. J'espère avoir été à la hauteur de tes attentes et retourner travailler avec toi une fois le stage de post-doc accompli.

Je tiens également à te remercier Christophe. Etre sous ta direction était un véritable bonheur et honneur. Je te remercie pour ton implication dans notre projet, ta disponibilité, ta rigueur scientifique, ton soutien et ton aide surtout lors de cette dernière étape de ma thèse. Ton humanité, ta simplicité et ta disponibilité font de toi un directeur de laboratoire exceptionnel et un exemple à suivre.

Je ne trouve pas les mots pour te remercier Vanja d'avoir été mon co-doctorant pendant les trois premières années de la thèse. Ta présence pendant les longues soirées passées devant le cytomètre et dans le bunker de la pièce de culture, ton aide aussi bien « technique que tactique » et ta bonne humeur m'ont été d'un soutien inestimable. Ton positivisme et ton humour nous manquent déjà.

J'adresse également un grand merci à la « pDC team ». Je remercie Sarah pour son aide précieuse tout au long de ma thèse. Travailler avec toi était un grand plaisir dans nos pièces de culture. Merci également à Anaïs et à Sandra.

Je remercie sincèrement la « Treg team ». Merci tout d'abord à Christine qui m'a accueilli à mes débuts et m'a co-encadré pour mon master. Nos rapports n'ont pas toujours été faciles notamment pendant mon master, la faute m'incombe vu que j'étais très peu douée pour l'ELISA mais j'ai appris à mieux te connaître pendant ma thèse. Merci pour ta disponibilité, tu as toujours pris le temps de répondre à mes très nombreuses requêtes. Merci à Miki pour son aide et sa disponibilité au cours de ma thèse, travailler avec toi a été un grand plaisir.

Merci à la Zaza pour les longues journées et soirées passées ensemble lors de nos divers tris cellulaires. Merci pour ta patience, de m'avoir initié au cytomètre et pris le temps de rattraper mes maladresses. Ton expertise est d'une valeur inestimable.

Merci à toute l'équipe du laboratoire pour votre accueil, votre générosité, votre disponibilité et votre bonne humeur. Je n'ai pas été très présente au cours de ces quatre années mais j'ai eu à chaque fois l'impression de revenir à une seconde famille.

Je remercie tous mes collègues et amis cliniciens, en particulier Pierre, François, Olivier, Jean-Paul et Isabelle pour votre aide à récupérer mes prélèvements, votre disponibilité et votre expertise. J'ai énormément appris à vos côtés pendant ces quatre années aussi bien côté bloc que côté anapath. Ce travail n'aurait pas pu aboutir sans votre contribution. Merci également à Hervé et Catherine qui m'ont accueilli à mon arrivée au CLB et qui ont continué à me soutenir tout au long de ces années. Vous êtes pour moi un exemple à suivre aussi bien sur le plan humain que professionnel.

Je remercie également profondément mes parents pour leur amour et leur soutien permanent, mon frère Montadhar. Vous m'avez aidé tout au long de mes études et avez fait de moi ce qui je suis aujourd'hui. Merci également à mes tantes, tata Saida et Najoua pour leur soutien. Un grand merci à mes beaux-parents Dominique et Bernard qui m'ont accueilli les bras ouverts dans leur famille et qui ont été toujours présents.

Enfin je voudrais remercier mon mari Guillaume. C'est difficile de mettre sur quelques lignes tout ce que j'aurais à te dire. Tu as été toujours présent pour moi, tu m'as apporté ton soutien et un réconfort permanent. Ta patience, ta tolérance et ton amour m'ont permis d'aller au bout de mon ambition. Tu m'as offert le bonheur d'être maman d'une petite merveille, et bientôt un deuxième petit Galy. Une grande aventure nous attend de l'autre côté de l'atlantique.

Sommaire

Liste des abréviations	8
Introduction	10
I. Cancer épithélial de l’ovaire	11
Epidémiologie	11
Epidémiologie et immunosurveillance	12
Histologie	14
Pathogenèse	16
Facteurs pronostiques	16
Traitement	19
Nouveaux traitements médicaux	21
Les anti-angiogéniques	22
Les inhibiteurs de PARP	22
II. Cellules dendritiques plasmacytoïdes	23
Historique	23
Phénotype	24
Développement, migration et localisation	25
Réponse immunitaire innée et pDC	26
Rôle biologique de l’IFN- α	27
Régulation de la synthèse d’IFN- α essentielle au contrôle des réponses immunitaires	28
pDC et réponse immunitaire adaptative	29
pDC et pathologies chez l’homme	31
Infections virales	31
Auto-immunité	32
Cancers	33
III. Lymphocytes T régulateurs	35
Historique	35
Origine et migration	36
Mécanismes de suppression des Treg	37
Treg et pathologies chez l’homme	37
IV. Immunologie du cancer de l’ovaire : de la théorie à la thérapeutique	39

Problématique de la thèse	40
Résultats	41
Article 1: Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer	42
Résultats complémentaires de l'article 1	45
Article 2: High infiltration of regulatory T cells is associated with better outcome in ovarian cancer	50
Discussion et perspectives	71
Conclusion	88
Références	90

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique
Ag : Antigène
AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
ARN : Acide ribonucléique
BDCA: *Blood Dendritic Cell Antigen*
b-FGF : *basic Fibroblast Growth Factor*
BRAF: *v-Raf murine Sarcoma viral oncogene homolog B1*
BRCA: *Breast Cancer*
BST2: *Bone marrow Stromal cell antigen 2*
CA125: *Carbohydrate Antigen 125*
CCR: *Chemokine Receptor*
CD: *Cluster of Differentiation*
CHIP: Chimiothérapie Intraperitoneale avec Hyperthermie
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CO: Carcinome Ovarien
CPA : Cellules Présentatrices de l'Antigène
CpG ODN : oligonucléotides contenant des îlots CpG non-méthylés
CPNPC : Carcinome du Poumon Non à Petites Cellules
CT : Chimiothérapie
CTLA-4 : *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*
DC: Cellules Dendritiques
EAE : *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*
EORTC: *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*
FIGO : Fédération Internationale de Gynécologie et Obstétrique
Flt3-L : *Flt3 ligand*
flu virus : *Influenza virus*
FOXO3: *Forkhead box O3*
Foxp3: *Forkhead box p3*
GCIG: *Gynecologic Cancer InterGroup*
GITR: *Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor*
GOG: *Gynecologic Oncology Group*
GVH : Greffon Versus Hôte
HER-2: *Human Epidermal growth factor Receptor 2*
HEV : Veinules Endothéliales Hautes
HIF-1 α : *Hypoxia-Inducible Factor-1 α*
HMGB1: *High Mobility Group B1 protein*
HR: *Hazard Ratio*
HSV : *Herpes Simplex Virus*
ICOS-L: *Inducible Co-Stimulator Ligand*
IDO : *Indoleamine 2,3Dioxygenase*
IFNAR: *IFN- α Receptor*
Ig : Immunoglobuline
IL-2: Interleukine-2
ILT7 : *Immunoglobulin-Like Transcript*
IMC : Index de Masse Corporelle
IFN: Interferon

IPC : *natural Interferon Producing Cells*
 IPEX: *Immune dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy-X-linked syndrom*
 IRF7: *Interferon Regulatory Factor 7*
 ISG : *IFN Stimulated Genes*
 KRAS: *Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog*
 LAG-3: *Lymphocyte Activation Gene-3*
 LFA-1 : *Lymphocyte Function Associated antigen-1*
 Lin: *Lineage*
 LT : Lymphocytes T
 MALT : Tissus Lymphoïdes Associés aux Muqueuses
 mDC : Cellules Dendritiques Myéloïdes
 ME: Microscopie Electronique
 MGG: May-Grünwald Giemsa
 MLR : *Mixed Lymphocyte Reaction*
 MMMT: *Malignant Mixed Mesodermal Tumor*
 MNC: Cellules Mononuclées
 MUC1: Anticorps Anti-Mucine 1
 MxA : *Myxovirus Resistant Gene*
 NFkB: *Nuclear Factor-kB*
 NK: *Natural Killer*
 OAS : *2'-5' OlygoAdenylate Synthase*
 ORL: Oto- Rhino-Laryngologie
 PARP : Poly-(ADP-riboses) Polymérase
 PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cell*
 pDC: Cellules Dendritiques Plasmacytoïdes
 PGE2 : Prostaglandine E2
 PNAD: *Peripheral Lymph Node Adressins*
 PS: Performance Status
 PTEN: *Phosphatase and Tensin homolog*
 RER : Réticulum Endoplasmique Rugueux
 SIDA: Syndrome d'Immunodéficience Acquise
 SLE : Lupus Erythémateux Systémique
 STAT-3: *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*
 TApDC : pDC Associées aux Tumeurs
 Tconv: lymphocytes T conventionnels
 TGF-β: *Transforming Growth Factor-β*
 Th1: *T helper 1*
 TLR: *Toll-Like Receptors*
 TNF-α: *Tumor Necrosis Factor-α*
 TP53: *Tumor Protein 53*
 TRAIL: *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*
 Treg : lymphocytes T régulateurs
 VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*
 VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Introduction

I. Cancer épithélial de l'ovaire

Le carcinome ovarien (CO) est la première cause de décès par cancer gynécologique pelvien dans les pays occidentaux. Malgré une chirurgie optimale et une chimiothérapie (CT) à base de platine et de taxanes, le pronostic reste péjoratif avec une survie à cinq ans limitée à 20 % (Jemal et al., 2008). Ceci est dû au moins en partie à un diagnostic à un stade avancé (III/IV) selon la classification de la fédération internationale de gynécologie et obstétrique (FIGO) dans la majorité des cas (75%). Les critères pronostiques actuels (stade FIGO, qualité de l'exérèse chirurgicale initiale, âge au diagnostic, grade et sous-type histologiques) sont insuffisants pour évaluer les variabilités individuelles de pronostic et de réponse thérapeutique (Sabatier et al.).

Epidémiologie : maladie rare mais grave

En France, le cancer épithélial de l'ovaire se situe au 7^{ème} rang des cancers chez la femme avec 4375 nouveaux cas en 2005, et cette incidence diminue de façon progressive depuis une trentaine d'années. Il se situe au 5^{ème} rang des décès par cancer chez la femme, avec 3180 décès observés en 2005 (Belot et al., 2008).

L'âge est le facteur de risque le plus important. L'âge médian au diagnostic est de 60 ans, et le risque moyen pour une femme sur une vie est estimé à 1 pour 70. Le taux d'incidence est à moins de 20 pour 100000 femmes pour tous les âges de moins de 50 ans mais il augmente régulièrement de 15 à 79 ans jusqu'à un taux de 42,2 pour 100000 (le taux annuel est notamment multiplié par 6 entre 40 et 70 ans). Il décroît ensuite lentement jusqu'à 20,7 pour 100000 chez les plus de 95 ans.

Des antécédents familiaux de cancer du sein et/ou de l'ovaire constituent le deuxième facteur de risque le plus important, et ils sont retrouvés dans environ 10% des cas. Le risque cumulé sur une vie passe de 1% environ en l'absence d'antécédents à près de 5% si une personne apparentée au premier degré a eu un CO et atteint 7% s'il existe deux cas chez des personnes apparentées au premier degré (Nguyen et al., 2002). Dans la majorité des cas, ce sont des modes de vie et d'alimentation « à risque » identiques au sein de mêmes familles qui semblent en cause.

Une prédisposition génétique de type mutation délétère des gènes BRCA1/BRCA2 est retrouvée dans seulement 4 à 11% des cas (Risch et al., 2001). Dans ce cas, il s'agit le plus souvent de carcinomes épithéliaux sévères de haut grade, mais qui ont une évolution plus

favorable (Chetrit et al., 2008). Le risque de CO est également majoré dans le syndrome de Lynch (Bonadona et al.) mais contrairement aux cancers associés à BRCA1/BRCA2, tous les types histologiques peuvent être retrouvés.

Le CO partage avec le cancer du sein des facteurs de risque hormonaux liés à la parité et aux grossesses (Vo and Carney, 2007; Whittemore et al., 1992). Une nulliparité est associée à une augmentation du risque de cancer de l'ovaire alors qu'une contraception orale (Beral et al., 2008), une multiparité et l'allaitement sont associées à une réduction du risque (Whittemore, 1994). Une des hypothèses pour expliquer ces facteurs de risque est celle de l'ovulation répétée qui va exposer les tissus ovariens aux lésions et à l'inflammation qui accompagnent chaque ovulation, en particulier la libération des radicaux libres d'oxygène et de cytokines pro-inflammatoires (Auersperg et al., 1994; Murdoch and Martinchick, 2004) responsables d'altérations de l'ADN. L'accumulation de ces altérations peut aboutir à la cancérisation.

Des pathologies responsables d'une inflammation chronique telles que l'endométriose (pathologie bénigne caractérisée par la présence de tissu endométrial en dehors de la cavité utérine) et les maladies inflammatoires pelviennes (les endométrites, les salpingites et les abcès tubaires) sont associées à une augmentation de la survenue du CO (Pike et al., 2004). Au contraire la prise chronique d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), en particulier l'aspirine réduit le risque de CO (Rosenberg et al., 2000; von Marschall et al., 2003).

Enfin deux méta-analyses réalisées montrent une augmentation du risque de CO chez les femmes en surpoids définies par un Index de Masse Corporelle (IMC) de 25 à 39 ou obèses (IMC de 30 ou plus) à un âge jeune (Modesitt and van Nagell, 2005; Olsen et al., 2007) avec un risque qui pourrait concerner préférentiellement les cancers diagnostiqués avant la ménopause. L'effet du surpoids sur le risque de cancer de l'ovaire serait lié à l'exposition plus fréquente de cette population à des taux élevés d'estrogènes.

Epidémiologie et immunosurveillance

« L'immunosurveillance du cancer » correspond à la capacité du système immunitaire à reconnaître et éliminer les nouvelles cellules tumorales en permanence (Zitvogel et al., 2006). L'interaction hôte-cancer peut entraîner ou non l'élimination de la tumeur. Ainsi est né le concept d'*immunoediting* des tumeurs (Dunn et al., 2006) qui correspond à un processus dynamique d'interactions entre la tumeur et le système immunitaire.

Des études récentes relient les facteurs de risque de différentes localisations de cancers, y compris le cancer de l'ovaire aux dysfonctionnements du système immunitaire (revue de la littérature dans (von Marschall et al., 2003)). Ainsi l'âge s'accompagne d'une altération des

réponses immunes innée et adaptative, phénomène appelé « immunosénescence » (Pawelec et al.). Parmi les changements de la réponse innée avec l'âge, on observe une réduction du chimiotactisme des neutrophiles, de la phagocytose des monocytes/macrophages et la cytotoxicité des cellules *Natural Killer* (NK). Pour l'immunité adaptative, on observe une réduction du nombre de lymphocytes T CD4⁺ naïfs, une augmentation des lymphocytes T CD8⁺ mémoire, une réduction de la longueur de leurs télomères et de la production d'interleukine-2 (IL-2)(Fulop et al.). La diminution du pool de lymphocytes T CD4⁺ naïfs chez les personnes âgées est probablement responsable de leur incapacité à générer une immunité cellulaire T puissante dirigée contre de nouveaux antigènes, alors que l'expansion clonale de cellules T spécifiques de certains virus (cytomégalovirus, Epstein-Barr virus...) va submerger le pool de cellules T et altérer l'expansion de la sous-population mémoire spécifique de nouveaux antigènes (Pawelec et al.).

Les facteurs de risque hormonaux liés à la parité, l'allaitement et la contraception orale pourraient être également expliqués par l'intervention du système immunitaire. Une multiparité et l'allaitement sont associés à une réduction du risque (Whittemore, 1994). La grossesse s'accompagne d'une exposition maternelle aux antigènes fœtaux responsable du développement d'une réponse immune contre ces antigènes (Agrawal et al., 1995). L'expression anormale de ces antigènes fœtaux par les cellules tumorales peut réactiver la réponse immune mémoire et aboutir à leur destruction précoce d'où l'effet protecteur des grossesses répétées. Au contraire, les ovulations répétées de même que les maladies inflammatoires pelviennes et l'endométriose sont responsables d'un microenvironnement inflammatoire chronique qui va favoriser la progression tumorale en inhibant la réponse immune adaptative (Terry et al., 2007).

Autre facteur de risque, l'obésité altère l'immunité des individus. En effet le tissu adipeux fonctionne comme une glande endocrine qui secrète des adipokines telles que la leptine et peut contribuer à une inflammation systémique chronique et à la production d'IL-6. Des études réalisées sur des modèles de souris obèses ont montré une altération de la réponse des lymphocytes T mémoire (Karlsson et al.) lors d'une infection par le virus influenza avec une réduction estimée à 50% de la production d'interféron- γ (IFN- γ). Des taux sériques élevés des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), sont également retrouvés chez les sujets obèses (Zhang et al., 2003). Ces cytokines et l'altération de la réponse cellulaire T seraient responsables d'une immunosuppression favorisant l'apparition de cancer.

Certaines maladies de l'enfance seraient associées à une réduction du risque de CO. Ceci est particulièrement vrai pour l'association avec les oreillons qui a été décrite dès les années 1960 (Schiffman et al., 1985; West, 1966). Récemment une étude a retrouvé des taux sériques élevés d'anticorps anti-mucine 1 (MUC1), un antigène tumoral exprimé par les cellules épithéliales dans les adénocarcinomes (von Marschall et al., 2003), chez les enfants traités pour des oreillons. L'anticorps anti-MUC1 est absent chez les sujets sains mais présent chez la majorité des patientes ayant un CO (Budiou et al.). Une réponse T dirigée contre la forme altérée de MUC1 est également retrouvée chez les patientes (Ioannides et al., 1993). MUC1 est exprimé par les glandes salivaires, l'inflammation des parotides lors des oreillons serait alors responsable de la présentation d'une forme altérée de MUC1 au système immunitaire. Une réponse immune mémoire anti-MUC1 pourrait être réactivée en réponse à l'expression de la forme anormale de la protéine par des lésions précancéreuses, ce qui aboutirait à une élimination précoce des lésions.

Histologie : une grande hétérogénéité

Les tumeurs ovariennes peuvent se développer à partir de l'un des trois types de cellules : épithélium de surface (tumeur épithéliale avec différents sous-types), stromales/cordons sexuels (tumeur de la granulosa, fibro/thécome, tumeur de Sertoli ou de Sertoli/Leydig, tumeur à cellules stéroïdiennes) et cellules germinales (dysgerminome, tumeur vitelline, carcinome embryonnaire, choriocarcinome et tératome).

Les tumeurs épithéliales qui représentent environ 70% des tumeurs de l'ovaire sont classées selon trois critères : i) leur potentiel évolutif [adénomes de comportement bénin (60%), tumeurs *borderline* ou « frontières » également appelées proliférantes mais non infiltrantes ou à malignité atténuée (10 à 15%) et carcinomes infiltrants de comportement plus agressif (25 à 30%)], ii) la présence d'une composante stromale d'accompagnement (adénofibrome sans autre précision qui est bénin, adénofibrome *borderline* ou à malignité atténuée et carcinosarcome agressif) et iii) le type de différenciation épithéliale (séreuse, mucineuse, endométrioïde, à cellules claires, à cellules transitionnelles ou indifférenciées) (Seidman et al., 2004a; Seidman et al., 2004b; Silverberg et al., 2004).

Les trois sous-types épithéliaux les plus fréquents -séreux, endométrioïde et mucineux - se caractérisent par leur analogie morphologique avec divers tissus muqueux de l'appareil génital féminin, de type müllerien. Plus précisément, les tumeurs séreuses ressemblent à l'épithélium tubaire, les tumeurs endométrioïdes à des glandes endométriales et les tumeurs mucineuses à l'épithélium endocervical. En Europe, 60 % des tumeurs malignes de l'ovaire sont de type

séreux, 25 % endométrioïdes, 8 % mucineux et seulement 3 % à cellules claires (Chen et al., 2003). Les cancers séreux sont souvent agressifs et de haut grade et disséminent rapidement dans le pelvis, tandis que les cancers mucineux et endométrioïdes sont généralement des lésions de bas grade, confinées à l'ovaire (Landen et al., 2008; Shih Ie and Kurman, 2004). Les cancers à cellules claires et endométrioïdes sont fortement associés à l'endométriiose contrairement aux autres sous-types (Stern et al., 2001), ce qui conduit certains auteurs à proposer que l'endométriiose pourrait être un précurseur de ces lésions (Sainz de la Cuesta et al., 1996).

Les études moléculaires de *Shih et Kurman* (Kurman and Shih Ie, ; Shih Ie and Kurman, 2004) ont permis de distinguer deux sous-groupes d'adénocarcinomes ovariens : type I et type II (Tableau 1).

Type I	Type II
25% des cancers de l'ovaire	75% des cancers de l'ovaire
tumeur de bas grade	tumeur de haut grade
tumeur de stade I au diagnostic	tumeur de stade > I au diagnostic
présence de précurseurs (dépistage possible ?)	précurseurs ? (pas de dépistage possibles ?)
bon pronostic (évolution lente)	mauvais pronostic (évolution rapide)
peu chimiosensibles	sensibles à la chimiothérapie
génétiqument stable : mutations de KRAS, BRAF, bêta-caténine, PTEN sans mutation de TP53	génétiqument instable : mutation de P53, mutation BRCA (forme familiale)
types histologiques :	type histologique :
- carcinome séreux de bas grade	- carcinome séreux de haut grade
- carcinome mucineux	- carcinosarcome (MMMT)
- carcinome endométrioïde bas grade	- carcinome indifférencié
	- carcinome endométrioïde haut grade

Tableau 1 : Classification moléculaire des cancers épithéliaux de l'ovaire. MMTT : *malignant mixed mesodermal tumor* (Treilleux, 2011).

Les tumeurs de type I représentent 25% des cancers épithéliaux de l'ovaire. Il s'agit principalement de tumeurs de bas grade, diagnostiquées à un stade localisé (stade I) avec des lésions précurseurs. Elles sont d'évolution lente, peu sensibles à la chimiothérapie et ont un bon pronostic. Elles sont génétiquement stables : mutations de KRAS, BRAF, bêta-caténine, PTEN. Il n'y a pas de mutation de TP53 mais chaque sous-type histologique a un profil moléculaire distinct. Au niveau histologique on retrouve 3 sous-types : carcinome séreux de bas grade, carcinome mucineux et carcinome endométrioïde de bas grade. Les tumeurs de type II représentent 75% des cancers épithéliaux de l'ovaire. Il s'agit essentiellement de tumeurs de haut grade, diagnostiquées à un stade avancé (III/IV), d'évolution rapide, sensibles

à la chimiothérapie mais de pronostic sombre. Ces tumeurs sont génétiquement instables : mutation de TP53 dans 96% des cas, mutation de BRCA dans 22% des cas (Napoletano et al.). On distingue 4 sous-types histologiques : carcinome séreux de haut grade, carcinosarcome ou *malignant mixed mesodermal tumor* (MMMT), carcinome indifférencié et carcinome endométrioïde de haut grade. Le carcinome à cellules claires ne rentre ni dans l'un ni dans l'autre des types de carcinome ; il partage certaines caractéristiques des tumeurs de type I (précurseurs, stades peu avancés,...) mais il s'agit d'une tumeur de haut grade comme les tumeurs de type II.

Pathogénèse : type I et type II

Les études morphologiques et de biologie moléculaire ont récemment permis de mieux comprendre la pathogénèse du cancer de l'ovaire, maladie très hétérogène au niveau histologique (Kurman and Shih 1e). L'hypothèse selon laquelle tous les cancers de l'ovaire prendraient origine à partir de l'épithélium de surface ovarien est actuellement réfutée.

La classification moléculaire de *Shih et Kurman* (Kurman and Shih 1e) des cancers de l'ovaire distingue deux types : type I et type II (Tableau 1). Pour chaque type moléculaire, il y a une hypothèse de carcinogénèse.

Les cancers de l'ovaire de type I correspondent à des tumeurs de bas grade à croissance lente et prendraient origine à partir de l'épithélium de surface de l'ovaire qui est agressé par les ovulations répétées. Les cancers ovariens de type II, constitués presque exclusivement des cancers séreux de haut grade (Karst and Drapkin, ; Karst et al.) prendraient origine à partir de l'épithélium de la trompe de Fallope. Cette hypothèse a été formulée à la suite d'une série d'études décrivant 0,9 à 50% de cancers tubaires occultes chez des femmes porteuses d'une mutation BRCA1-2, ayant eu une annexectomie (ablation des ovaires et des trompes) bilatérale prophylactique (Finch et al., 2006; Leeper et al., 2002). Ces cancers intra-épithéliaux séreux tubaires ont été retrouvés également chez la moitié des femmes non mutées BRCA1-2 ayant un cancer de l'ovaire séreux (Kindelberger et al., 2007). Ces observations suggèrent que beaucoup de tumeurs « ovariennes » séreuses de haut grade seraient d'origine tubaire, apparaissant dans la région distale de la trompe, avec une extension rapide à l'ovaire contigu.

Facteurs pronostiques :

La détermination des facteurs pronostiques des CO est une étape essentielle pour leur prise en charge thérapeutique. Les facteurs pronostiques indépendants établis ayant un impact sur la

décision thérapeutique sont l'extension tumorale selon le stade FIGO (Tableau 2 et Figure 1), la taille du résidu tumoral postopératoire, le type histologique et le grade de différenciation (dans les stades précoces), l'âge et l'indice de performance.

Stade	caractéristiques
I	Tumeur limitée aux ovaires
Ia	Atteinte d'un seul ovaire, capsule intacte
Ib	Atteinte des deux ovaires, capsule intacte
Ic	Rupture capsulaire, tumeur envahissant la surface de l'ovaire ou cytologie péritonéale positive
II	Tumeur étendue au pelvis
IIa	Atteinte de l'utérus ou des trompes
IIb	Extension aux autres tissus pelviens
IIc	Extension aux tissus pelviens et cytologie péritonéale positive
III	Tumeur étendue à l'abdomen ou aux ganglions lymphoïdes
IIIa	Extension péritonéale microscopique
IIIb	Extension péritonéale macroscopique avec un diamètre des nodules inférieure à 2 cm
IIIc	Extension péritonéale macroscopique avec un diamètre des nodules supérieure à 2 cm ou atteinte des ganglions lymphoïdes
IV	Métastases à distance incluant une atteinte de la plèvre (avec cytologie positive), de la rate ou du foie

Tableau 2 : Classification des cancers de l'ovaire selon la fédération internationale de gynécologie obstétrique (FIGO).

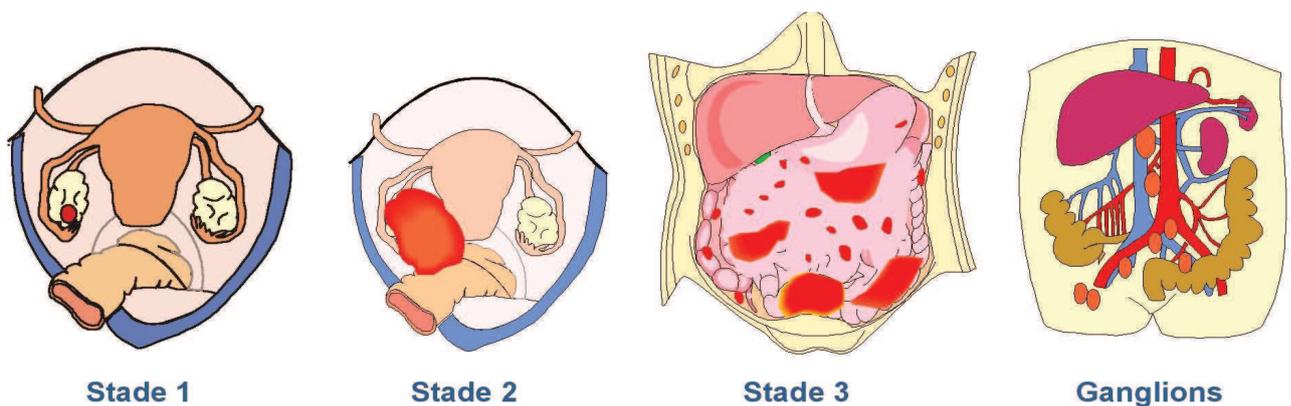


Figure 1 : les stades du cancer de l'ovaire selon la classification de la FIGO.

Le stade est le facteur pronostique le plus important avec une survie globale à 5 ans estimée à 80 % dans les stades I et moins de 20 % pour les stades IV (Heintz et al., 2003).

Les « sous-stades » de la classification FIGO ont également une valeur pronostique (Figure 2) :

- Dans les stases I et II, les sous-stades A (unilatéralité), B (bilatéralité) et C (cytologie péritonéale positive, tumeur à la surface de l’ovaire ou rupture capsulaire) ont une valeur pronostique mal établie. L’analyse rétrospective de 1545 patientes atteintes d’un carcinome ovarien de stade I par *Vergote* identifie la rupture capsulaire qu’elle soit pré ou per-opératoire comme facteur pronostique indépendant (Vergote et al.).
- dans les stades III, le stade IIIC a un plus mauvais pronostic par rapport aux stades IIIA/IIIB, ces deux derniers ne présentant pas de différences significatives de survie à 5 ans après chirurgie initiale. Une analyse récente de 13918 patientes atteintes de CO stades III/IV confirme le mauvais pronostic conféré par l’atteinte ganglionnaire (Sharma et al., 2007).

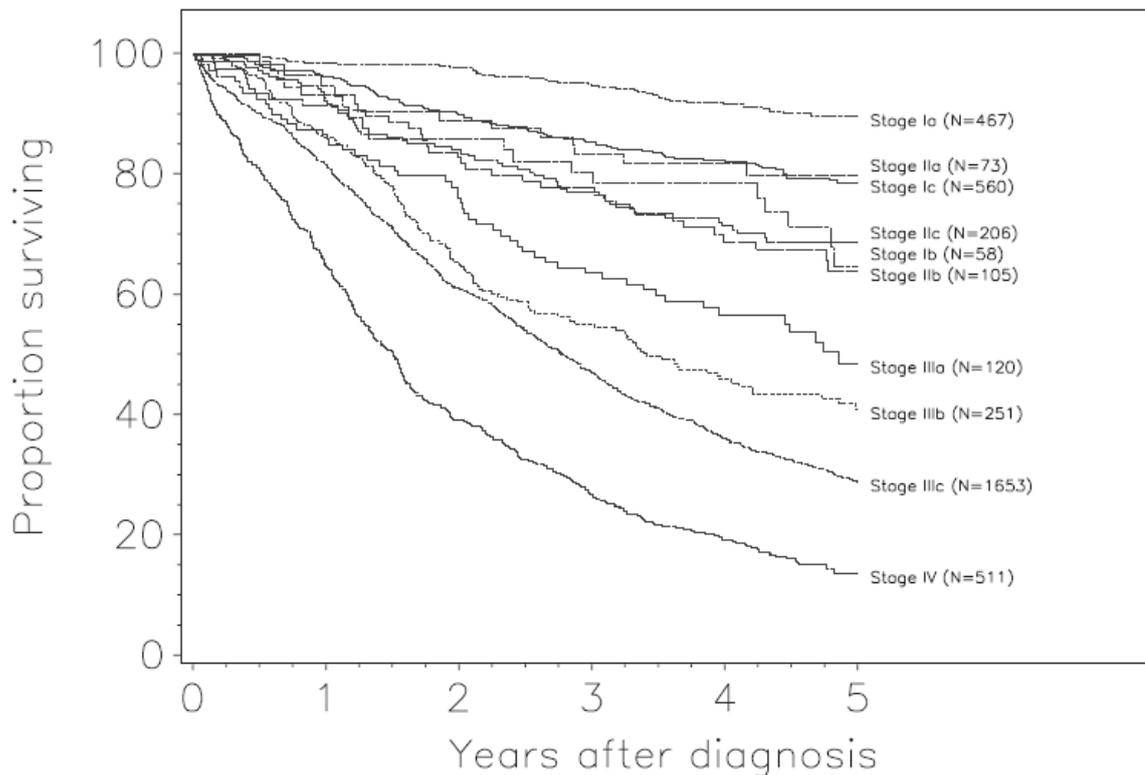


Figure 2 : Survie en fonction du stade FIGO d’après Heintz (Heintz et al., 2003).

La qualité de l’exérèse chirurgicale est le deuxième facteur pronostique le plus important. De nombreuses études dont deux méta-analyses (Bristow et al., 2002; du Bois et al., 2009) ont confirmé que la taille du reliquat tumoral était un facteur pronostique indépendant essentiel dans la prise en charge des CO de stade avancé. Ce résidu est déterminé à la fois par la qualité de la chirurgie d’exérèse et donc de l’expérience du chirurgien mais également par le volume

et l'extension de la maladie. L'étude de *du Bois* portant sur 3126 patientes atteintes de CO stade FIGO IIB à IV a estimé la survie médiane à 99,1 mois en l'absence de résidu tumoral post-opératoire, 36,2 mois pour un reliquat de 1-10mm et 29,6 mois en cas de résidu > 10mm (du Bois et al., 2009).

L'âge et le performance status (PS, indice d'activité globale avec un score de 0 à 4) sont souvent corrélés au stade FIGO du fait de l'histoire naturelle de la maladie. Ils ont été identifiés comme facteurs pronostiques indépendants surtout dans les stades avancés (Winter et al., 2007).

Le type histologique n'est pas retrouvé de manière systématique comme un facteur pronostique indépendant et semble avoir une influence essentiellement dans les stades avancés. Les adénocarcinomes mucineux et à cellules claires ont un moins bon pronostic en comparaison avec les formes séreuses, du fait de leur chimiorésistance (Gao et al., 2007; Hess et al., 2004).

Le grade histologique est déterminant surtout chez les patientes de stade I où il est recommandé de réaliser une chimiothérapie adjuvante en cas de tumeur de grade 3 (Chan et al., 2008; Vergote et al.). Par contre dans les stades III son intérêt pronostic n'est pas retrouvé (Winter et al., 2007).

La surexpression d'HER-2 est rare et serait associée à une survie globale plus courte (Camilleri-Broet et al., 2004; Hogdall et al., 2003) mais actuellement il n'y a pas de données cliniques suffisantes pour utiliser le trastuzumab (anticorps monoclonal anti-HER-2) chez les patientes ayant un cancer de l'ovaire (Serrano-Olvera et al., 2006). A noter que la présence de récepteurs à la progestérone mais pas l'œstrogène semble de bon pronostic (Mold et al., 2008).

Pour les patientes traitées par chimiothérapie, on retiendra la valeur prédictive de la décroissance du marqueur sérique CA125 en cours de traitement. Une normalisation rapide du CA125 sous chimiothérapie par PACLITAXEL et CARBOPLATINE est un facteur pronostique indépendant associé à une meilleure survie (Riedinger et al., 2008).

Traitement : chirurgie maximale et chimiothérapie

Le traitement du cancer de l'ovaire nécessite une prise en charge multidisciplinaire par une équipe entraînée qui inclut un temps chirurgical et une chimiothérapie associant PACLITAXEL et CARBOPLATINE.

Aujourd'hui, la chirurgie initiale des cancers de l'ovaire ne se conçoit que si elle ne laisse aucun reliquat macroscopique visible dans la cavité péritonéale. Elle est alors dite complète. La taille du plus gros résidu tumoral après chirurgie (<1cm, <2cm) était considéré comme un facteur pronostique jusqu'au début des années 2000 mais elle n'a plus cours aujourd'hui et seule une chirurgie complète (absence de résidu tumoral) trouve sa place dans le traitement des cancers de l'ovaire (Chi et al., 2006; du Bois et al., 2009).

Une évaluation minutieuse de la résectabilité en préopératoire doit être réalisée à partir des données du scanner abdomino-pelvien et de l'examen clinique incluant les touchers pelviens. Une atteinte étendue du mésentère, du pédicule hépatique ou de l'intestin grêle contre-indique une prise en charge chirurgicale d'emblée. Cette évaluation peut également comporter une cœlioscopie à visée diagnostique qui permettra de détecter l'existence d'une miliaire carcinomateuse (métastases multiples et de taille millimétrique atteignant tout le péritoine), souvent invisible au scanner.

La chirurgie « classique » du cancer de l'ovaire inclut une hystérectomie avec annexectomie bilatérale, une omentectomie (résection du grand épiploon), une appendicectomie et une cytologie péritonéale. Les gestes associés peuvent inclure une peritonectomie, une splénectomie, une pelvectomie, des résections digestives et des coupes diaphragmatiques, l'objectif ultime étant qu'il ne reste aucun résidu tumoral. Les curages ganglionnaires (pelviens et/ou lombo-aortiques) sont effectués en fin d'intervention, une fois que la totalité des lésions de carcinose ont été réséquées. Dans le cas où il reste des résidus tumoraux non résécables, il n'y a pas d'indication à réaliser de curage (Trimbos).

La morbidité (30 à 40%)(Gerestein et al.) et la mortalité (2.8%)(Gerestein et al., 2009) de cette chirurgie sont importantes du fait de l'importance des gestes chirurgicaux réalisés, avec souvent des résections d'une partie du tube digestif chez des patientes dont l'âge moyen au diagnostic est de 60 ans.

La chimiothérapie adjuvante (en postopératoire) est indiquée chez la grande majorité des patientes opérées pour un cancer de l'ovaire. Seules les patientes opérées de façon optimale (sans rupture per-opératoire) pour une tumeur de stade I et grade 1 n'ont pas besoin d'une chimiothérapie. Pour les autres, l'administration de 4 à 6 cures de PACLITAXEL et CARBOPLATINE est le traitement médical de référence quelque soit le sous-type histologique et cela n'a pas changé depuis 10 ans (du Bois et al., 2009; Ozols et al., 2003). Cette chimiothérapie est habituellement administrée après une chirurgie optimale, c'est-à-dire quand l'effort chirurgical a été maximal.

Depuis la publication récente par Vergote et al (Vergote et al.) des résultats de l'essai de phase III de l'EORTC 55971 montrant la non-infériorité de la chimiothérapie néoadjuvante (préopératoire) suivie d'une chirurgie d'intervalle au traitement classique (chirurgie complète suivie d'une chimiothérapie adjuvante), la chirurgie d'intervalle est devenu une option approuvée par la quatrième conférence de consensus du *Gynecologic Cancer InterGroup (GCIG)* sur le cancer de l'ovaire (Stuart et al.).

A la rechute, le traitement dépend de l'intervalle libre par rapport à la fin de la chimiothérapie, ainsi que du site de rechute. L'intervalle libre est défini par le délai entre la fin de la chimiothérapie à base de platines et la progression. Les patientes qui présentent une progression de la maladie sous chimiothérapie sont désignées comme « platine-réfractaires », celles qui rechutent moins de 6 mois après la fin de chimiothérapie sont appelées « platine-résistantes », celles qui rechutent entre 6 et 12 mois sont appelées « platine-potentiellement sensibles » et celles qui rechutent au-delà de 12 mois sont appelées « platine-sensibles » (Monk and Coleman, 2009).

La durée de l'intervalle libre est prédictive de la réponse à la chimiothérapie au moment de la progression. Actuellement, il est admis de proposer une polychimiothérapie à base de sels de platine chez les patientes « platine-potentiellement sensibles » et « platine-sensibles », c'est-à-dire celles qui rechutent avec un intervalle libre supérieur à 6 mois. Les patientes « platine-réfractaires » et « platine-résistantes » ont un pronostic plus sombre et peuvent être traitées par une monochimiothérapie de type paclitaxel, doxorubicine liposomale pegylée, topotecan ou gemcitabine (Liu and Matulonis, 2006; Main et al., 2006).

La chirurgie peut-être réalisée au décours de la chimiothérapie chez les patientes qui ont bénéficié de la chirurgie initiale (intervalle libre long). Elle peut-être proposée d'emblée en cas de rechute sur un site unique tel que la rate ou un ganglion rétropéritonéal.

Enfin la chimiothérapie intrapéritonéale avec hyperthermie (CHIP) est indiquée en cas de rechute uniquement dans le cadre d'un essai clinique et chez les patientes qui peuvent bénéficier d'une résection chirurgicale complète (Deraco et al.).

Nouveaux traitements médicaux : antiangiogéniques et inhibiteurs de PARP

Depuis l'introduction des taxanes en 1996 dans l'arsenal thérapeutique des carcinomes ovariens, les progrès thérapeutiques ont été pratiquement absents, comme en témoignent les courbes de mortalité pratiquement égales (Jemal et al., 2008). Plusieurs classes de thérapies ciblées sont actuellement à l'étude dans cette pathologie. Les résultats les plus prometteurs

concernent les anti-angiogéniques et les inhibiteurs de poly-(ADP-riboses) polymérase (PARP) chez les patientes porteuses de mutation de BRCA1/BRCA2 (Cottu et al., 2011).

Les anti-angiogéniques : Le rationnel préclinique est important pour utiliser les anti-angiogéniques dans le traitement des adénocarcinomes ovariens : il existe une surexpression des récepteurs au VEGF (VEGFRs) au niveau des cellules tumorales ovariennes et elle est associée à mauvais pronostic (Nishida et al., 2004; Yokoyama et al., 2003). De même des taux élevés de VEGF dans le sérum (Hefler et al., 2006) et les ascites (Bamias et al., 2008) est délétère. L'activation des voies de signalisation sous le contrôle de VEGF/VEGFR entraîne la prolifération tumorale et augmente le potentiel invasif de la tumeur (Wang et al., 2006). A partir de ces constatations, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été développées pour inhiber l'angiogénèse i) soit par action directe en utilisant des molécules liant le VEGF-A tels qu'un anticorps monoclonal anti-VEGF (bevacizumab) ou un récepteur soluble du VEGF (aflibercept), ii) soit en ciblant les récepteurs au VEGF : il s'agit alors de petites molécules inhibant la partie tyrosine-kinase du VEGFR telles que le pazopanib ou le sorafenib. Actuellement, la molécule la plus avancée au niveau du développement clinique est le bevacizumab qui, associé à une chimiothérapie par CARBOPLATINE-PACLITAXEL, a montré dans deux études randomisées de phase III (GOG 218 et ICON7)(Burger et al., 2010; Perren et al., 2010) un bénéfice significatif en survie sans progression mais pas en survie globale en première ligne de traitement.

Les inhibiteurs de PARP : Les PARP sont des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN, en particulier des cassures simple brin. Les inhibiteurs de PARP (PARPi) sont actifs chez les patientes présentant des mutations de BRCA1 ou de BRCA2 qui engendrent des anomalies constitutionnelles de la réparation de l'ADN. En effet, dans le contexte d'une anomalie de BRCA, les PARPi induisent une accumulation de cassures simple brin qui vont aboutir à des cassures double brin, ce qui provoque une apoptose des cellules tumorales. Actuellement l'olaparib est le PARPi le plus avancé au niveau de développement clinique. Les résultats d'une étude de phase II randomisée comparant l'olaparib à un placebo chez 265 patientes pré-traitées (plus de deux lignes de chimiothérapie) ayant un cancer de l'ovaire en rechute et porteuses d'une mutation BRCA1/BRCA2 montrent un bénéfice net en faveur de l'olaparib en termes de survie sans progression (médiane à 8.4 mois comparée à 4.8 mois, HR=0.35)(Ledermann et al., 2011). Ces résultats très encourageants ouvrent une nouvelle ère dans le traitement médical du cancer de l'ovaire. Les inhibiteurs de PARP sont actuellement évalués comme traitement d'entretien (à la fin de la chimiothérapie) mais également en première ligne en association avec la chimiothérapie.

II. Cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) appartiennent à la grande famille des cellules dendritiques (DC), une population hétérogène de cellules présentatrices de l'antigène (CPA) professionnelles. Deux sous-types distincts sont identifiés depuis une dizaine d'année : les cellules dendritiques conventionnelles ou myéloïdes (mDC) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)(Cella et al., 1999; Siegal et al., 1999).

En tant qu'effecteurs de l'immunité cellulaire, les pDC participent à de nombreuses réponses immunes normales et pathologiques, notamment l'asthme et l'allergie (Kool et al., 2008), l'immunité antitumorale (Zou et al., 2001) et la réponse à différents pathogènes viraux (Feng et al., 2009) et non viraux (Ang et al., ; Pepper et al., 2008). Nous allons revoir ici les principales caractéristiques de ces cellules.

Historique ;

Les pDC ont été décrites pour la première fois en 1958 par des pathologistes allemands Lennert and Remmele (Feller et al., 1983) comme étant des plasmocytes situés dans les zones des cellules T des organes lymphoïdes enflammés d'où leur nom « plasmocytes associés aux cellules T ». En 1983, Feller et al ont montré grâce à des études phénotypiques que ces plasmocytes exprimaient le CD4 mais pas les marqueurs des lymphocytes B et ont été appelées «cellules T plasmacytoïdes »(Feller et al., 1983).

Le nom «cellules T plasmacytoïdes » a été remis en question par Dr Facchetti qui a montré que ces cellules n'expriment pas CD3 mais des taux élevés des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II ainsi que la chaîne α du récepteur d'IL-3 (CD123) et il les a appelé « monocytes plasmacytoïdes »(Facchetti et al., 1988).

Ce n'est qu'à la fin des années 1990 que les équipes de Liu et Siegal ont montré que ces « monocytes plasmacytoïdes » isolées des amygdales étaient capables d'acquérir un phénotype de DC en présence du ligand de CD40 (CD40L/CD154) ou IL-3 et d'induire une activation des lymphocytes T naïfs (Grouard et al., 1997; Siegal et al., 1999) d'où leur appellation « cellules dendritiques plasmacytoïdes ». Elles sont dépendantes de l'IL-3 pour leur survie *in vitro* (Kohrgruber et al., 1999; Rissoan et al., 1999).

En 1999 Siegal (Siegal et al., 1999) et Cella (Cella et al., 1999) identifièrent la fonction majeure des pDC du sang et des organes lymphoïdes qui est leur capacité à produire des taux élevés d'IFN de type I (200 à 1000 plus que les autres types de cellules immunes) en réponse à Herpes Simplex Virus (HSV) or Influenza virus (flu virus), bloquant la réplication et la

dissémination virale. Les pDC perdent rapidement cette capacité de produire IFN de type I après maturation en DC en présence d'IL-3 ou HSV. Ces observations suggèrent qu'après avoir reconnu des agents pathogènes microbiens, les pDC produisent rapidement des IFN de type I en tant qu'effecteur de la réponse immune innée, et par la suite elles se différencient en DC capables d'induire une réponse immune adaptative.

Grâce à l'identification de leur capacité à produire de grandes quantités d'IFN de type I, les scientifiques ont pu faire la connexion entre pDC et *natural interferon producing cells* ou IPC, une sous population de cellules mononuclées (MNC) du sang identifiées dès les années 1970 comme produisant plus d'IFN de type I que les autres cellules du sang (Yamaguchi et al., 1977). Ces IPC expriment des molécules de classe II du CMH, suggérant qu'elles peuvent être des DC (Perussia et al., 1985). Les études phénotypiques extensives publiées en 1996 par Svensson et al ont montré que les IPC ont un phénotype CD4⁺HLA-DR⁺CD45RA⁺CD11c⁻CD11b⁻CD14⁻CD13⁻CD33⁻CD16⁻CD80⁻CD86⁻ (Svensson et al., 1996). C'est en se basant sur les similitudes entre le phénotype des pDC et des IPC et en réussissant à purifier les pDC (pureté >99%) que Siegal et al ont montré que les pDC sont en fait des IPC (Siegal et al., 1999).

Phénotype

Les pDC sont rares, représentant 0.3 à 0.5% des cellules mononuclées du sang (PBMC). Elles sont rondes, de surface lisse, mesurent 8 à 10 µm de diamètre et contiennent un réticulum endoplasmique rugueux (RER) abondant comme les plasmocytes, d'où leur nom plasmacytoïdes (Figure 3) (Grouard et al., 1997).

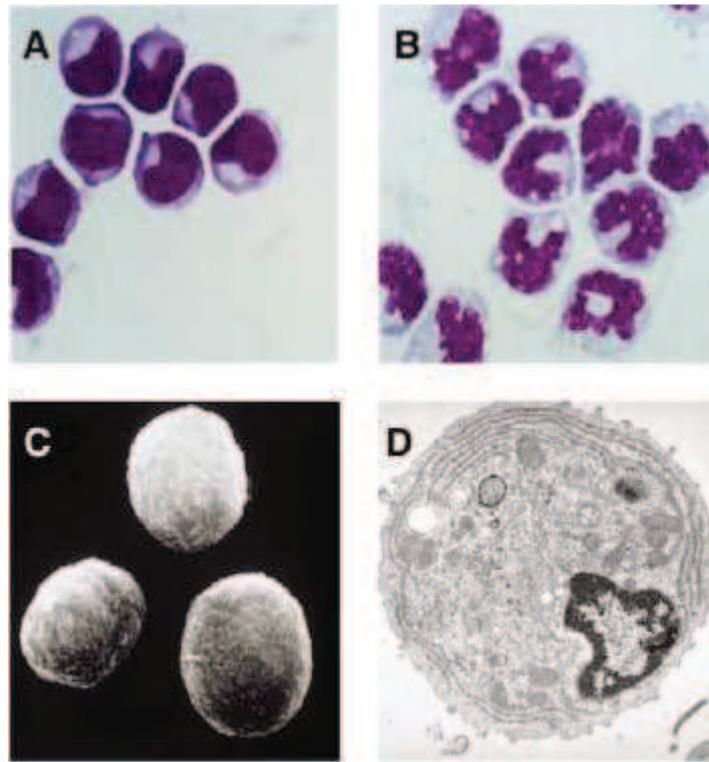


Figure 3: Aspect morphologique des pDC au May-Grünwald Giemsa (MGG). (B) Coloration des monocytes au MGG. (C) Photo en 3-dimension en microscopie électronique (ME) des pDC. (D) Image en 2-dimension en ME des pDC. D'après Liu (Liu, 2005).

Chez l'homme, les pDC étaient initialement identifiées dans le sang et les amygdales sur la base de leur phénotype $CD4^+CD123^+$ et l'absence d'expression d'antigènes (Ag) de lignée (Lin^-), c'est à-dire d'Ag des lymphocytes T ($CD3^-$), B ($CD19^-$), NK ($CD16^-$, $CD56^-$), monocytes macrophages ($CD14^-$), mDC ($CD11c^-$) (Grouard et al., 1997; Risoan et al., 1999). Ainsi on peut isoler les pDC par un phénotype $CD4^+CD11c^-Lin^-$ ou $CD123^{high}HLA-DR^+Lin^-$. Plus récemment, des marqueurs spécifiques des pDC tels que *blood dendritic cell antigen* (BDCA2) (Dzionek et al., 2001), BDCA4 (Liu, 2005) et *immunoglobulin-like transcript 7* (ILT7) (Risoan et al., 2002) ont facilité leur isolement.

Les pDC ont été identifiées chez la souris en 2001 par 3 équipes indépendantes comme étant des cellules ayant un phénotype $CD11c^+B220^+Gr-1^+CD45Rb^{high}CD11b^-$ (Asselin-Paturel et al., 2001; Bjorck, 2001; Nakano et al., 2001).

Développement, migration et localisation

Les pDC se développent dans la moelle osseuse à partir de progéniteurs $Flt3^+c-Kit^{low}$ communs aux DC et aux lymphocytes. Cette étape fait intervenir le facteur de croissance *Flt3 ligand* (Flt3-L) (Schmid et al.) qui agit à travers son récepteur Flt3 et le facteur de

transcription STAT3. Récemment a été mis en évidence le rôle clé d'E2-2, un facteur de transcription (protéine E) hélice-boucle-hélice basique intervenant dans la lymphopoïèse, dont la surexpression permet le développement des pDC (Esashi et al., 2008). Une étude du transcriptome des pDC humaines montre qu'elles expriment des gènes communs avec les mDC BDCA1 et BDCA3 appelés *pan DC cluster* dont une partie est impliquée dans la réponse inflammatoire (Robbins et al., 2008).

A partir de la moelle osseuse, les pDC migrent grâce à la circulation sanguine vers les zones riches en cellules T des organes lymphoïdes secondaires où elles restent dans un état quiescent. Elles pénètrent dans les ganglions lymphoïdes, les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT) et les zones marginales de la rate à partir du sang par diapédèse au niveau des veinules endothéliales hautes (HEV)(Sozzani et al.). A titre de comparaison, les mDC immatures et les monocytes migrent après stimulation des tissus non-lymphoïdes vers les zones riches en cellules T des ganglions lymphoïdes à travers les vaisseaux lymphatiques afférents.

La migration des pDC dans les organes lymphoïdes secondaires fait intervenir CD62L (Nakano et al., 2001; Yoneyama et al., 2004) et CCR7 (Seth et al.) exprimés à leur surface et qui interagissent avec des ligands de L-selectine, *peripheral lymph node adressins (PNAD)*, et les chimiokines ELC/CCL19 et SLC/CCL21 exprimés par les HEV (Penna et al., 2001) et les cellules stromales des zones riches en cellules T (Cella et al., 1999). Dans les conditions physiologiques, les pDC sont indétectables dans la plupart des tissus périphériques tels que la peau, les muqueuses et les poumons. Au contraire, une accumulation des pDC est observée dans les tissus lors de pathologies inflammatoires telles que les infections virales ou les maladies auto-immunes (revue de la littérature dans (Stuart et al.)). Les expériences d'incorporation du BrdU par les pDC de souris suggèrent une demi-vie longue (O'Keeffe et al., 2005) mais qui pourrait être également expliquée par leur quiescence en l'absence de stimulation, et à ce jour la demi-vie de ces cellules reste méconnue.

Réponse immune innée et pDC : cellules productrices professionnelles d'IFN de type I

Les pDC expriment de façon spécifique les récepteurs endosomaux intracellulaires spécifiques des acides nucléiques, les *Toll-like receptors (TLR)* TLR7 et TLR9 mais pas les autres TLR (Kadowaki et al., 2001). Par comparaison, les mDC expriment TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 et TLR8. Le TLR7 reconnaît les ARN simples brins riches en uridine et/ou guanosine dérivés des virus à ARN (dans le cas des virus de l'influenza et de la stomatite vésiculaire)(Heil et al., 2004; Lund et al., 2004) mais également une classe de

composants antiviraux synthétiques dérivés des imidazoquinolines (Hemmi et al., 2002). Le TLR9 reconnaît les oligonucléotides contenant des îlots CpG non-méthylés (CpG ODN)(Bauer et al., 2001; Krug et al., 2001) et l'ADN viral double brin (dans le cas des virus de l'herpès et du CMV murin)(Krug et al., 2004; Lund et al., 2003). De plus, il a été récemment rapporté que les pDC reconnaissent également les ODN CpG *via* des hélicases à ADN cytosoliques de la famille des DHX (Kim et al.). Par ailleurs, l'ADN et l'ARN du soi peuvent également activer les récepteurs TLR9 et 7 respectivement mais uniquement lorsqu'ils sont complexés à des peptides antimicrobiens tels que LL37 (Lande et al., 2007), comme observé dans le lupus et le psoriasis.

L'activation de TLR7 et TLR9 conduit au recrutement d'une protéine adaptatrice MyD88 et à l'assemblage de complexes multiprotéiques de signalisation qui mène à la production d'IFN- α (voie IRF7-dépendante)(Guiducci et al., 2006; Honda et al., 2005a) ou à la maturation et la production de cytokines inflammatoires (voie NFkB-dépendante) par les pDC (Honda et al., 2005a; O'Keeffe et al., 2005).

La caractéristique majeure des pDC est leur capacité à répondre de façon rapide (quelques heures) et intense aux ligands de TLR7 et TLR9, en produisant de grandes quantités d'IFN de type I (3-10 pg/cellule), soit 300 fois plus que les mDC (Liu, 2005), d'où leur rôle prépondérant dans l'immunité antivirale, y compris l'infection par le virus d'immunodéficience acquise (HIV)(Feng et al., 2009). Après stimulation virale, la majorité de l'IFN- α est produit dans les 24 premières heures et les pDC deviennent par la suite réfractaires à une stimulation secondaire par le même virus ou un autre. De plus, il a été montré que les ligands de TLR7 inhibent la réponse des pDC aux ligands de TLR9 en termes de production d'IFN- α (Berghofer et al., 2007).

L'activation des pDC par la voie TLR entraîne ainsi la production d'IFN- α et la sécrétion d'autres cytokines telles que le TNF- α et l'IL-6. Elle peut également entraîner leur maturation avec augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation (CD83 et CD86) d'où l'acquisition de la capacité d'activer les lymphocytes T en devenant des CPA

Rôle biologique de l'IFN- α

Les protéines interféron (IFN) sont habituellement divisées en deux classes : IFN de type I ou viral (α , β) et type II (γ) ou immun. L'IFN- α joue un rôle majeur dans l'immunité antivirale en agissant directement sur les cellules infectées, mais également en régulant la réponse immune antivirale. Ainsi l'IFN- α se lie à son récepteur IFNAR exprimé à la surface des cellules infectées, induisant l'activation d'une centaine de gènes liés à cette cytokine appelés *IFN*

stimulated genes (ISG). Parmi les ISG les mieux connus, on trouve *myxovirus resistant gene* (MxA), PKR et 2'-5' *OlygoAdenylate Synthase* (OAS)(Garcia-Sastre and Biron, 2006). Ces gènes agissent en bloquant la réplication virale intracellulaire, en favorisant la dégradation de l'ARNm viral ainsi que le suicide des cellules infectées (Samuel, 2001). L'IFN- α active la réponse immune antivirale par différents mécanismes incluant un rétrocontrôle positif sur sa production par les pDC en augmentant l'expression d'IRF7 (Honda et al., 2005b) mais également en favorisant l'activité cytotoxique des lymphocytes NK (Dalod et al., 2003), la production d'immunoglobulines par les plasmocytes (Le Bon et al., 2001) et la différenciation des lymphocytes T naïfs en *T helper 1 (Th1)* producteurs d'IFN- γ (Nguyen et al., 2002) permettant ainsi d'établir un lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

En oncologie, l'IFN- α est la cytokine qui a été la plus étudiée en clinique (Bracci et al., 2007). Elle exerce un effet antitumoral direct en inhibant la prolifération des cellules tumorales à la fois *in vitro* (Einhorn et al., 1982; Epstein et al., 1980) et *in vivo* (Berek et al., 1999a; Berek et al., 1999b), en réduisant l'expression des oncogènes et augmentant l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs (revue de la littérature dans (Vilcek, 2006)). IFN- α inhibe l'angiogenèse (revue de la littérature dans (Indraccolo)) en bloquant la production de cytokines pro-angiogéniques telles que *basic fibroblast growth factor* (b-FGF)(Singh et al., 1995), en réduisant la transcription des gènes d'IL-8 (Oliveira et al., 1992) et VEGF (von Marschall et al., 2003) par les cellules tumorales et en inhibant la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Indraccolo et al., 2007).

Enfin, IFN- α a un effet pro-apoptotique sur plusieurs types de cellules tumorales (Qu et al., ; Shigeno et al., 2003) qui est généralement retardé (48 heures) indiquant que cet effet implique l'activation d'un certain nombre de gènes ISG. Au moins une quinzaine d'ISG ont un effet pro-apoptotique (Bekisz et al., ; Chawla-Sarkar et al., 2003) parmi lesquels on trouve la caspase 4, la caspase 8, *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) et Fas/CD95.

Grâce à ses effets antitumoraux, l'IFN- α a montré son efficacité dans le traitement des leucémies à tricholeucocytes et les lymphomes T cutanés. Il est utilisé dans cette indication depuis une vingtaine d'années (Bracci et al., 2007). Une meilleure connaissance de ses effets biologique a permis sa renaissance avec des résultats prometteurs dans d'autres hémopathies, en particulier les leucémies myéloïdes chroniques, la maladie systémique à mastocytes et le syndrome d'hypercéosinophilie (revue de la littérature dans (Kiladjian et al.)).

Régulation de la synthèse d'IFN- α essentielle au contrôle des réponses immunes

IFN- α joue un rôle important dans l'immunosurveillance antitumorale et antivirale (Samuel, 2001; Trinchieri). Il est normalement présent à des taux bas dans le sang des sujets sains. Dans les pathologies auto-immunes telles que le lupus (Barrat et al., 2005) et le psoriasis (Nestle et al., 2005), on observe des taux sériques élevés de cette cytokine qui corrélerent avec la sévérité de la maladie (Barrat et al., 2005) et qui sont en rapport avec une activation chronique des pDC par les acides nucléiques du soi liés au peptide antimicrobien LL37 (Lande et al., 2007).

Au contraire lors de certaines infections virales chroniques, notamment par le HIV et le virus de l'hépatite B, on observe une déplétion des pDC circulantes (Duan et al., 2004; Soumelis et al., 2001) associée à une altération de leur capacité à produire de l'IFN- α en réponse aux TLR-L (Hirsch et al.) favorisant la progression de l'infection.

La production d'IFN- α est régulée par des récepteurs membranaires, principalement ILT-7 et BDCA2, afin d'empêcher une production aberrante de cette cytokine en réponse à différents stimuli (Cao et al., 2006; Dzionek et al., 2001). Un grand nombre de facteurs solubles sont également capables de réguler négativement la synthèse d'IFN- α par les pDC dont prostaglandine E2 (PGE2)(Fabricius et al.), le peptide vasoactif intestinal (Fabricius et al., 2006), l'histamine (Mazzoni et al., 2003), l'adénosine (Schnurr et al., 2004), l'oxyde nitrique (Morita et al., 2005), *high mobility group B1 protein* (HMGB1)(Popovic et al., 2006), *transforming growth factor- β* (TGF- β)(Bekeredjian-Ding et al., 2009; Contractor et al., 2007) et IL-10 (Duramad et al., 2003).

PDC et réponse immune adaptative : activation ou tolérance ?

De nombreuses études ont décrit le rôle des pDC dans la génération ou l'expansion de lymphocytes T régulateurs (Treg) et le maintien de la tolérance. La plupart des études suggèrent que les pDC non activées ou activées par une voie TLR-indépendante exerceraient des fonctions tolérogènes. Cependant, d'autres montrent que les pDC activées par des ligands de TLR sont également capables d'induire une tolérance. Ainsi, les propriétés tolérogènes des pDC seraient plutôt intrinsèques.

Les pDC humaines et murines fraîchement isolées expriment faiblement les molécules de costimulation CD80 et CD86 et ne sont donc pas capables d'induire une prolifération significative des lymphocytes T naïfs (Asselin-Paturel et al., 2001; Grouard et al., 1997; Krug et al., 2003). Il a été montré chez la souris qu'elles peuvent induire des réponses T suppressives (Bilsborough et al., 2003; Martin et al., 2002). Ainsi, les pDC non activées interviennent dans la tolérance périphérique en inhibant la réaction inflammatoire aux

allergènes inhalés (de Heer et al., 2004) et aux Ag alimentaires et environnementaux ingérés par voie orale (Goubier et al., 2008), favorisent la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (Fugier-Vivier et al., 2005), inhibent la réaction du greffon contre l'hôte (GVH)(Hadeiba et al., 2008), interviennent dans la tolérance des greffes d'organes en induisant des Treg (Ochando et al., 2006), favorisent le développement tumoral en inhibant les réponses T effectrices et en activant les Treg (Sharma et al., 2007; Watkins et al.) et préviennent le développement de pathologies auto-immunes dans un modèle murin d'encéphalomyélite auto-immune (EAE, modèle expérimental de sclérose en plaques) via l'expansion de Treg (Irla et al.).

Chez l'homme, les propriétés tolérogènes des pDC ont été démontrées dans les tumeurs. En effet, les pDC infiltrant les tumeurs induisent une faible prolifération de lymphocytes T naïfs dans le cancer de l'ovaire (Zou et al., 2001) et du poumon non à petites cellules (Perrot et al., 2007). De plus, les pDC activées par le ligand du CD40 induisent également la différenciation de lymphocytes CD8⁺ régulateurs ayant des fonctions suppressives (Gilliet and Liu, 2002).

D'autres études ont montré que les pDC activées par des ligands de TLR induisent la tolérance. En effet, Moseman et al ont montré que les pDC activées par des CpG-B induisent la génération de Treg CD4⁺ CD25⁺ *in vitro* (Moseman et al., 2004). Chez le rat, Ouabed et al ont montré que les pDC activées par des ligands de TLR favorisent la prolifération et l'activation de Treg (Ouabed et al., 2008).

Les mécanismes par lesquels les pDC induisent la tolérance ont été largement étudiés. Chez l'homme, les pDC expriment des taux élevés d'*inducible co-stimulator ligand* (ICOS-L)(Ito et al., 2007) qui favorise i) la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes T sécréteurs d'IL-10 et suppresseurs (Ito et al., 2007) et ii) la survie, l'expansion et la production d'IL-10 par les Treg (Ito et al., 2008; Janke et al., 2006). Il a également été montré que l'enzyme *indoleamine 2,3-dioxygenase* (IDO) pourrait jouer un rôle dans la tolérance médiée par les pDC. IDO est une enzyme intracellulaire qui catabolise la dégradation du tryptophane (Mellor and Munn, 2004). L'expression d'IDO est augmentée dans les pDC après activation par les ligands de TLR (Chen et al., 2008; Manches et al., 2008) et les pDC exprimant IDO induisent la différenciation de Treg (Boasso et al., 2007; Manches et al., 2008).

Ainsi, ces études montrent que les pDC seraient spécialisées dans l'induction (différenciation) et l'activation (prolifération/expansion) des Treg indépendamment de leur statut d'activation par des ligands de TLR ou non.

Comme les mDC, les pDC sont douées d'une grande plasticité et peuvent induire différents types de réponses T effectrices. Selon le signal d'activation reçu, elles peuvent induire une réponse cellulaire T de type *Th1* ou *Th2*. L'activation des pDC par la voie TLR7/TLR9 entraîne une réponse immune protectrice avec production de grandes quantités d'IFN de type I. Elles acquièrent une morphologie de cellule dendritique, augmentent l'expression à leur surface des molécules de CMH ainsi que les molécules de co-stimulation (CD80 et CD86), ce qui leur permet d'activer directement les lymphocytes T naïfs CD4⁺ (Grouard et al., 1997) qui vont produire IL-10 et IFN- γ (Siegal et al., 1999). Les pDC humaines peuvent également se transformer en DC en présence d'IL-3 ou IL-3 associée à CD40L (Grouard et al., 1997). Elles produisent de faibles quantités d'IFN- α mais augmentent l'expression de la molécule de co-stimulation OX40L, ce qui entraîne une réponse T de type *Th2* avec production des cytokines IL-4, IL-5 et IL-10 (Iwasaki and Medzhitov, 2004; Risoan et al., 1999).

De nombreuses études ont montré que les pDC sont capables de présenter de façon efficace les antigènes endogènes exprimés de façon constitutive (Krug et al., 2003) ou à partir de virus infectant les pDC (Fonteneau et al., 2003). Par contre, elles présentent peu d'antigènes exogènes. Enfin, deux études récentes ont montré que les pDC sont capables d'activer indirectement (*cross-prime*) les lymphocytes T CD8⁺ par des peptides d'origine virale (Di Pucchio et al., 2008; Hoeffel et al., 2007).

PDC et pathologies chez l'homme : rôle clé dans les infections virales, l'auto-immunité et le cancer

Infektions virales.

L'immunité antivirale est la fonction majeure des pDC chez l'homme. Elle a été étudiée de façon extensive dans l'infection par le VIH. Les pDC expriment à leur surface CD4, CXCR4 et CCR5, ce qui en fait une cible de choix pour le VIH qui y pénètre grâce à ces molécules comme dans les lymphocytes T (Penna et al., 2001). Chez l'homme, les pDC sont profondément déplétées chez les patients séropositifs à un stade avancé, et leur taux circulant corrèle avec celui des lymphocytes T CD4⁺ (Killian et al., 2006) et de façon inverse avec la virémie (Soumelis et al., 2001). Par contre, un traitement par trithérapie (HAART) permet de corriger le taux de pDC circulants parallèlement à une réduction de la virémie (Cao et al., 2006). Chez les patients VIH⁺, les pDC sont altérées pour la production d'IFN- α et l'activation de lymphocytes T allogéniques (MLR) (Donaghy et al., 2001). Enfin, l'activation chronique des pDC par le VIH intervient dans l'induction d'une activation chronique du

système immunitaire et son dysfonctionnement, aboutissant au stade SIDA (Mandl et al., 2008). Les pDC sont également altérées en nombre et en fonction (production d'IFN- α et MLR) dans les infections par les virus d'hépatite B et C (Duan et al., 2004; Yonkers et al., 2007).

Auto-immunité.

La présence de taux élevés circulants d'IFN- α chez les patients ayant une maladie auto-immune a permis de mettre en évidence le rôle clé des pDC dans la physiopathologie de ces maladies (Ronnlom and Alm, 2001), en particulier le lupus érythémateux systémique (SLE) et le psoriasis (revue de la littérature dans (Gilliet et al., 2008; Ronnlom et al., 2009)). Dans le psoriasis, les lésions cutanées précoces sont très infiltrées par les pDC, alors qu'elles sont déplétées dans le sang (Nestle et al., 2005). Le blocage de la production d'IFN- α par les pDC grâce à des anticorps anti-BDCA2 inhibe le développement de lésions cutanées dans un modèle murin de psoriasis (Nestle et al., 2005). Récemment, Gilliet et al ont identifié des complexes formés par l'ADN ou l'ARN autologue et un peptide antimicrobien cationique LL37 de la famille des cathélicidines, capables d'induire une production dérégulée d'IFN- α par les pDC via TLR9 et TLR7 respectivement (Ganguly et al., 2009; Stuart et al.).

Comme dans le psoriasis, on observe une accumulation de pDC activées dans les tissus lésés et une déplétion dans le sang chez les patients présentant un lupus (Farkas et al., 2001). Ces pDC sont activées par des complexes immuns formés par des anticorps anti-ADN et de l'ADN endogène qui pénètrent dans le compartiment endosomal des pDC grâce aux récepteurs Fc γ RII (Bave et al., 2003) et activent TLR7/TLR9 entraînant la production d'IFN- α (Barrat et al., 2005; Means et al., 2005). Un rôle majeur des neutrophiles a été récemment démontré dans ce processus. En effet, lors de leur mort par *netose* induite par une exposition à des anticorps anti-ribonucléoprotéines, les neutrophiles libèrent des complexes [ADN du soi-peptides (LL37 et HNP)-HMGB1] dans des filaments appelés Net capables d'activer directement la production d'IFN- α dans les pDC (Garcia-Romo et al., ; Lande et al.).

Ainsi, l'activation chronique des pDC par des ligands endogènes des TLR participe au maintien de l'inflammation dans le lupus et le psoriasis via une production dérégulée d'IFN- α .

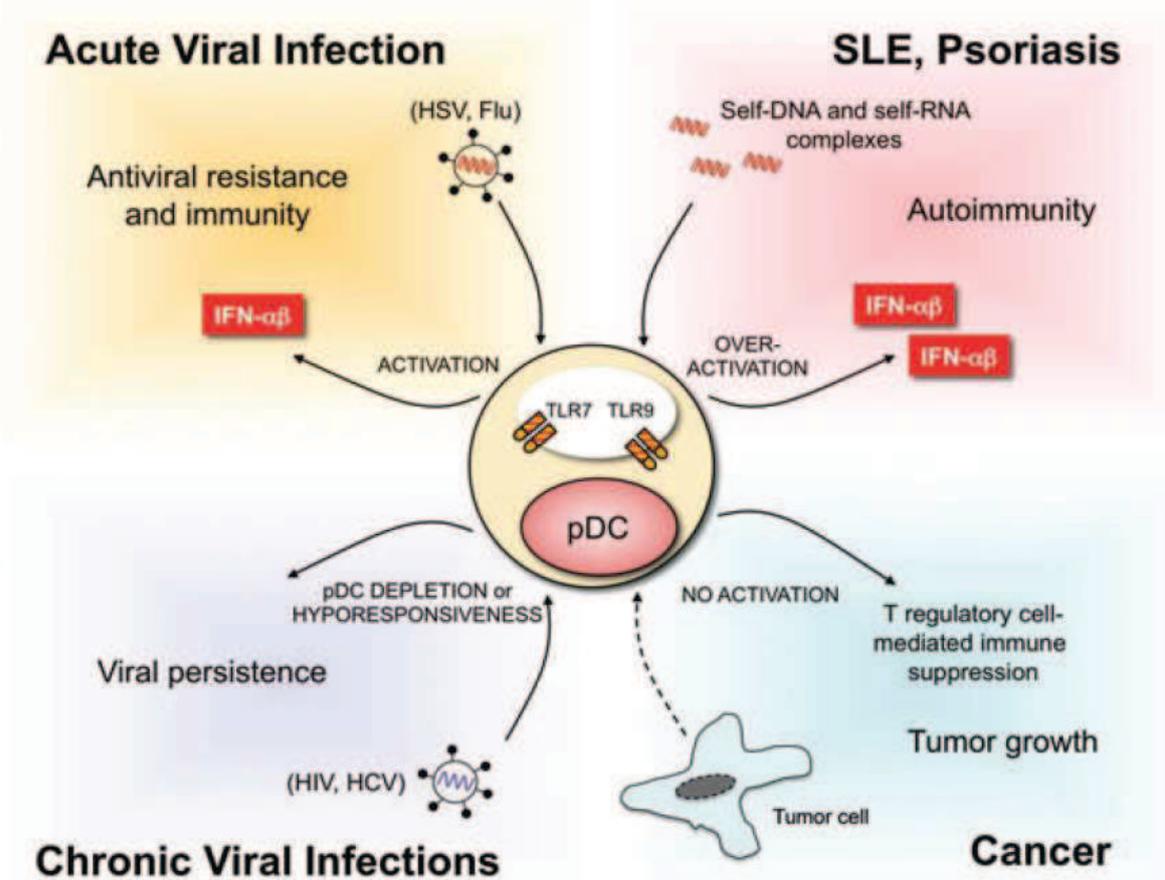


Figure 4 : Rôle des pDC dans les pathologies humaines. D'après (Lande and Gilliet).

Cancers.

Les pDC sont retrouvées dans de nombreux cancers solides : cancer de l'ovaire (Labidi-Galy et al., ; Zou et al., 2001), du sein (Treilleux et al., 2004), du pancréas (Tjomsland et al.), de la tête et du cou (Hartmann et al., 2003), du poumon (Perrot et al., 2007), de la prostate (Watkins et al.) et les cancers cutanés (Palamara et al., 2004; Stary et al., 2007; Urosevic et al., 2005; Vermi et al., 2003). Dans les tumeurs, les pDC sont présentes à un état non activé et sont associées au développement et à la maintenance d'un microenvironnement immunosuppresseur. Dans le cancer du sein, les pDC infiltrent seulement 13% des tumeurs mais leur présence est associée à une survie sans progression et une survie globale plus courte (Treilleux et al., 2004). Les pDC qui s'accumulent dans les ascites malignes des cancers de l'ovaire diagnostiqués à un stade avancé (III/IV) (Wei et al., 2005; Zou et al., 2001) induisent des lymphocytes T suppresseurs produisant de l'IL-10 (Wei et al., 2005; Zou et al., 2001). Par ailleurs, les pDC infiltrant les tumeurs (TipDC) ont une capacité allostimulatrice faible (Perrot et al., 2007; Watkins et al., ; Zou et al., 2001) et induisent l'anergie des lymphocytes T (Watkins et al.). L'expression du facteur de transcription FOXO3 contrôlerait les propriétés

tolérogènes des pDC dans le cancer de la prostate chez l'homme et la souris (Watkins et al.). Dans le mélanome, il a été montré que l'expression d'IDO dans les pDC des ganglions drainant les tumeurs provoque un arrêt de la prolifération des lymphocytes T effecteurs et leur mort cellulaire (Mellor and Munn, 2004; Muller et al., 2008) ainsi que l'activation constitutive de Treg (Sharma et al., 2007). Deux études ont également montré que les pDC associées aux tumeurs (TApDC) du poumon et de la tête et du cou sont inhibées pour leur production d'IFN- α (Hartmann et al., 2003; Perrot et al., 2007) en raison de la diminution de l'expression de TLR9 (Hartmann et al., 2003). Différents mécanismes seraient impliqués dans l'inhibition fonctionnelle des pDC dans les tumeurs. Des facteurs solubles comme TGF- β et PGE2 (Bekeredjian-Ding et al., 2009) et des facteurs cellulaires comme la molécule BST2, ligand naturel d'ILT7, exprimé par les cellules tumorales (Cao et al., 2009; Tsukamoto et al., 2009) seraient impliqués dans cette inhibition.

A l'inverse, les pDC présentes dans les ascites malignes de cancer de l'ovaire produisent davantage d'IFN- α que les pDC circulantes en réponse aux ligands de TLR9 *in vitro* (Zou et al., 2001) et l'expression de la protéine MxA dans les tumeurs de mélanome *in situ* atteste de la production locale d'IFN- α (Ζερμυ ετ αλ., 2003). Enfin, les pDC d'ascite favoriseraient l'angiogenèse tumorale dans le cancer de l'ovaire via la production d'IL-8 et de TNF- α (Curiel et al., 2004a) et la prolifération des cellules tumorales ainsi que la résistance à la chimiothérapie dans le myélome multiple (Chauhan et al., 2009).

Dans certaines tumeurs cutanées, les TApDC sont capables de produire des taux élevés d'IFN- α et reverser l'immunosuppression après traitement par des ligands de TLR. Ceci est particulièrement vrai pour le carcinome basocellulaire et le lymphome cutané à cellules T. L'application locale d'Imiquimod, un analogue synthétique de nucléoside ligand de TLR7, entraîne un afflux massif de pDC dans la peau, leur activation et la production de taux élevés d'IFN- α responsable d'une réaction inflammatoire et de la régression des tumeurs (Palamara et al., 2004; Stary et al., 2007; Urosevic et al., 2005). L'injection intratumorale de CpG-ODN entraîne la régression de carcinomes basocellulaires et des métastases cutanées de mélanome (Nguyen et al., 2002). Le rôle des pDC activées par des ligands de TLR9 dans l'immunité antitumorale a également été rapporté dans le contexte du mélanome chez la souris. En effet, une seule injection intratumorale de pDC préactivées par des CpG dans des tumeurs établies de mélanome induit une réponse antitumorale systémique caractérisée par l'activation séquentielle des cellules NK, des mDC et des lymphocytes T CD8⁺ (Liu et al., 2008).

III. Lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) constituent une sous-population de lymphocytes T (LT) CD4⁺ ayant une fonction suppressive. Chez les sujets sains, le rôle majeur des Treg est de maintenir une tolérance vis à vis des antigènes du soi et de contrôler l'activation et la prolifération des lymphocytes T effecteurs CD4⁺ et autoréactifs, prévenant la survenue de pathologies auto-immunes. Les Treg interviennent également dans la tolérance vis à vis des antigènes alimentaires, la tolérance materno-fœtale ainsi que les allergies, l'asthme, le rejet de greffe et l'immunité antitumorale.

Historique

Le concept de la suppression de la réponse immune par des lymphocytes a été introduit dans les années 1970 par Gershon et Kondo (Gershon and Kondo, 1970; Gershon and Kondo, 1971) puis abandonné faute de pouvoir caractériser précisément ces cellules. Les travaux menés dans le laboratoire d'EJ North au début des années 1980 ont montré que les lymphocytes T exprimant CD4 et CD25 (chaîne α du récepteur d'IL-2) inhibent le rejet de tumeurs chez la souris, suggérant l'existence d'une population de lymphocytes T supresseurs d'origine tumorale (Berendt and North, 1980; Bursucker and North, 1984). Après une décennie de scepticisme, les travaux de Sakaguchi publiés en 1995 ont permis de mettre en évidence une sous-population de lymphocytes T CD4⁺ exprimant avec une forte intensité la molécule CD25 et qui joue un rôle dans le contrôle des réactions auto-immunes de la souris (Sakaguchi et al., 1995). Par la suite d'autres études au sein du même laboratoire ainsi que celles de Rudensky et al ont montré que le facteur de transcription *forkhead box p3* (Foxp3) est à la fois un marqueur intracellulaire clé des lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺ et un facteur indispensable pour le développement thymique, le maintien du pool et la fonction suppressive de ces cellules (Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003; Uhlig et al., 2006). Foxp3 appartient à la famille des facteurs de transcription possédant un domaine *winged helix-forkhead* (Forkhead box) de liaison à l'ADN et il est situé sur le chromosome X. Il serait capable de moduler environ 700 à 1100 gènes dont seulement 6% d'entre eux par une interaction directe (Marson et al., 2007). Foxp3 fonctionne à la fois comme un activateur et un répresseur transcriptionnel, qui agit directement ou indirectement par interaction avec d'autres facteurs de transcription comme AML1/Runx1 ou NF-AT (Chi et al., 2006; Feng et al., 2009). Ainsi, Foxp3 réprime la transcription des gènes de CD127, IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α , IL-17 et IL-21 et augmente celle de CD25, GITR, CTLA-4, ou CD39 (Gavin et al., 2007; Hefler et al., 2006).

Son inactivation est responsable d'un syndrome lymphoprolifératif autoimmunitaire aussi bien chez l'homme que chez la souris appelé *Immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy-X-linked syndrom* (IPEX)(Bennett et al., 2001).

Foxp3 est le marqueur le plus spécifique des Treg chez l'homme à ce jour. Sa perte ou diminution d'expression au niveau des Treg entraîne l'acquisition de propriétés des lymphocytes T effecteurs telles que la production de cytokines favorisant la réponse immune (IL-2, IL4, IL-17 et IFN- γ)(Gao et al., 2007; Williams and Rudensky, 2007) d'où le rôle central de Foxp3 pour définir la lignée Treg.

Origine et migration

Le thymus est le lieu de différenciation des thymocytes en lymphocytes T. Les cellules sont sélectionnées négativement en fonction de leur affinité pour les Ag du soi, un des mécanismes évitant l'apparition de clones auto-réactifs délétères pour l'organisme. Les Treg peuvent être d'origine thymique appelés Treg naturels (nTreg) ou induits (iTreg) en périphérie par conversion de lymphocytes T conventionnels (Tconv) naïfs CD4⁺CD25⁻FoxP3⁻ en Treg FoxP3⁺ en présence de TGF- β (Chen and Wahl, 2003). Les Treg naturels peuvent être distingués des Treg induits sur la base de l'expression d'Helios, un membre de la famille des facteurs de transcription Ikaros (Thornton et al.). Leur profil d'expression génomique est différent avec certains modules de gènes absents des iTreg et présents chez les nTreg (revue de la littérature dans (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009)).

D'autres lymphocytes T suppresseurs n'exprimant pas FoxP3 ont été décrits. Les lymphocytes T régulateurs de type 1 (*Tr1*) dits suppresseurs se distinguent des lymphocytes T *Th1* et *Th2* par la production de fortes quantités d'IL-10, de TGF- β et de faibles quantités d'IFN- γ et peu ou pas d'IL-2 et d'IL-4 (Roncarolo et al., 2006). Les lymphocytes T *Th3* sont fortement impliqués dans les phénomènes de tolérance orale. L'administration d'Ag par voie orale permet le développement de ces lymphocytes T *Th3*, capables d'inhiber des réponses auto-immunes dans divers modèles expérimentaux (Faria and Weiner, 2005). Ces cellules secrètent beaucoup de TGF- β , peu d'IL-10 ou d'IL-4 et pas d'IFN- γ ni IL-2 (Carrier et al., 2007).

Des sous-populations de Treg ont été également identifiées au sein des lymphocytes T CD8⁺, en particulier des Treg CD8⁺ CD25⁺ qui utilisent *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4* (CTLA4) et TGF- β pour inhiber la prolifération et l'activation cellulaire (Cosmi et al., 2003), et une sous-population de lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ qui ciblent ILT3 et ILT4 exprimés par des cellules dendritiques (DC)(Chang et al., 2002).

Si les Treg ont été initialement identifiés dans les tissus lymphoïdes, de nombreuses études montrent qu'ils sont également présents au sein des tissus périphériques et s'accumulent dans les sites inflammatoires dans diverses pathologies infectieuses ou tumorales (Curiel et al., 2004b; Uhlig et al., 2006). Diverses molécules de migration entrent en jeu en fonction des tissus cibles (Huehn and Hamann, 2005). La L-sélectine (CD62-L) ou CCR7 assurent leur entrée dans les organes lymphoïdes *via* les veinules endothéliales post-capillaires, tandis que CCR4 et LFA-1 favorisent leur contact avec les CPA, et CXCR5 les guident vers les centres germinatifs.

Mécanismes de suppression des Treg : rôle clé de CTLA-4

Les Treg Foxp3⁺ exercent leur fonction suppressive par contact cellulaire direct en utilisant une modulation fonctionnelle grâce à différentes molécules telles que CD39, CD73, LAG-3 ou en tuant les CPA ou les lymphocytes T effecteurs par les granzymes A et B et la perforine (Sakaguchi et al., 2008). Les Treg peuvent également agir grâce à des molécules solubles en produisant des cytokines immunosuppressives telles que IL-10, TGF- β , IL-35 et galectine-1 ou en privant les LT effecteurs de cytokines indispensables à leur prolifération et leur survie (par exemple IL-2) (Gao et al., 2007; Shevach, 2009; Vignali et al., 2008).

Plusieurs découvertes récentes suggèrent que ce mécanisme serait lié à CTLA-4 (Wing and Sakaguchi). Tout d'abord, les nTreg Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ expriment de façon constitutive des taux élevés de CTLA-4 (Dalod et al., 2003; Hirsh et al.). Chez l'homme, les lymphocytes T bien différenciés Foxp3^{hi}CD25^{hi}CD4⁺ et très suppresseurs *in vitro* expriment de façon constitutive CTLA-4 (Miyara et al., 2009). L'administration d'anticorps bloquant anti-CTLA-4 entraîne des manifestations auto-immunes chez l'homme (Domschke et al., 2009). Par ailleurs Foxp3 en association avec d'autres facteurs de transcription augmentent l'expression de CTLA-4 en se liant au promoteur du gène *ctla4*, suggérant que Foxp3 pourrait participer au maintien d'une expression élevée de CTLA-4 dans les Treg (Marson et al., 2007; Wing et al., 2008; Zheng et al., 2007). Enfin, les souris déficientes en CTLA-4 meurent d'un syndrome associant une lympho-prolifération, des pathologies auto-immunes et une hyperproduction d'IgE (Waterhouse et al., 1995) similaire à celui qui survient chez les souris déficientes en Foxp3 (Wing et al., 2008). Les Treg naïfs isolés de ces souris ont une altération de leurs fonctions suppressives *in vitro* et *in vivo*. Cette immunosuppression dépendante de CTLA-4 serait liée à une modulation des fonctions des CPA.

Treg et pathologies chez l'homme : auto-immunité et cancer

Le rôle des Treg dans les pathologies auto-immunes est bien documenté. L'exemple type est le syndrome *IPEX* souvent létal et qui est caractérisé par une mutation inactivatrice du gène *Foxp3* responsable de l'absence de Treg chez les jeunes enfants de sexe masculin (Bennett et al., 2001). D'autres maladies auto-immunes sont associées à une perte de leur fonction suppressive tels le lupus érythémateux systémique (Alvarado-Sanchez et al., 2006) et l'encéphalomyélite auto-immune (Korn et al., 2007).

Les Treg jouent également un rôle dans la tolérance vis à vis des alloantigènes, en particulier lors des allogreffes de moelle osseuse et dans la tolérance materno-fœtale. Ainsi, les Treg préviennent la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD), pathologie particulièrement grave qu'on observe après allogreffe d'organes et qui se traduit par l'infiltration des différents tissus (peau, intestins, foie) par les leucocytes du donneur. Durant la GVH, les Treg migrent en même temps que les Tconv $CD4^+CD25^-$ dans les tissus cibles et inhibent leur activation et leur prolifération locale, prévenant la destruction et l'inflammation au sein de ces tissus (Hoffmann et al., 2002). Le taux de Treg circulants a également une valeur prédictive pour la survenue de GVH (Magenau et al.).

Les Treg favorisent la tolérance materno-fœtale. Ceci est illustré par des taux particulièrement élevés de Treg chez le fœtus (Mold et al., 2008). L'étude de Mold et al a montré que les cellules maternelles traversent le placenta, siègent dans les ganglions lymphoïdes du fœtus (révélées par un chimérisme HLA) et induisent le développement de Treg $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ qui inhibent l'immunité fœtale anti-maternelle et persistent dans le sang des enfants de bas âge (Mold et al., 2008).

Le rôle des Treg dans l'immunité antitumorale varie en fonction du type histologique et du siège des tumeurs. En 2001, June et al ont été les premiers à rapporter la présence de taux élevés de Treg infiltrant les carcinomes du poumon non à petites cellules (CPNPC) et les cancers de l'ovaire (Kirkwood, 2002). Depuis cette étude, les Treg ont été étudiés de façon extensive dans différents types de tumeurs et leur impact sur la survie varie en fonction de la localisation et du type histologique (revue de la littérature dans (Menetrier-Caux et al., 2009)). Ainsi la présence des Treg a un impact favorable sur l'évolution de certaines hémopathies malignes telles que le lymphome folliculaire (Carreras et al., 2006), le lymphome B à grandes cellules de type « centre germinatif B » (Tzankov et al., 2008) et la maladie de Hodgkin (Alvaro et al., 2005; Tzankov et al., 2008).

Dans les tumeurs solides, l'impact des Treg varie en fonction du siège de la tumeur. Ainsi, leur présence est corrélée à un bon pronostic dans les tumeurs ORL (Badoual et al., 2006) et

les cancers du colon (Salama et al., 2009) alors qu'ils ont un effet délétère dans les cancers du sein (Bates et al., 2006; Bohling and Allison, 2008; Gobert et al., 2009).

Le rôle joué par les Treg dans le microenvironnement tumoral varierait en fonction de la tumeur. Dans les tumeurs où ils sont délétères, ils bloqueraient la réponse immune spécifique en bloquant les lymphocytes T effecteurs (revue de la littérature dans (Zou, 2006)).

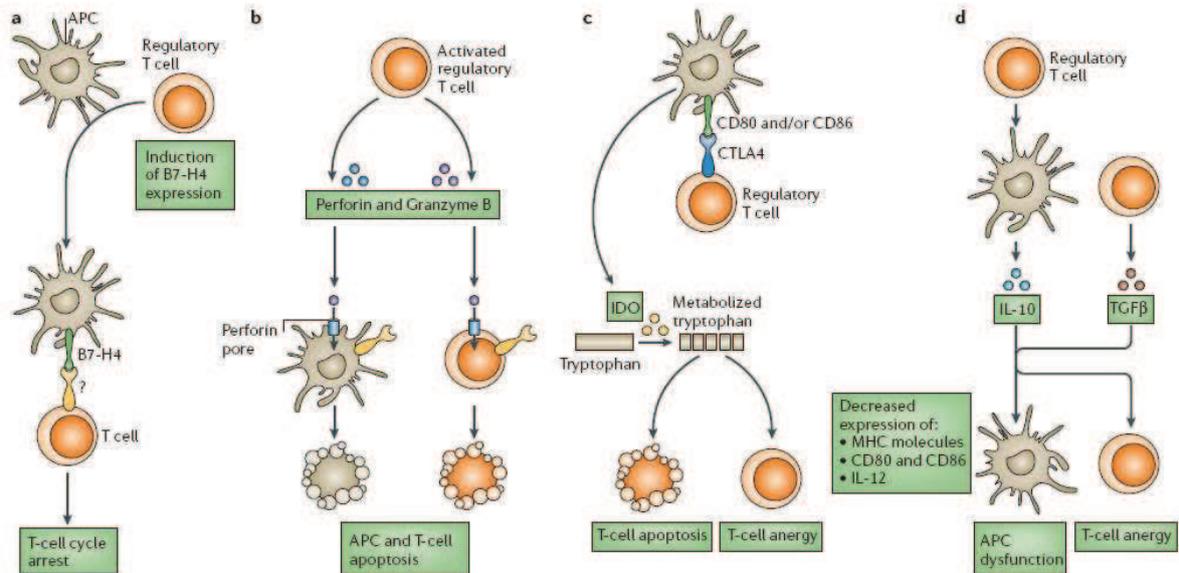


Figure 5 : Mécanismes d'immunosuppression des lymphocytes T régulateurs dans les tumeurs. D'après (Zou, 2006).

A noter que l'hypoxie (définie par un taux d'oxygène inférieur à 3%) présente dans le microenvironnement tumoral semble favoriser une tolérance vis-à-vis des tumeurs en inhibant la fonction effectrice des lymphocytes T et en favorisant les fonctions inhibitrices des Treg à travers *hypoxia-inducible factor-1α* (HIF-1α) (Lukashev et al., 2006; Thiel et al., 2007), (revue de la littérature dans (Sitkovsky et al., 2008)).

Au contraire, dans les tumeurs où leur présence est favorable, ils contribueraient au contrôle d'un environnement inflammatoire qui peut être délétère pour une réponse immune efficace.

Immunologie du cancer de l'ovaire : de la théorie à la thérapeutique

S.I. Labidi-Galy, J. Faget, I. Treilleux, C. Menetrier-Caux,
C. Caux, N. Bendriss-Vermare

Points forts

1. Le cancer de l'ovaire est immunogène et constitue un bon modèle pour étudier l'immunité antitumorale.
2. Un infiltrat tumoral par les lymphocytes T est associé à une plus longue survie.
3. La présence des lymphocytes T régulateurs et des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans les tumeurs est délétère.
4. Des taux élevés d'IL-6 et de VEGF dans le sang des patientes sont associés à une survie plus courte.
5. Différentes stratégies d'immunothérapies qui ciblent des antigènes tumoraux, des cytokines ou des cellules immunes sont en cours d'évaluation.

Introduction

De nombreuses observations réalisées aussi bien chez l'homme que chez l'animal ont apporté les preuves de l'existence d'une « immunosurveillance du cancer » qui correspond à la capacité du système immunitaire à reconnaître et à éliminer les nouvelles cellules tumorales en permanence [1]. Cependant, les cellules tumorales sont capables de subvertir la réaction immunitaire locale et de donner un avantage prolifératif à la tumeur. Elles peuvent altérer le fonctionnement du système immunitaire par différents mécanismes tels que la dissimulation dans des sanctuaires immuns, l'ignorance immune, la production de cytokines immunomodulatrices, la protection contre l'activité lytique des effecteurs immuns, l'inhibition de la maturation, des fonctions ou de la survie des cellules dendritiques (DC) [2]. L'interaction hôte-cancer peut entraîner ou non l'élimination de la tumeur. Ainsi est né le concept d'*immunoediting* des tumeurs qui correspond à un processus dynamique d'interactions entre la tumeur et le système immunitaire. Ce processus peut être divisé de façon arbitraire en trois

Immunologie du cancer de l'ovaire : de la théorie à la thérapeutique

S.I. Labidi-Galy, J. Faget, I. Treilleux, C. Menetrier-Caux,
C. Caux, N. Bendriss-Vermare

Points forts

1. Le cancer de l'ovaire est immunogène et constitue un bon modèle pour étudier l'immunité antitumorale.
2. Un infiltrat tumoral par les lymphocytes T est associé à une plus longue survie.
3. La présence des lymphocytes T régulateurs et des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans les tumeurs est délétère.
4. Des taux élevés d'IL-6 et de VEGF dans le sang des patientes sont associés à une survie plus courte.
5. Différentes stratégies d'immunothérapies qui ciblent des antigènes tumoraux, des cytokines ou des cellules immunes sont en cours d'évaluation.

Introduction

De nombreuses observations réalisées aussi bien chez l'homme que chez l'animal ont apporté les preuves de l'existence d'une « immunosurveillance du cancer » qui correspond à la capacité du système immunitaire à reconnaître et à éliminer les nouvelles cellules tumorales en permanence [1]. Cependant, les cellules tumorales sont capables de subvertir la réaction immunitaire locale et de donner un avantage prolifératif à la tumeur. Elles peuvent altérer le fonctionnement du système immunitaire par différents mécanismes tels que la dissimulation dans des sanctuaires immuns, l'ignorance immune, la production de cytokines immunomodulatrices, la protection contre l'activité lytique des effecteurs immuns, l'inhibition de la maturation, des fonctions ou de la survie des cellules dendritiques (DC) [2]. L'interaction hôte-cancer peut entraîner ou non l'élimination de la tumeur. Ainsi est né le concept d'*immunoediting* des tumeurs qui correspond à un processus dynamique d'interactions entre la tumeur et le système immunitaire. Ce processus peut être divisé de façon arbitraire en trois

phases : élimination, équilibre et échappement. Au stade précoce de carcinogénèse, la réponse immune est efficace, résultant en l'élimination de la tumeur. Cette phase est suivie par une longue période d'équilibre lors de laquelle le système immunitaire exerce une pression de sélection sur les cellules tumorales génétiquement instables et douées d'une forte capacité de mutation conduisant à l'émergence de nouveaux variants tumoraux non reconnus ou ignorés par le système immunitaire. Le cancer n'est donc pas éliminé mais n'est pas détectable cliniquement. Le cancer se manifeste cliniquement quand il échappe à une réponse immunitaire efficace. Ce concept suggère que le système immunitaire non seulement protège l'hôte contre le développement de cancers mais peut sculpter de façon dynamique l'immunogénicité des tumeurs [1]. L'immunogénicité correspond à la capacité des antigènes à induire une réponse immune. Certaines tumeurs malignes peuvent être immunogènes par l'expression de certains antigènes associés à l'oncogénèse. Dans ce contexte, le cancer de l'ovaire, qui est particulièrement immunogène, a été largement utilisé comme modèle pour étudier l'immunité antitumorale [3-5].

Immunosurveillance et cancer de l'ovaire

Le microenvironnement tumoral correspond à un ensemble hétérogène de cellules tumorales, de fibroblastes du stroma, de cellules endothéliales et de leucocytes tels que les macrophages, les lymphocytes T et les cellules dendritiques. Une grande variété de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance sont libérés dans l'environnement tumoral par ces cellules, responsables de la progression tumorale, de la dissémination ou au contraire de l'induction d'une réponse antitumorale efficace conduisant au rejet de la tumeur. Nous allons détailler les principales dérégulations du système immunitaire rapportées dans le cancer de l'ovaire qui participent à la progression tumorale.

Corrélation entre lymphocytes T effecteurs et pronostic

L'étude majeure traitant du rôle des lymphocytes T CD3⁺ dans l'immunosurveillance dans le cancer de l'ovaire a été publiée en 2003 dans le *New England Journal of Medicine*. Zhang *et al.* ont analysé en immunohistochimie (IHC) la distribution des lymphocytes T intratumoraux (TIL) dans 186 tumeurs congelées prélevées sur des patientes présentant un cancer de l'ovaire à un stade avancé (III/IV) [3]. Les TIL CD3⁺ ont été détectés dans les îlots cellulaires intratumoraux dans 102 des 186 tumeurs (54,8 %), alors qu'ils étaient absents

dans 72 tumeurs (38,7 %). Cette étude a montré que la présence de TIL était associée de façon significative à une meilleure survie des patientes. En effet, les patientes dont les tumeurs étaient infiltrées par les TIL avaient un taux de survie globale (SG) à 5 ans estimée à 38 %, alors que celles qui n'étaient pas infiltrées avaient un taux de survie de seulement 4,5 %. Les auteurs ont également quantifié les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans 30 tumeurs et ont montré une corrélation positive ($R^2 = 0,66$; $p < 0,001$) entre les deux sous-populations de lymphocytes T. En analyse multivariée de la SG, la présence de TIL et l'absence de résidu tumoral étaient les deux facteurs pronostiques indépendants associés à une meilleure survie ($p < 0,001$).

Les auteurs de cette étude ont également observé une augmentation de l'expression des ARN messagers de l'interféron- γ (IFN- γ) et de l'interleukine-2 (IL-2) dans les tumeurs infiltrées par les TIL. Or, ces deux cytokines sont produites principalement par les lymphocytes T, suggérant que ces cellules étaient fonctionnellement actives. Deux autres études publiées par la suite ont confirmé ces résultats et ont montré une corrélation positive entre les TIL et la réponse clinique à la première ligne de chimiothérapie ainsi que l'évolution favorable de la maladie [6, 7].

Récemment, Sato *et al.* ont montré sur une série de 117 patientes que celles dont les tumeurs étaient hautement infiltrées par les lymphocytes T CD8⁺ avaient une survie plus longue (médiane = 55 vs 26 mois ; $p = 0,0003$) [5]. Le sous-groupe de patientes ayant un ratio CD8⁺/CD4⁺ élevé avait une survie particulièrement longue, estimée à 74 mois (HR = 0,3 ; $p = 0,0001$). L'impact positif des lymphocytes T CD8⁺ a été confirmé dans deux larges séries indépendantes [8, 9].

D'autres équipes se sont intéressées aux lymphocytes T non pas dans la tumeur, mais dans le sang et l'ascite des patientes [10, 11]. Bamias *et al.* [11] ont ainsi montré une accumulation de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ activés ainsi que de lymphocytes T CD3⁺ CD56⁺, potentiellement des cellules de type NKT dotées d'une activité cytotoxique importante, dans les ascites par rapport au sang des patientes. Enfin, deux études se sont intéressées à une sous-population récemment identifiée de lymphocytes T CD4⁺ effecteurs, *T-helper 17 (Th17)* [12, 13] qui se caractérisent par la production spécifique d'IL-17. Ces cellules sont essentiellement de phénotype CD4⁺ et produisent des cytokines de type effecteur (IL-2, TNF- α et IFN- γ). Des taux élevés d'IL-17 dans les ascites sont associés à une survie plus longue suggérant un rôle protecteur des *Th17* dans l'immunité antitumorale, ce qui favoriserait une réponse de type cytotoxique *via* les lymphocytes T CD8⁺.

Mécanismes d'immunosuppression

Lymphocytes T régulateurs (Treg)

Les Treg constituent une sous-population de lymphocytes T CD4⁺CD25^{high} Foxp3⁺ qui représente 2 à 5 % des lymphocytes T CD4⁺ du sang chez les sujets sains [14]. Ils jouent un rôle majeur dans le maintien de la tolérance immunitaire et l'homéostasie des lymphocytes T périphériques (i) en bloquant les fonctions et la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ auto-réactifs et (ii) en exerçant un effet immunosuppresseur sur les DC et les macrophages en modulant leur sécrétion de cytokines et l'expression des molécules de costimulation. Les Treg sont des cellules fortement anergiques dont la prolifération *in vitro* est dépendante de l'IL-2 exogène même en présence des signaux activateurs provenant du *T Cell Receptor* (TCR) et des molécules de costimulation. Ils inhibent *in vivo* et *in vitro* la prolifération des lymphocytes T naïfs et mémoires par contact cellulaire direct, *via* la séquestration et le blocage des sécrétions d'IL-2 produite par les lymphocytes T effecteurs ou par l'intermédiaire des cytokines qu'ils produisent, en particulier IL-10 et TGF- β [15]. Les Treg participent également à la régulation négative de la réponse immunitaire antitumorale et constituent un élément important du microenvironnement néoplasique. La présence de Treg en nombre important dans les tumeurs ou dans le sang périphérique de patients a été fréquemment corrélée à un pronostic péjoratif dans de nombreux types de cancers [4, 16].

Les Treg ont été largement étudiés dans le cancer de l'ovaire. Curiel *et al.* ont montré que l'infiltration tumorale par les Treg était associée à un pronostic sombre des patientes ayant un cancer de l'ovaire avec une survie plus courte et un risque de décès plus élevé [4]. Ainsi, les Treg s'accumulent dans les ascites malignes représentant 10 à 17 % des lymphocytes T. Ces cellules expriment le phénotype « classique » des Treg CD4⁺CD25⁺CD3⁺GITR⁺CTLA4⁺CCR7⁺Foxp3^{high}, inhibent la prolifération des lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ effecteurs ainsi que leur production d'IFN- γ et d'IL-2 *in vitro*. Les Treg s'accumulent préférentiellement dans les tumeurs où ils représentent 10 à 25 % des lymphocytes T CD4⁺ infiltrants par rapport aux ganglions lymphoïdes qui les drainent *via* un mécanisme impliquant le couple CCL22/CCR4 et une capacité à proliférer *in situ*. En utilisant une méthodologie différente, Wolf *et al.* ont confirmé l'effet délétère des Treg dans cette pathologie [17]. Enfin, deux études ont montré qu'un ratio CD8⁺/Treg élevé parmi les TIL avait un impact positif sur la survie [5, 18].

Une des hypothèses pour expliquer le rôle péjoratif des Treg est qu'ils favorisent la tolérance vis-à-vis des antigènes associés aux tumeurs (TAA) qui sont des antigènes du soi tels que HER-2, et bloquent donc l'induction d'une réponse immunitaire antitumorale efficace. Il a également été montré que les Treg bloquent le développement des Th17.

Cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) hautement spécialisées qui intègrent une variété de signaux et initient et orchestrent la réponse immune. Il existe deux principales classes de DC humaines dans le sang : les DC myéloïdes (mDC) et plasmacytoïdes (pDC). Les mDC expriment les Ag CD4, CD11c et le récepteur du *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF). Elles produisent principalement de l'IL-12 en réponse aux ligands des récepteurs Toll (*Toll-like receptor*, TLR). Au contraire, les pDC n'expriment pas CD11c ni les marqueurs de la lignée myéloïde mais sont CD4⁺CD123⁺ (récepteur de l'IL-3) BDCA2⁺. La principale caractéristique des pDC est la production d'interféron- α (IFN- α) en réponse aux ligands de TLR 7 et 9 [19, 20]. En situation inflammatoire, les mDC migrent vers les tissus pour capturer les pathogènes invasifs avant de rejoindre les ganglions lymphatiques où elles vont activer les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ naïfs (*priming*) en leur présentant respectivement les Ag associés à des molécules du CMH de classes II et I. Les pDC sont majoritairement présentes autour des veinules dans les zones T des ganglions lymphatiques qu'elles rejoignent directement du sang, y compris à l'homéostasie. Le recrutement des pDC dans les sites inflammés peut contribuer à entretenir une réponse inflammatoire par la libération de cytokines et de chimiokines ainsi que l'induction de tolérance [21, 22].

Le rôle des pDC dans l'immunité antitumorale a été principalement étudié dans le cancer de l'ovaire en raison de leur accumulation dans les ascites malignes représentant en moyenne 0,71 % des cellules mononucléées (MNC) alors qu'elles sont déplétées du sang des patientes [22]. Ces pDC migrent vers les ascites grâce au *stromal-derived factor 1* (SDF-1), produisent de grandes quantités d'IFN- α en réponse aux ligands de TLR et induisent la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ naïfs allogéniques. Les pDC d'ascites néoplasiques sont également capables d'induire le développement de lymphocytes T CD8⁺ régulateurs [23]. Enfin, les pDC d'ascite induisent une angiogenèse *in vivo* grâce à la production de *tumor necrosis factor α* (TNF- α) et d'IL-8 [24].

Toutes ces études ont pris comme modèle les pDC d'ascite, en considérant que l'ascite étant au contact avec la carcinose, elle est un bon reflet du microenvironnement tumoral. Nous avons récemment étudié des tumeurs de l'ovaire et avons montré qu'elles peuvent être également infiltrées par des pDC mais à des proportions moindres que les ascites [25]. Ces pDC associées aux tumeurs (TApDC) présentent un phénotype plus activé que les pDC d'ascites. De plus, elles pourraient participer à l'immunosuppression en raison de : (i) l'inhibition de leur fonction innée principale, c'est-à-dire la production IFN- α en réponse aux TLR ligands ; (ii) leur capacité à polariser la réponse des lymphocytes T CD4⁺ naïfs allogéniques vers une forte production d'IL-10 et à induire la prolifération de Treg allogéniques *in vitro*. Nous avons également observé

que l'accumulation des pDC dans les tumeurs, et non dans les ascites, était un facteur indépendant de mauvais pronostic associé à une survie sans progression plus courte [25]. Ces observations suggèrent que les pDC présentes dans le microenvironnement tumoral induisent une tolérance vis-à-vis de la tumeur, favorisant sa progression.

L'analyse de l'évolution des taux de pDC dans le sang des patientes atteintes de cancer de l'ovaire a permis de montrer que la profonde déplétion de ces cellules chez les patientes au diagnostic était partiellement restaurée sous chimiothérapie et après mise en rémission complète. Ces observations suggèrent un retentissement systémique de la masse tumorale sur le système immunitaire, qui est partiellement corrigé lorsque la maladie est contrôlée avec la chimiothérapie.

Une des hypothèses pour expliquer le rôle délétère des pDC est qu'elles sont activement recrutées dans les tumeurs *via* des chimiokines sécrétées par les cellules tumorales et que, une fois sur place, elles favorisent la prolifération et l'activation des Treg intratumoraux contribuant ainsi à la tolérance vis-à-vis de la tumeur. Nous avons récemment confirmé cette hypothèse (données non publiées) à la fois dans le cancer de l'ovaire et le cancer du sein [26].

Macrophages

Les macrophages sont issus des monocytes du sang qui se différencient en macrophages après migration dans les tissus. Le phénotype de ces macrophages matures, bien différenciés, peut varier en fonction des tissus où ils résident : les cellules microgliales dans le cerveau, les cellules de Kupffer dans le foie. Ces différentes cellules ont cependant des fonctions communes telles que la capacité de défense contre les infections microbiennes, la régulation de la multiplication cellulaire normale, le remodelage tissulaire et la réparation des sites de blessure.

Classiquement, les macrophages sont activés par des produits microbiens ainsi que par l'IFN- γ . Par analogie à la dichotomie Th1/Th2 définissant deux types de réponse des lymphocytes T, on retrouve des macrophages de type I (M1) et II (M2). Les macrophages M1 sont de puissants effecteurs cellulaires qui tuent les micro-organismes et les cellules tumorales et produisent des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12 et TNF- α , IL-1, CXCL10 et CXCL11. Au contraire, les macrophages M2 sont subdivisés en trois sous-catégories M2a, M2b et M2c qui interviennent respectivement dans la réponse immune adaptative lors de l'inflammation (réaction antiparasitaire) (M2a), la régulation de la réponse Th2 et l'immunosuppression (M2b), l'angiogenèse ainsi que la réparation tissulaire (M2c). De façon générale, les macrophages M2 produisent de l'IL-10, de l'IL-6, CCL17, CCL18, CCL22 et l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1RA).

Les macrophages sont des constituants majeurs de l'infiltrat inflammatoire observé dans les tumeurs primaires et secondaires, où ils expriment un phénotype distinct et sont dénommés macrophages associés aux tumeurs (TAM). Il s'agit de macrophages M2 très proches fonctionnellement de la sous catégorie M2c. Les TAM sont présents dans les tumeurs de l'initiation jusqu'aux stades avancés et métastatiques.

Les caractéristiques fonctionnelles des TAM précédemment décrites ainsi que leur expression de la molécule de co-stimulation B7-H4, protéine récemment identifiée de la famille B7, sont un facteur de mauvais pronostic chez les patientes ayant un cancer de l'ovaire [27], en lien étroit avec la présence d'IL-10 et d'IL-6 dans le microenvironnement tumoral. La présence de TAM exprimant B7-H4 est associée à une infiltration par les Treg [28].

Cytokines et cancer de l'ovaire

Les cytokines sont des protéines produites par différentes cellules et interviennent dans le dialogue intercellulaire. Dans le microenvironnement tumoral, les cytokines sont le plus souvent produites par les leucocytes, en particulier les monocytes-macrophages et les lymphocytes infiltrant les tumeurs. Cependant, des études sur des lignées cellulaires de cancer de l'ovaire et les biopsies fraîches ont montré que les cellules tumorales participent, à une moindre mesure, à la production de ces cytokines.

L'interleukine-6 (IL-6) est une cytokine pro-inflammatoire et intervient dans les réponses immunes de type Th2. Elle a été largement étudiée chez les patients porteurs de cancer. Elle a été décrite initialement comme une cytokine produite par les lymphocytes T et qui induit la différenciation des lymphocytes B normaux en plasmocytes producteurs d'immunoglobulines. L'IL-6 produite par les cellules tumorales et les macrophages du microenvironnement tumoral peut bloquer la différenciation de progéniteurs CD34⁺ en DC au profit de la génération de macrophages [16]. Par ailleurs, des études aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* ont montré que l'IL-6 stimule de façon autocrine et paracrine la prolifération des cellules tumorales ovariennes [29].

La présence, chez les patientes porteuses d'une tumeur ovarienne, de taux sériques élevés d'IL-6 est un facteur pronostique indépendant associé à une survie plus courte [30]. L'IL-6 est également un puissant stimulateur de la mégacaryocytopoïèse. Des taux élevés d'IL-6 dans les ascites de tumeurs ovariennes ont été corrélés à une thrombocytose [31], elle-même associée à un pronostic plus sombre [32]. Enfin, une analyse du polymorphisme du promoteur de l'IL-6 a montré que le génotype 174 GG était associé à une meilleure survie sans qu'il n'y ait de corrélation entre les génotypes étudiés et les taux sériques d'IL-6 [33].

Le TGF- β est une cytokine pléiotrope qui possède des propriétés immunorégulatrices et antiprolifératives. Elle joue un rôle important dans la régulation de l'activation, la prolifération et la fonctionnalité des lymphocytes T et des DC. Elle est produite par les lymphocytes T naïfs, les Treg, les cellules mésenchymateuses, les plaquettes mais également certaines lignées tumorales. Le TGF- β inhibe la maturation, la migration et la fonctionnalité des mDC et des pDC. Il est également responsable d'une réduction de l'expression par les DC des molécules de CMH et des molécules de costimulation.

Dans le contexte du cancer de l'ovaire, le TGF- β sécrété par les cellules tumorales est capable de convertir *in vitro* des lymphocytes T effecteurs en Treg. Il favorise également l'angiogenèse *in vivo* qui est bloquée par des anticorps anti-TGF- β et il augmente le potentiel invasif des cellules tumorales en augmentant l'activité des métalloprotéinases [34].

D'autres cytokines associées à l'immunité cellulaire ont été corrélées à l'évolution du cancer de l'ovaire. Des taux élevés d'IFN- γ [35, 36] et d'IL-18 [37] sont associés à un meilleur pronostic. Ces cytokines interviennent dans la réponse cellulaire T de type Th1. En effet, l'IFN- γ exerce à la fois un effet stimulateur sur les lymphocytes T effecteurs et un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules tumorales de l'ovaire [38]. Ces observations concordent avec l'impact favorable de la présence des lymphocytes T IFN- γ en intratumoral rapporté dans le carcinome ovarien [3].

Les observations concernant l'effet d'IL-12, une autre cytokine de type Th1 principalement produite par les mDC, sont contradictoires selon l'origine des prélèvements et les techniques utilisées. Ainsi la détection de l'ARNm de la sous-unité IL-12p40 dans des échantillons de tumeurs est associée à un bon pronostic [36]. En revanche, des taux élevés de cette protéine dans les ascites sont associés à une survie plus courte [39] alors que les taux sériques élevés n'ont aucun impact [40]. Mais ces trois études manquent de puissance statistique avec une quarantaine de prélèvements dans chacune d'elles, ce qui ne permet pas de conclure. Enfin, les taux sériques de la sous-unité d'IL-12p70 sont trop faibles pour être exploitables [41].

Le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) est une cytokine multifonctionnelle ayant une action mitogène sur les cellules endothéliales *in vitro* et un effet pro-angiogénique *in vivo*. Il est produit par la plupart des cellules tumorales. Le VEGF joue un rôle majeur dans l'échappement tumoral au système immunitaire. Il se lie au récepteur VEGFR1/FLT1 situé sur les progéniteurs CD34⁺ de la moelle osseuse, réduisant la capacité de ces cellules à se différencier en DC fonctionnelles, ce qui entraîne une réduction du nombre et la maturation des DC intratumorales. Par ailleurs, le blocage du VEGF combiné à des approches d'immunothérapie antitumorale augmente le ratio Teffecteurs/Treg dans le microenvironnement tumoral révélant ainsi un nouveau mécanisme d'immunosuppression médié par le VEGF [42].

Le VEGF a été détecté à la fois sur des prélèvements de tumeurs, d'ascites et de sérums de patientes traitées pour un cancer de l'ovaire. Une analyse combinée

des données à partir de 314 patientes incluses dans cinq études montre que des taux sériques élevés de VEGF sont un facteur pronostique indépendant associé à une survie plus courte [43]. De même, des taux élevés de VEGF dans les ascites sont associés à une faible sensibilité aux sels de platine et une survie sans progression plus courte [44].

L'interleukine-7 (IL-7) joue un rôle essentiel dans le développement et la survie des lymphocytes B et T chez la souris et l'homme. Elle favorise leur prolifération et les protège de la mort cellulaire, en partie par induction du gène anti-apoptotique Bcl-2. Seulement 3 % des tumeurs de l'ovaire expriment cette cytokine [45] alors que des taux élevés de cette cytokine sont retrouvés chez la majorité des patientes et sont associés à une survie plus courte [41]. Cette observation suggère qu'IL-7 est produite par les cellules immunes de l'hôte en réponse à la prolifération tumorale.

Au total, de nombreuses études se sont intéressées aux cytokines dans le cancer de l'ovaire. Cependant, la majorité des études citées ci-dessus sont limitées par leur caractère rétrospectif et le nombre de patientes incluses, réduisant leur puissance statistique. Il ressort de ces travaux qu'un état inflammatoire important, défini par des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-6 et VEGF est délétère pour l'évolution des patientes.

Lymphopénie et cancer de l'ovaire

La lymphopénie a été décrite dans de nombreux types de tumeurs à la fois solides et hématologiques. Elle est notamment associée à un risque plus élevé de toxicité liée à la chimiothérapie, de neutropénie fébrile [46] et de décès précoce [47]. Deux études récemment publiées ont analysé l'impact de la lymphopénie sur la survie des patientes dans le contexte de cancer de l'ovaire. La première a porté sur une étude rétrospective de 136 patientes avec un suivi médian de 31 mois. Un ratio lymphocytes/leucocytes bas était un facteur pronostique indépendant associé à un risque plus élevé de mortalité [48]. La deuxième étude a inclus 192 patientes dont une majorité de stades avancés (III/IV) [49] avec un suivi médian de 20 mois. Les auteurs ont observé un taux moyen de lymphocytes plus bas dans les stades III/IV ($1\,364/\text{mm}^3$) que les stades I/II ($1\,646/\text{mm}^3$). En prenant comme valeur seuil le taux moyen de lymphocytes ($1\,440/\text{mm}^3$), les patientes ayant un taux bas avaient une survie plus courte.

Nous avons mené une étude rétrospective (article soumis) sur une série de 136 patientes traitées au centre Léon Bérard entre 1993 et 2009 pour un cancer de l'ovaire. Nous avons également observé un taux médian de lymphocytes significativement plus bas dans les stades avancés par rapport aux stades localisés ($p = 0,04$). En choisissant comme seuil $1\,000/\text{mm}^3$ qui correspond à une valeur précédemment validée dans une étude multicentrique et incluant 600 patients ayant des carcinomes, des sarcomes et des lymphomes [47], la lymphopénie qui

est retrouvée chez 13 % des patientes apparaît comme un facteur pronostique indépendant associé à une survie plus courte en analyse multivariée. Une des hypothèses pour expliquer la survenue de lymphopénie est une hyperactivation du système immunitaire par la tumeur. Cette hyperactivation se manifeste par une augmentation des lymphocytes T mémoire et activés, une augmentation des cytokines pro-inflammatoires et une augmentation de la prolifération des lymphocytes circulants. Nos résultats préliminaires retrouvent une augmentation des lymphocytes T activés et mémoire chez les patientes lymphopéniques.

Perspectives d'immunothérapies

Plusieurs stratégies d'immunothérapies sont actuellement évaluées chez les patientes traitées pour un cancer de l'ovaire. Des anticorps monoclonaux dirigés contre différents antigènes tumoraux tels qu'EpCAM (catumaxomab), CA-125 (oregovomab) et MUC1 (HMGF1) sont évalués avec une administration systémique ou intrapéritonéale. Catumaxomab vient d'obtenir l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement palliatif des ascites néoplasiques. Des essais de vaccination par des peptides dérivés d'antigènes tumoraux tels que HER-2 et NY-ESO-1 sont également en cours [50]. Une troisième stratégie d'immunothérapie est l'administration de cytokines exogènes afin de potentialiser l'induction et l'amplification d'une réponse immune appropriée. Un essai de phase II récemment publié par l'équipe du M.D. Anderson a évalué l'intérêt d'associer le GM-CSF, l'IFN- γ 1b et le carboplatine chez 54 patientes traitées pour un cancer de l'ovaire sensible aux platines et en rechute [51]. Les auteurs de cette étude ont rapporté un taux de réponse intéressant estimé à 56 % et une survie sans progression médiane estimée à six mois.

Le blocage de certaines cytokines est une autre stratégie d'immunothérapie dans le cancer de l'ovaire qui montre un succès clinique manifeste. Ainsi, le bevacizumab, un anticorps monoclonal anti-VEGF, a été évalué en association avec le carboplatine et le Taxol® dans deux grands essais cliniques de phase III et a montré un gain significatif de survie sans progression. Par ailleurs, un anticorps monoclonal chimérique anti-IL-6 (CNTO 328) est en cours d'étude de phase I/II dans cette pathologie [52].

La vaccination avec des cellules dendritiques (DC) qui sont les principales CPA et jouent donc un rôle majeur dans le contrôle des réponses immunes est également en développement clinique. Brossart *et al.* ont traité des patientes ayant un cancer de l'ovaire/sein par des DC pulsées avec des peptides dérivés des antigènes HER-2 et MUC1 [53]. Chez cinq des dix patientes, des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques des peptides ont pu être générés.

Enfin une nouvelle piste en cours d'exploration est la réversion de l'état d'immunosuppression induit par la tumeur. Dans cette perspective, des études précliniques chez la souris ont évalué l'intérêt de bloquer des cellules

immunosuppressives telles que les Treg [54] ou les cellules dendritiques [55]. Partant du constat de l'effet délétère des Treg, la déplétion de Treg chez des souris porteuses de tumeurs améliore la réponse immune spécifique de TAA et l'efficacité des immunothérapies associées en réduisant la taille tumorale [56]. Chez l'homme, la déplétion des Treg par l'administration d'un anticorps monoclonal anti-CTLA4 chez des patientes ayant un cancer de l'ovaire associée à une vaccination par des cellules tumorales autologues irradiées induit une nécrose tumorale importante [54]. Ces expériences ouvrent la voie à de nouveaux traitements d'immunothérapies antitumorales où l'on ciblerait les cellules immunes et non pas les cellules tumorales [57].

Conclusion

Le cancer de l'ovaire offre une opportunité avantageuse pour ceux qui étudient l'immunité antitumorale et l'immunothérapie, grâce à l'accès à de larges échantillons de tumeurs et d'ascites qui sont infiltrées par les cellules immunes, avec une possibilité de prélèvements tumoraux répétés chez les patientes sous chimiothérapie lors de la chirurgie d'intervalles.

Malgré la présence de TIL activés dans les tumeurs reflétant l'activation du système immunitaire chez les patientes, les cellules tumorales ovariennes développent différents mécanismes pour échapper à l'attaque du système immunitaire. En particulier, l'attraction intratumorale des Treg et des pDC induit une immunosuppression qui favorise la progression de la maladie. Le développement d'immunothérapies ciblées, qui bloque à la fois la migration des Treg en utilisant par exemple un anticorps anti-CTLA4 tel que l'ipilimumab [58] et stimule les pDC grâce aux TLR ligands, ouvrirait une nouvelle ère dans le traitement de cette maladie au pronostic redoutable.

Références

1. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G (2006) Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 6: 715-27
2. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ (2011) Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331: 1565-70
3. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, *et al.* (2003) Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348: 203-13
4. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, *et al.* (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10: 942-9
5. Sato E, Olson SH, Ahn J, *et al.* (2005) Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18538-43

6. Raspollini MR, Castiglione F, Rossi Degl'Innocenti D, *et al.* (2005) Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymphocytes are correlated with a brief disease-free interval in advanced ovarian serous carcinoma. *Ann Oncol* 16: 590-6
7. Tomsova M, Melichar B, Sedlakova I, Steiner I (2008) Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 108: 415-20
8. Barnett JC, Bean SM, Whitaker RS, *et al.* (2010) Ovarian cancer tumor infiltrating T-regulatory (T(reg)) cells are associated with a metastatic phenotype. *Gynecol Oncol* 116: 556-62
9. Clarke B, Tinker AV, Lee CH, *et al.* (2009) Intraepithelial T cells and prognosis in ovarian carcinoma: novel associations with stage, tumor type, and BRCA1 loss. *Mod Pathol* 22: 393-402
10. Giuntoli RL, 2nd, Webb TJ, Zoso A, *et al.* (2009) Ovarian cancer-associated ascites demonstrates altered immune environment: implications for antitumor immunity. *Anticancer Res* 29: 2875-84
11. Bamias A, Tsiatas ML, Kafantari E, *et al.* (2007) Significant differences of lymphocytes isolated from ascites of patients with ovarian cancer compared to blood and tumor lymphocytes. Association of CD3+CD56+ cells with platinum resistance. *Gynecol Oncol* 106: 75-81
12. Miyahara Y, Odunsi K, Chen W, *et al.* (2008) Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15505-10
13. Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, *et al.* (2009) Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 114: 1141-9
14. Sakaguchi S (2004) Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22: 531-62
15. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG (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: 1295-302
16. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, *et al.* (2009) Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res* 69: 2000-9
17. Wolf D, Wolf AM, Rumpold H, *et al.* (2005) The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 11: 8326-31
18. Leffers N, Gooden MJ, de Jong RA, *et al.* (2009) Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother* 58: 449-59
19. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, *et al.* (1999) The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284: 1835-7
20. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, *et al.* (1999) Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5: 919-23
21. Yoneyama H, Narumi S, Zhang Y, *et al.* (2002) Pivotal role of dendritic cell-derived CXCL10 in the retention of T helper cell 1 lymphocytes in secondary lymph nodes. *J Exp Med* 195: 1257-66
22. Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, *et al.* (2001) Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 7: 1339-46
23. Wei S, Kryczek I, Zou L, *et al.* (2005) Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 65: 5020-6
24. Curiel TJ, Cheng P, Mottram P, *et al.* (2004) Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Res* 64: 5535-8

25. Labidi-Galy SI, Sisirak V, Meeus P, *et al.* (2011) Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells in cancer contribute to immune tolerance. *Cancer Res* [Epub ahead of print]
26. Sisirak V, Faget J, Gobert M, *et al.* TGF- β from breast tumor impairs innate immune response of plasmacytoid dendritic cells establishing immune tolerance through Treg expansion (submitted)
27. Kryczek I, Wei S, Zhu G, *et al.* (2007) Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 67: 8900-5
28. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P (2006) Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 42: 717-27
29. Tempfer C, Zeisler H, Sliutz G, *et al.* (1997) Serum evaluation of interleukin 6 in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol* 66: 27-30
30. Scambia G, Testa U, Benedetti Panici P, *et al.* (1995) Prognostic significance of interleukin 6 serum levels in patients with ovarian cancer. *Br J Cancer* 71: 354-56
31. Gastl G, Plante M, Finstad CL, *et al.* (1993) High IL-6 levels in ascitic fluid correlate with reactive thrombocytosis in patients with epithelial ovarian cancer. *Br J Haematol* 83: 433-41
32. Li AJ, Madden AC, Cass I, *et al.* (2004) The prognostic significance of thrombocytosis in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 92: 211-214
33. Garg R, Wollan M, Galic V, *et al.* (2006) Common polymorphism in interleukin 6 influences survival of women with ovarian and peritoneal carcinoma. *Gynecol Oncol* 103: 793-6
34. Rodriguez GC, Haisley C, Hurteau J, *et al.* (2001) Regulation of invasion of epithelial ovarian cancer by transforming growth factor-beta. *Gynecol Oncol* 80: 245-53
35. Marth C, Fiegl H, Zeimet AG, *et al.* (2004) Interferon-gamma expression is an independent prognostic factor in ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 191: 1598-605
36. Kusuda T, Shigemasa K, Arihiro K, *et al.* (2005) Relative expression levels of Th1 and Th2 cytokine mRNA are independent prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Oncol Rep* 13: 1153-8
37. Akahiro J, Konno R, Ito K, *et al.* (2004) Impact of serum interleukin-18 level as a prognostic indicator in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Int J Clin Oncol* 9: 42-6
38. Epstein LB, Shen JT, Abele JS, Reese CC (1980) Sensitivity of human ovarian carcinoma cells to interferon and other antitumor agents as assessed by an in vitro semi-solid agar technique. *Ann N Y Acad Sci* 350: 228-44
39. Zeimet AG, Widschwendter M, Knabbe C, *et al.* (1998) Ascitic interleukin-12 is an independent prognostic factor in ovarian cancer. *J Clin Oncol* 16: 1861-8
40. Gorelik E, Landsittel DP, Marrangoni AM, *et al.* (2005) Multiplexed immunobead-based cytokine profiling for early detection of ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 981-7
41. Lambeck AJ, Crijns AP, Leffers N, *et al.* (2007) Serum cytokine profiling as a diagnostic and prognostic tool in ovarian cancer: a potential role for interleukin 7. *Clin Cancer Res* 13: 2385-91
42. Li B, Lalani AS, Harding TC, *et al.* (2006) Vascular endothelial growth factor blockade reduces intratumoral regulatory T cells and enhances the efficacy of a GM-CSF-secreting cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 12: 6808-16
43. Heffler LA, Zeillinger R, Grimm C, *et al.* (2006) Preoperative serum vascular endothelial growth factor as a prognostic parameter in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 103: 512-7
44. Bamias A, Koutsoukou V, Terpos E, *et al.* (2008) Correlation of NK T-like CD3+CD56+ cells and CD4+CD25+(hi) regulatory T cells with VEGF and TNF α in ascites from advanced ovarian cancer: Association with platinum resistance and prognosis in patients receiving first-line, platinum-based chemotherapy. *Gynecol Oncol* 108: 421-7
45. Xie X, Ye D, Chen H, *et al.* (2004) Interleukin-7 and suppression of local peritoneal immunity in ovarian carcinoma. *Int J Gynaecol Obstet* 85: 151-8

46. Borg C, Ray-Coquard I, Philip I, *et al.* (2004) CD4 lymphopenia as a risk factor for febrile neutropenia and early death after cytotoxic chemotherapy in adult patients with cancer. *Cancer* 101: 2675-80
47. Ray-Coquard I, Cropet C, Van Glabbeke M, *et al.* (2009) Lymphopenia as a prognostic factor for overall survival in advanced carcinomas, sarcomas, and lymphomas. *Cancer Res* 69: 5383-91
48. Bishara S, Griffin M, Cargill A, *et al.* (2008) Pre-treatment white blood cell subtypes as prognostic indicators in ovarian cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 138: 71-75
49. Cho H, Hur HW, Kim SW, *et al.* (2009) Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio is elevated in epithelial ovarian cancer and predicts survival after treatment. *Cancer Immunol Immunother* 58: 15-23
50. Liu B, Nash J, Runowicz C, *et al.* (2010) Ovarian cancer immunotherapy: opportunities, progresses and challenges. *J Hematol Oncol* 3: 7
51. Schmeler KM, Vadhan-Raj S, Ramirez PT, *et al.* (2009) A phase II study of GM-CSF and rIFN-gamma1b plus carboplatin for the treatment of recurrent, platinum-sensitive ovarian, fallopian tube and primary peritoneal cancer. *Gynecol Oncol* 113: 210-5
52. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00841191?term=CNTO+328&rank=1>
53. Brossart P, Wirths S, Stuhler G, *et al.* (2000) Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 96: 3102-8
54. Hodi FS, Butler M, Oble DA, *et al.* (2008) Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3005-10
55. Nesbeth Y, Scarlett U, Cubillos-Ruiz J, *et al.* (2009) CCL5-mediated endogenous anti-tumor immunity elicited by adoptively transferred lymphocytes and dendritic cell depletion. *Cancer Res* 69: 6331-8
56. Barnett B, Kryczek I, Cheng P, *et al.* (2005) Regulatory T cells in ovarian cancer: biology and therapeutic potential. *Am J Reprod Immunol* 54: 369-377
57. Hwu P (2010) Treating cancer by targeting the immune system. *N Engl J Med* 363: 779-81
58. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, *et al.* (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363: 711-23

Problématique de la thèse

Le cancer de l'ovaire (CO) est la tumeur gynécologique ayant le pronostic le plus sombre. Cependant, il représente un bon modèle pour l'étude de l'immunité antitumorale, du fait de l'abondance des échantillons tumoraux (vu que 70% des tumeurs sont diagnostiquées à un stade avancé III/IV) et de la possibilité d'étudier les cellules immunes à la fois dans le sang, l'ascite maligne et la tumeur. De nombreuses publications ont montré que le CO est immunogène, avec un impact de plusieurs sous populations immune sur le pronostic des patientes (revue de la littérature dans (Nelson, 2008)).

A travers ce travail nous nous sommes intéressés à deux populations immunes ayant un rôle dans l'induction de la tolérance vis-à-vis des tumeurs : les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et les lymphocytes T régulateurs (Treg). Notre hypothèse, à partir de nos observations précédentes dans le cancer du sein (Gobert et al., 2009; Sisirak V, 2008; Treilleux et al., 2004), est que les pDC et les Treg contribuent à l'instauration d'une tolérance favorisant la progression tumorale. Cette tolérance serait en rapport avec une altération fonctionnelle des pDC associées aux tumeurs (TApDC) qui interagiraient avec les TATreg, qui eux sont suppresseurs.

Deux études majeures publiées par l'équipe de Zou et al se sont intéressées aux pDC (Zou et al., 2001) et aux Treg (Curiel et al., 2004b) dans le contexte de cancer de l'ovaire. Ces deux publications de grande qualité ont rapporté les résultats d'études fonctionnelles réalisées essentiellement à partir de cellules immunes des ascites néoplasiques, en considérant que l'ascite est le reflet de la tumeur avec laquelle elle est en contact. L'une des premières questions que nous nous sommes posées était de comparer la distribution, le phénotype et la fonction des pDC et des Treg isolés à partir des ascites et des tumeurs de l'ovaire. Ayant observé des différences importantes, nous avons analysé l'impact sur la survie des patientes de la présence des pDC et des Treg dans ces deux compartiments au diagnostic mais également sous chimiothérapie. Les résultats présentés dans ce travail permettent une meilleure compréhension des interactions entre le système immunitaire et les cellules tumorales au sein du microenvironnement tumoral.

Resultats

Article 1: Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer

Sana Intidhar Labidi-Galy, Vanja Sisirak, Pierre Meeus, Michael Gobert, Isabelle Treilleux, Agathe Bajard, Jean-Damien Combes, Julien Faget, François Mithieux, Alexandre Cassagnol, Olivier Tredan, Isabelle Durand, Christine Ménétrier-Caux, Christophe Caux, Jean-Yves Blay, Isabelle Ray-Coquard, and Nathalie Bendriss-Vermare.

Cancer Research 71(16) August 15, 2011 ;71(16):5423-34.

Problématique

Contexte scientifique. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont des cellules immunes spécialisées dans la production d'IFN- α en réponse aux ligands de *Toll-like receptors* (TLR) 7 et 9. Elles jouent un rôle majeur dans l'immunité antivirale mais leur rôle exact dans l'immunité anti-tumorale n'est pas clair.

Lorsque ce travail a débuté en 2008, peu d'études s'étaient intéressées aux pDC dans les cancers solides. Seule une équipe avait caractérisé les pDC dans les ascites malignes dans le contexte de CO (Curiel et al., 2004a; Zou et al., 2001). Sur la base de notre expérience acquise dans le cancer du sein (Sisirak V, 2008), ce travail a consisté à réaliser une étude comparative systématique de la fréquence des pDC d'ascites et de tumeurs, de leur phénotype, de leur fonction et de leur impact sur la survie des patientes. Notre objectif était de caractériser le rôle joué par les pDC dans la réponse immune de l'hôte dans le contexte de cancer de l'ovaire.

Résultats. Nous avons trouvé que l'accumulation des pDC dans les tumeurs et non dans les ascites est délétère car associée à une rechute plus précoce des patientes. Il s'agit de la première étude qui associe les pDC à un pronostic plus sombre dans le CO. Nous avons également observé que les pDC associées aux tumeurs (TApDC) expriment un phénotype plus activé caractérisé par une expression plus élevée des molécules CD40 et CD86. Cette activation pourrait être expliquée par un taux de mort cellulaire dans les tumeurs supérieur aux ascites, conduisant à la libération de signaux endogènes activateurs des TApDC *in situ*. Contrairement aux pDC d'ascite, les TApDC sont altérées dans leur fonction principale, c'est-

à-dire la production d'IFN- α en réponse aux TLR ligands *in vitro*. Le TGF- β et le TNF- α , présents dans le microenvironnement tumoral, seraient responsables de l'inhibition fonctionnelle des TApDC. En culture lymphocytaire mixte, les TApDC et non les pDC d'ascite induisent la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes T producteurs d'IL-10, potentiellement tolérogènes et qui pourraient ainsi favoriser la progression tumorale.

Les études pionnières de l'équipe de Zou et al concernant les pDC dans le CO (Curiel et al., 2004a; Zou et al., 2001) avaient montré que i) les ascites malignes étaient hautement infiltrées par les pDC alors qu'elles sont déplétées dans le sang et ii) les pDC d'ascite étaient fonctionnelles car produisaient de grandes quantités d'IFN- α en réponse à un ligand de TLR9 (adénovirus). Une des limites de ce travail a été de considérer que l'ascite était un bon reflet du microenvironnement tumoral, et par conséquent l'ensemble des études fonctionnelles a été réalisé uniquement sur les pDC d'ascite. Notre contribution a été de montrer des différences majeures entre les TApDC et les pDC d'ascite. A notre connaissance, il s'agit du premier travail publié avec des études fonctionnelles de TApDC *ex vivo* dans le contexte de tumeurs humaines. En effet, la plupart des études fonctionnelles sur les pDC dans un contexte tumoral ont été réalisées en cocultivant *in vitro* des pDC de donneurs sains avec des surnageants de tumeurs ou de plasma, ou à partir de pDC d'ascites malignes et non de TApDC. Les informations publiées dans cet article vont donc permettre une avancée majeure sur la biologie des pDC infiltrant les tumeurs.

Il s'agit également du premier travail décrivant l'évolution des taux de pDC circulantes sous chimiothérapie chez l'homme. Nous avons montré que la masse tumorale a un impact systémique sur les pDC du sang avec une déplétion chez les patientes au diagnostic. Cette déplétion est plus profonde dans les stades avancés (III/IV) que les stades localisés (I/II). Par ailleurs, nous avons observé une restauration partielle des taux de pDC du sang chez les patientes sous chimiothérapie et celles en rémission complète et une baisse chez celles dont la maladie progresse. Ces observations montrent des similitudes avec les patients infectés par le VIH qui présentent une déplétion profonde des pDC aux stades avancés (SIDA) qui se corrige sous trithérapie antivirale (HAART).

Toutes ces nouvelles observations permettent de mieux comprendre le rôle des pDC dans l'induction d'une tolérance vis-à-vis de la tumeur et ouvrent de nouvelles voies pour le développement de nouvelles thérapies qui stimuleront l'immunité anti-tumorale.

Ce travail a également permis d'établir de nouvelles collaborations entre les départements de clinique (chirurgie, oncologie médicale et anatomo-pathologie) et de biologie (immunité) sur

la thématique du cancer de l'ovaire. Cette dynamique a permis l'émergence de nombreux projets traitant de l'immunité dans le CO (lymphocytes T régulateurs, lymphopénie, réponse immune sous chimiothérapie, cellules NK, cellules dendritiques BDCA3...) dans l'équipe qui devraient aboutir dans les prochaines années.



Cancer Research

Quantitative and Functional Alterations of Plasmacytoid Dendritic Cells Contribute to Immune Tolerance in Ovarian Cancer

Sana Intidhar Labidi-Galy, Vanja Sisirak, Pierre Meeus, et al.

Cancer Res 2011;71:5423-5434. Published OnlineFirst June 22, 2011.

Updated Version

Access the most recent version of this article at:
doi:[10.1158/0008-5472.CAN-11-0367](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0367)

Supplementary Material

Access the most recent supplemental material at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2011/06/22/0008-5472.CAN-11-0367.DC1.html>

Cited Articles

This article cites 47 articles, 20 of which you can access for free at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/16/5423.full.html#ref-list-1>

E-mail alerts

[Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

Reprints and Subscriptions

To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.

Permissions

To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org.

Quantitative and Functional Alterations of Plasmacytoid Dendritic Cells Contribute to Immune Tolerance in Ovarian Cancer

Sana Intidhar Labidi-Galy^{1,5}, Vanja Sisirak⁵, Pierre Meeus³, Michael Gobert⁵, Isabelle Treilleux^{2,5}, Agathe Bajard⁴, Jean-Damien Combes⁴, Julien Faget⁵, François Mithieux³, Alexandre Cassignol⁶, Olivier Tredan^{1,5}, Isabelle Durand⁵, Christine Ménétrier-Caux⁵, Christophe Caux⁵, Jean-Yves Blay^{1,5}, Isabelle Ray-Coquard¹, and Nathalie Bendriss-Vermare⁵

Abstract

In ovarian cancer, the immune system fails to eradicate established tumors partly due to the induction of immune tolerance within tumor microenvironment. In this study, we investigated the contribution of plasmacytoid dendritic cells (pDC) in the establishment of immune tolerance in a cohort of 44 ovarian cancer patients. In the tumor and malignant ascites, CD4⁺CD123⁺BDCA2⁺ pDC were the most abundant dendritic cell subset; however, they were profoundly depleted in peripheral blood. The presence of pDC in primary ovarian cancer, but not ascites, was an independent prognostic factor associated with early relapse. Following chemotherapy, we observed a partial restoration of blood pDC levels in patients in complete remission. These findings show preferential recruitment of pDC into tumors where they express a partially mature phenotype that may reflect an *in situ* activation. Importantly, compared with pDC found in ascites or blood, tumor-associated pDC (TApDC) produced less IFN- α , TNF- α , IL-6, macrophage inflammatory protein-1 β , and RANTES in response to toll-like receptor stimulation, and alterations in pDC functions were mainly mediated through tumor-derived TNF- α and TGF- β . Unlike ascites-derived pDC, TApDC induced IL-10 production from allogeneic naive CD4⁺ T lymphocytes, suggesting the existence of a paracrine immunosuppressive loop. Taken together, our findings indicate that both local and systemic dysfunction of pDC play a critical role in the progression of ovarian cancer via induction of immune tolerance. *Cancer Res*; 71(16): 5423–34. ©2011 AACR.

Introduction

Ovarian cancers are the leading cause of death from gynecologic cancers and the fifth most common overall cause of cancer death among women (1). Most women (~75%) present with advanced stage disease, for which the 5-year survival rate is a dismal 30% or less, and has not changed over 3 decades (2). Thus, understanding mechanisms underlying therapeutic success and failure has important clinical relevance: predicting nonresponse and developing new therapeutic approaches may improve outcome.

Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are one of 2 main subsets of human dendritic cells (DC) in blood. pDC are identified as a CD4⁺, CD11c⁻, lineage marker⁻, and HLA-DR⁺ cells that express CD123/IL-3 receptor alpha chain and/or as BDCA2- and BDCA4-expressing cells (3). At steady state, they are circulating in blood and directly enter in lymph nodes through the high endothelial venules (HEV; ref. 4, 5) and are absent from peripheral tissues. pDC are crucial effector cells in antiviral immunity. Indeed, in response to viral stimulation (6) through toll-like receptors (TLR) 7 and 9 (7), they produce high amounts of type I IFN (α , β , and ω). pDC link innate and adaptive immune responses by promoting the activation and differentiation of natural killer (NK) cells, B cells, myeloid DC (mDC), and T cells (7–9). Consistent with their antigen presentation capabilities, pDC were also shown to mediate tolerance to allogeneic antigens in cardiac allograft (10), oral antigens (11), and airway allergens (12).

Emerging evidence indicates that tumor infiltration by pDC may have clinical importance, as underlined by their identification in tumors including melanoma, head and neck, lung, ovarian, and breast cancers (13–15). Several types of cancers are characterized by impaired function and numbers of pDC (13, 16), but correlations of pDC frequency with disease progression in cancer remain poorly studied. Infiltration of primary breast carcinomas by pDC is variable and their

Authors' Affiliations: Departments of ¹Medical Oncology, ²Pathology, ³Surgery, and ⁴Bioinformatics; ⁵Université Lyon 1, ISPB, INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon; and ⁶Department of Surgery, Infirmerie Protestante, Chemin du Penthod Caluire, Caluire et Cuire, Rhone, France

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

Corresponding Author: Sana Intidhar Labidi-Galy, Department of Medical Oncology, Centre Léon Bérard and Université Lyon 1, ISPB; or INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec 69008 Lyon, France. Phone: 33478782938; Fax: 33478782716; E-mail: labidi@lyon.fnclcc.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0367

©2011 American Association for Cancer Research.

presence at high density is associated with poor clinical outcome (17) and their depletion in the blood of pancreatic cancer patients is correlated with reduced survival (18).

In ovarian cancer, several studies have shown an accumulation of pDC in malignant ascites, with depletion in blood (14, 19, 20). pDC were reported to be attracted into ascites through SDF-1/CXCL12, to produce high amounts of type I IFN in response to TLR ligand (14, 21), and to induce CD8⁺ regulatory T cells which suppress tumor antigen-specific T cells through the production of IL-10 (21). In addition, ascite pDC were shown to favor tumor angiogenesis *via* the production of TNF- α and IL-8 (20). However, the role of tumor infiltration by pDC [called tumor-associated pDC (TApDC)] in advanced ovarian cancer remains to be addressed.

In this report, we have characterized the tissue distribution, phenotype, and functions of pDC in advanced epithelial ovarian cancer and their impact on patients' clinical outcome. Our findings bring new insights into the physiopathology of pDC in the context of ovarian cancer in humans, showing quantitative systemic and local functional alterations of pDC associated with progression.

Materials and Methods

Patients

We studied 44 untreated patients with International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) stage I, II, III, and IV epithelial ovarian cancers. All patients gave written, informed consent. The study was approved by local Institutional Review Boards. Biological samples were collected at Centre Leon Bérard, Lyon, and other institutions in Rhône-Alpes Region, France.

Preparation of tumors and ascites cell suspensions

We collected fresh solid tumors and malignant ascites aseptically. Cells were harvested from ascites by centrifugation over a Ficoll-Hypaque density gradient. Ovarian tumors samples were minced into small pieces in serum-free RPMI medium and digested with collagenase Ia (1 μ g/mL) and DNase I (50 KU/mL; Sigma Aldrich) for 1 hour at 37°C with gentle agitation. The resulting cell suspensions were filtered, washed, and resuspended in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Lonza) and antibiotics (complete RPMI) before isolation of mononuclear cells (MNC) by centrifugation over a Ficoll-Hypaque density gradient for further analyses.

Peripheral blood MNCs

Peripheral blood was collected aseptically from healthy donors (HD; $n = 55$) or ovarian cancer patients ($n = 44$) in a CTAD-coated tube. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained over a Ficoll-Hypaque density gradient, washed twice, and resuspended in PBS containing 2% FCS (Lonza) and 0.5 mmol/L EDTA for flow cytometry analysis.

Ex vivo mononuclear cell stimulation

We stimulated MNC from tumors, ascites, and peripheral blood from 6 patients and 8 HDs in complete RPMI at 1×10^6 cells per well in duplicate wells with formaldehyde-inactivated

influenza (flu) virus (A/Wisconsin/67/05; generous gift from Aventis Pasteur) and CpG-A/ODN 2336 that were used at 100 HAU/mL and 5 μ g/mL, respectively in 24-well tissue culture plate at 37°C. Cell-culture supernatants were harvested after 18 hours and used for cytokines production quantitation by ELISA.

pDC purification from blood, tonsils, tumors, and ascites

To isolate pDC from biological samples, CD3-, CD8-, CD11b-, CD14-, CD16-, CD19-, CD20-, CD56-, Glycophorin A-, and EpCAM-expressing cells were depleted using specific antibodies and paramagnetic beads (Invitrogen). pDC from blood and HD tonsils were purified from lineage-negative enriched MNC using the BDCA4 cell isolation kit (Miltenyi Biotec) according to the supplier's instructions. Ovarian tumors or malignant ascite pDC were sorted from lineage-negative enriched MNC using FACS (FACSVantage SE DiVa flow cytometer, BD Bioscience) as CD4⁺CD123⁺ cells using APC anti-CD123 (Biolegend) and PE-Cy5 anti-CD4 (Beckman Coulter). Purity was routinely 98% or more.

Preparation of ovarian tumors and ascites-derived supernatants

Single-cell suspensions from ovarian tumors and ascites were incubated at a final concentration of 1.5×10^6 cells/mL in complete RPMI in petri dishes. Culture supernatants were collected after 48 hours, filtrated on 0.2 μ m, and cryopreserved at -80°C until use.

Culture of ovarian tumor-associated or healthy pDC

Freshly isolated TApDC and ascite pDC were cultured at 5×10^5 cells/mL in 96-well flat-bottom plates in complete RPMI for 24 hours in presence of recombinant hIL-3 (Peprotech), formaldehyde-inactivated influenza (flu) virus (A/Wisconsin/67/05) and CpG-A/ODN 2336 that were used at 20 ng/mL, 100 HAU/mL, and 5 μ g/mL, respectively. Freshly isolated healthy blood or tonsil pDC were cultured as previously mentioned in the presence of hIL-3 with or without ovarian tumor (TUMSN) or ascite (ASCSN) supernatants supplied at 25% for 16 hours before addition of TLR ligands for another 24 hours. Cells and supernatants were harvested after 24 hours for TApDC and ascite pDC, and 40 hours for healthy pDC culture to analyze cell surface expression of activation markers and cell viability (by Propidium Iodide Incorporation) by flow cytometry and cytokines production by ELISA.

Flow cytometry analysis

Three-color staining was done by flow cytometry on a FACScan (BD Bioscience) using isotype-matched controls or monoclonal antibodies and data were analyzed with CellQuest software (BD Bioscience). pDC were identified as CD4⁺CD123⁺BDCA2⁺ cells using fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-BDCA2 (Miltenyi Biotec), PE anti-CD123 (BD Bioscience), and PE-Cy5 anti-CD4 (Beckman Coulter). mDC were identified as Lin⁻CD4⁺CD11c⁺ using FITC-conjugated lineage (Lin) cocktail (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, and CD56; BD Bioscience), PE anti-CD11c (BD Bioscience),

and PE-Cy5 anti-CD4 (Beckman Coulter) antibodies. CD4⁺ T lymphocytes were identified as CD3⁺CD4⁺ cells using FITC anti-CD3 (BD Bioscience) and PE-Cy5 anti-CD4 antibodies (Beckman Coulter). The phenotype of CD4⁺BDCA2⁺ pDC was analyzed with PE-coupled anti-CD86 (BD Bioscience) and anti-CD40 (Beckman Coulter). Monoclonal antibodies. Viability was assessed by Propidium Iodide Incorporation. Flow cytometry results are expressed as% positive cells and mean fluorescence intensity (MFI). At least 200,000 gated events/condition were analyzed on the total cell population and 5,000 gated events/condition on purified cells.

Allogeneic mixed leukocyte reaction

Allogeneic CD4⁺CD45RA⁺ naive T cells were purified from HD peripheral blood after magnetic depletion using anti-CD8, -CD14, -CD19, -CD16, -CD56, and -glycophorin A antibodies followed by anti-IgG beads (Invitrogen). The purity was routinely more than 95%. Highly purified fluorescence-activated cell sorting (FACS)-sorted pDC from ovarian tumors and ascites from the same patients were differentiated by culture in IL-3 (20 ng/mL) for 16 hours and then cultured with responder T cells in a ratio of 0;3;11;33;111;333;1,111;3,333, and 10,000 per 100,000 T cells for 96 hours in triplicate in round bottom 96-well plates. Finally, cells were pulsed with 0.5 μ Ci per well [3H]thymidine (Amersham Biosciences) and harvested 18 hours later. The [3H]thymidine incorporation was assessed by liquid scintillation spectroscopy (Betaplate scintillation counter, Perkin Elmer). Culture supernatants were collected for cytokine analysis by ELISA.

Determination of cytokines production

The ELISA for hIFN- α (Bender MedSystems), hIL-10 (Bender MedSystems), hIFN- γ (Bender MedSystems), and hIP-10/CXCL10 (BD Biosciences) were used according to manufacturer's instructions. Levels of TNF- α , IL-6, IL-8, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 β , IP-10, RANTES, IL-12p40, and IL-12 p70 in culture supernatants were determined using a Milliplex map, based on the Luminex xMAP technology by Millipore.

Statistical analysis

Comparison of independent samples was done by the Student's *t* test or nonparametric tests when appropriate. Correlation analysis of the data was done using the Spearman test. The following clinical variables were collected prospectively: age, performance status (PS), stage, debulking surgery, and the presence of macroscopic residual disease. pDC and mDC levels in tumors and ascites were categorized in upper tertile and lower 2 tertiles.

Progression-free survival (PFS) was defined as the time from pathologic diagnosis to progression. PFS was calculated using Kaplan–Meier method. To evaluate the relationship between survival and biological and/or clinical factors, all potential prognostic factors were included in univariate Cox proportional hazard regression models (22). Candidate prognostic factors with a 0.05 level of significance in univariate analysis were then selected for inclusion in the multivariate analysis. Independent prognostic variables of PFS were identified by a

Cox regression analysis using a backward selection procedure to adjust the time cohort effect on patient's characteristics. All statistical analyses were done using SAS software v.9.2 for Microsoft Windows (SAS Institute). All *P* values for 2-tailed tests were considered significant when *P* < 0.05.

Results

Accumulation of pDC in ascites and depletion in the blood

We evaluated the tissue distribution of CD4⁺CD123⁺BDCA2⁺ pDC (Refs. 3, 23; Supplementary Fig. S1A) and Lineage⁻CD4⁺CD11c⁺ mDC (Supplementary Fig. S1B; ref. 24) as a fraction of total MNC in 44 patients with previously untreated epithelial ovarian cancer. Patients' characteristics are detailed in Supplementary Table S1. Consistent with previous investigations (14), the percentage of both pDC and mDC in total PBMC were significantly reduced (*P* < 10⁻³) in ovarian cancer patients (mDC median% = 0.04, range 0–0.65; pDC median% = 0.11, range 0.01–0.98) compared with HD (mDC median% = 0.18, range 0–1.19; pDC median% = 0.32, range 0.07–0.78; Fig. 1A and B). The depletion of blood pDC tended to be deeper in advanced stages (III/IV; 0.1% ovarian cancer patients compared with early stages (I/II; 0.19%), although this did not reach statistical significance (*P* = 0.09; Fig. 1C). Similar variations according to stage were observed with mDC (*P* = 0.43; Fig. 1D). These data suggest that pDC are actively recruited from blood to the tumor.

To document variations in pDC number in blood during treatment, we determined pDC levels in patients at diagnosis (*n* = 44), on therapy, that is, after 4 cycles of chemotherapy (*n* = 12), in complete remission (CR) 3 months after the end of treatment (*n* = 10) and at progression (*n* = 12). We observed partial restoration of blood pDC in most of the patients after 4 cycles of chemotherapy (*P* = 0.01; Fig. 1E) which was maintained in patients in CR (*P* < 10⁻²). In contrast, we observed a trend toward decreased pDC levels in patients with progressive disease when compared with those in CR (*P* = 0.22). For mDC, we observed significant lower levels in progressive patients when compared with HD (*P* < 10⁻³; Fig. 1F).

With regard to their tissue distribution, pDC infiltrated some tumors (median% = 0.06, range 0–0.68) and accumulated in the majority of malignant ascites (median% = 0.83, range 0.04–2.93; Fig. 1A). Indeed, ascite pDC were 7.2-fold higher than patient blood pDC (*P* < 10⁻³) and 13.8-fold higher than TApDC (*P* < 10⁻³). MDC were present in malignant ascites (median% = 0.06, range 0–0.86) but in lower proportions than pDC (*P* < 10⁻³) while their presence in tumors was scarce (median% = 0.01, range 0–0.13; Fig. 1B).

Correlation of TApDC frequency with poor clinical outcome

The distribution of pDC was skewed with depletion in blood in most of ovarian cancer patients and accumulation in some tumors and especially in malignant ascites. We questioned the impact of the presence of pDC in tumors and ascites on patients' outcome. We adopted a classification by tertile (33rd percentile) to compare the highest tertile subgroup to all

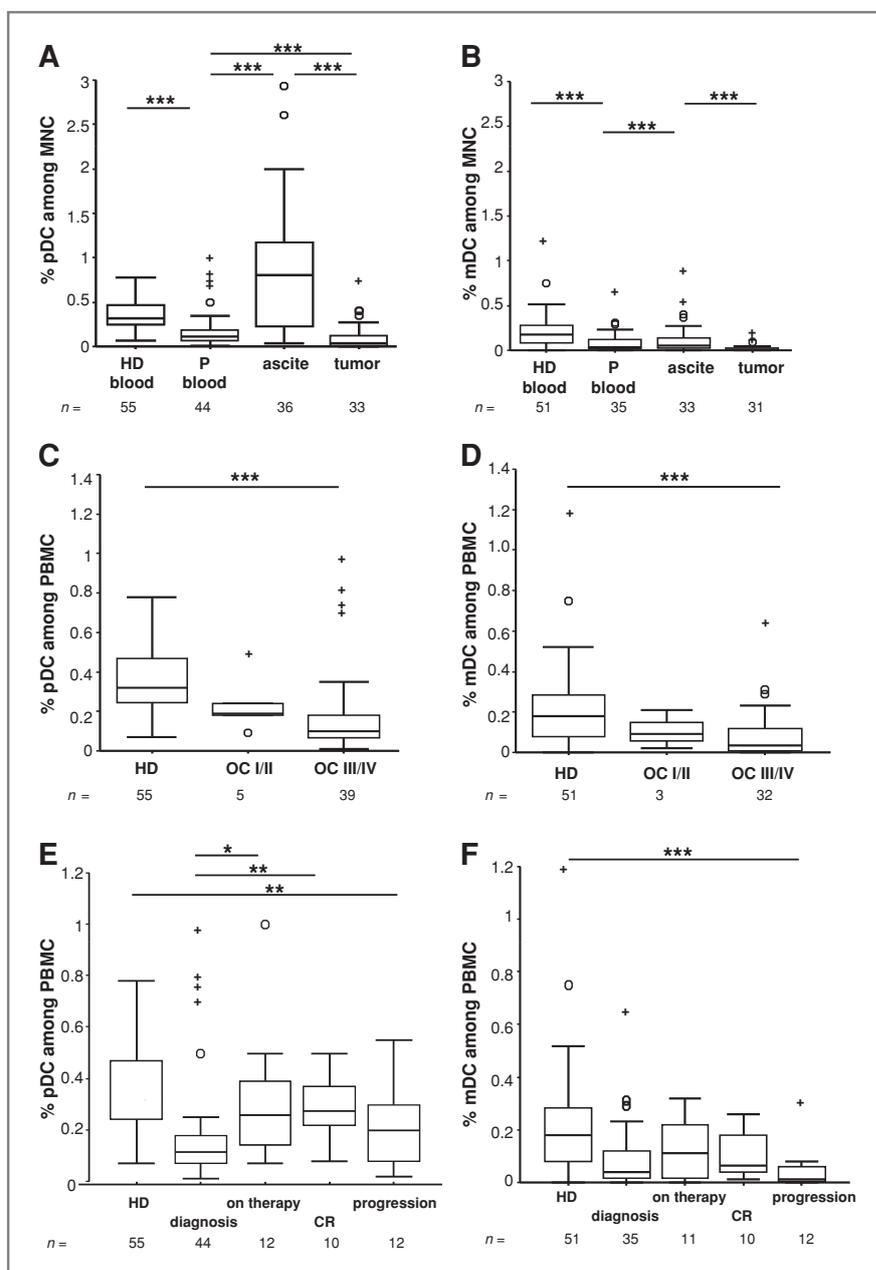


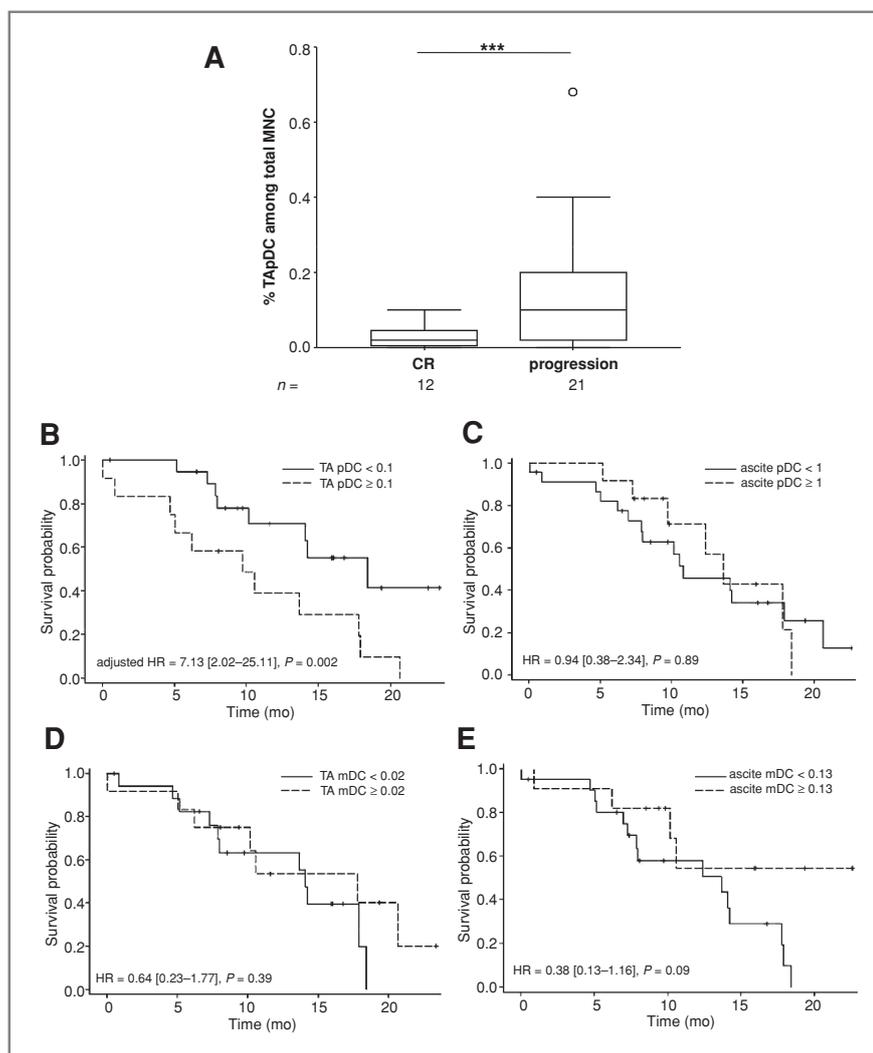
Figure 1. Distribution and frequency of CD4⁺ B220⁺ CD123⁺ pDC and Lin⁻ CD4⁺ CD11c⁺ mDC obtained by FACS analysis in biological samples. MNC from freshly untreated ovarian cancer, malignant ascites, and peripheral blood from ovarian cancer patients (P) and HDs were prepared. Box plot set of pDC and mDC levels determined as a percentage among total MNC. *P* values were derived from Mann-Whitney test or Student's test for each comparison. A and B, pDC and mDC levels among MNC in blood, ascite, and tumors of ovarian cancer patients and blood of HD. C and D, pDC and mDC levels among PBMC in HD and ovarian cancer patients according to the stage of the disease. E and F, pDC and mDC levels among PBMC in ovarian cancer patients during therapy and comparison with HD. +, extremes; ○, outlier. *, <math>P < 0.05</math>; **, <math>P < 10^{-2}</math>; ***, <math>P < 10^{-3}</math>. OC, ovarian cancer.

others. To address this question, we analyzed all relevant clinical and pathologic information's (Supplementary Table S1) that were available on the 44 patients. As our study was prospective with a median follow-up of 14 months, we centred our analysis on PFS. In addition to TApDC levels, 5 clinico-pathologic variables (age, stage, PS, debulking surgery, and the presence of residual disease) were analyzed due to their previously described prognostic significance in ovarian cancer (25). We observed that the subgroup of patients who

progressed showed significantly higher levels of TApDC than those in CR ($P < 0.05$; Fig. 2A). In univariate analysis, the following factors were associated with prolonged PFS: early stage (I-II), debulking surgery, absence of residual tumors and low tumor infiltration by pDC defined as less than 0.1% of total MNC (Fig. 2B and Supplementary Table S2).

In contrast, high levels of ascite pDC had no impact on ovarian cancer patients' outcome (Fig. 2C). When using a cut-off of ascite pDC 1% or more of total MNC (10-fold

Figure 2. Tumors highly infiltrated by pDC showed early relapse. PFS rates were calculated using Kaplan–Meier method and compared using log-rank test. A, box plot set showing tumor-associated pDC (TApDC) levels in patients in CR and those with progressive disease after a median follow-up of 14 months. B–E, PFS of patients with the highest tertile (33rd percentile) frequency of TApDC ($\geq 0.1\%$), ascite pDC ($\geq 1\%$), TAmDC ($\geq 0.02\%$), and ascite mDC ($\geq 0.13\%$) compared with all others. ***, $<10^{-3}$.



higher than in tumors), median PFS was estimated to 13.6 months compared with 10.8 months in patients with ascite pDC less than 1% [hazard ratio (HR) = 0.94, CI: 0.38–2.34, $P = 0.89$]. To assess whether this effect was specific to pDC or concerned all DCs, we further investigated the impact of mDC accumulation in ascites and tumors on PFS. We did not observe any impact of tumor-associated mDC (TAmDC) nor ascite mDC on PFS of ovarian cancer patients (Fig. 2D and E; Supplementary Table S2).

In multivariate analysis, TApDC remained an independent prognostic factor associated with early relapse. Median PFS for patients with the highest tertile of pDC ($\geq 0.1\%$ of total MNC) was 9.7 months whereas those with TApDC less than 0.1% showed a median PFS of 18.4 months (HR = 7.13, CI: 2.02–25.11, $P = 0.002$; Fig. 2B and Supplementary Table S2) suggesting that infiltration of ovarian tumor by pDC has a deleterious effect on patients' outcome.

Partial phenotypic activation of TApDC

To examine the possibility that tumors alter pDC status, expression levels of markers involved in pDC maturation/activation or in T cell costimulation (24) were measured directly *ex vivo* comparing blood, ascite, and tumor-associated pDC from 17 patients. We found that TApDC expressed a semimature phenotype with significantly higher levels of CD40 and CD86, compared with ascites and blood pDC, which showed classic immature phenotype (Fig. 3). These findings suggest that ovarian tumors induce partial activation of TApDC *in situ*. To assess whether this observation could be explained by the presence of dead cells (26), we investigated by flow cytometry the percentage of dead cells among MNC in ascites and tumors from 13 ovarian cancer patients identified by Propidium Iodide Incorporation. We observed 5-fold higher levels of dead MNC in tumors (median% = 20) than ascites (median% = 4.94, $P < 10^{-3}$).

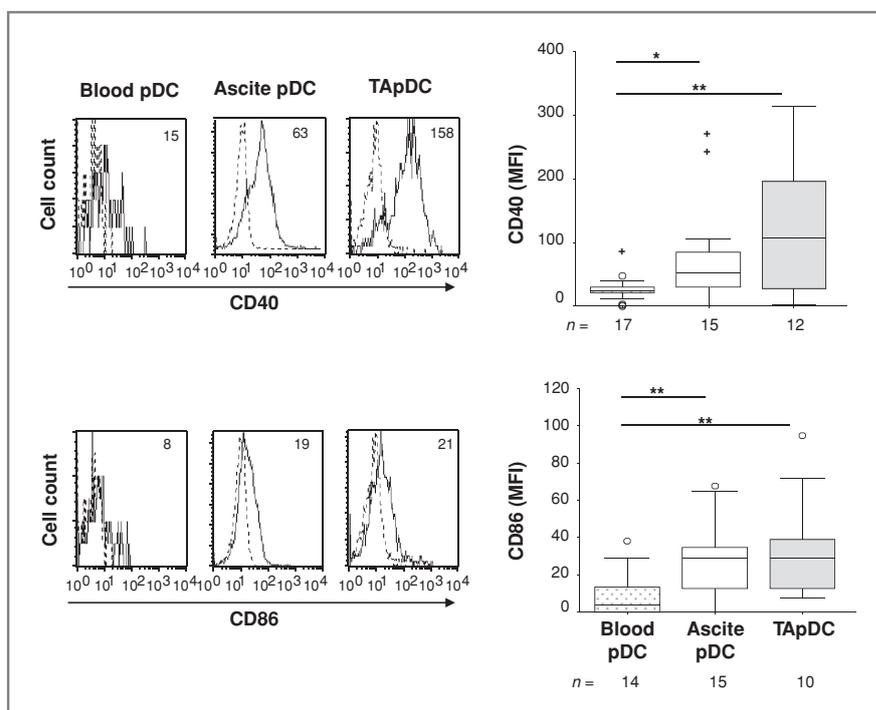


Figure 3. TApDC isolated from ovarian tumors display a partially activated phenotype. Three-color flow cytometry analysis was used to assess the expression of CD40 and CD86 on CD4⁺CD123⁺ pDC from blood, ascites, and tumors from 17 ovarian cancer patients. Statistical analysis was done using Mann-Whitney test. Values are expressed as MFI minus FMO control. +, extremes; ○, outlier. *, < 0.05; **, < 10⁻².

Full maturation of TApDC and ascite pDC after *in vitro* stimulation

Highly purified pDC from ascites, ovarian tumors, and HD blood were cultured with IL-3 and TLR ligands (TLR-L). Changes in expression levels were determined using paired analysis of expression of CD40 and CD86 before and after stimulation. CD40 and CD86 expression increased following IL-3, CpG-A, and influenza virus (flu) stimulation in both ascite and tumor pDC at higher levels than blood pDC (Fig. 4). Interestingly, TApDC seemed to be more prompted than blood and ascite pDC to mature *in vitro* even in the absence of TLR-L as culture in IL-3 induced high expression of both activation markers. Another important observation is the acquisition of a fully mature CD40^{high} CD86^{high} phenotype by both ascite pDC and TApDC but not blood pDC in response to CpG-A. These observations were similar to those obtained with Flu virus. Thus, tumor microenvironment seemed to have altered TLR9 response of ascite pDC and TApDC induced by CpG-A. These findings show that both TApDC and ascite pDC conserve their ability to achieve full maturation following *in vitro* TLR stimulation despite an altered phenotype at baseline.

Amplification of IL-10 production by T cells in response to TApDC

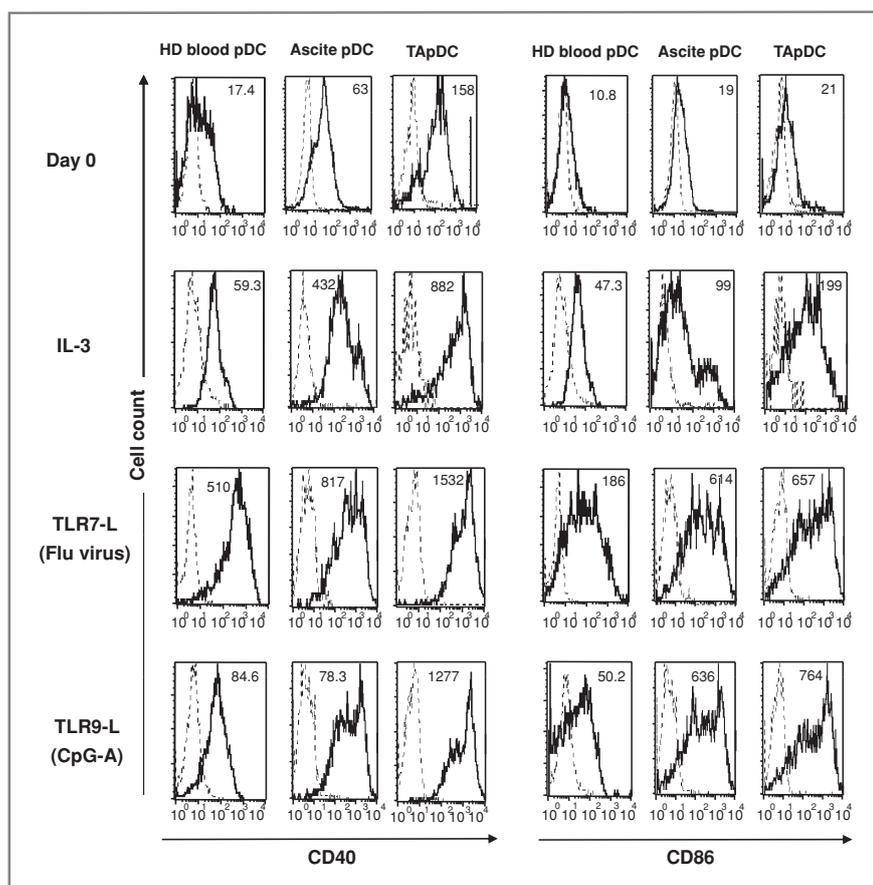
pDC play an important role as antigen-presenting cell by inducing antitumor CD4⁺ T cell responses (27). We observed significant correlation between TApDC and CD4⁺ T lymphocytes infiltration in tumors ($r^2 = 0.657$, $P < 10^{-3}$; Fig. 5A) whereas no significant correlation was observed with mDC

($r^2 = 0.278$, $P = 0.13$). Next, we examined the function of TApDC in priming T-cell responses. Freshly, FACS-sorted pDC from ascites and ovarian tumors from the same patients ($n = 2$) were used to stimulate naive allogeneic CD4⁺ T cells purified from HD blood *in vitro*. Both TApDC and ascite pDC induced proliferation of allogeneic naive CD4⁺ T cells in a dose-dependent manner (Fig. 5B). Strikingly, TApDC induced strong IL-10 ($P < 0.05$) production by primed T cells and slightly higher levels of IFN- γ in comparison to ascite pDC (Fig. 5C). These results lead us to propose that TApDC may contribute to create an immunosuppressive environment through the generation of IL-10-producing T cells.

Inhibition of IFN- α production in TApDC

The production of IFN- α in response to TLR 7 and 9 ligands represents a key mediator in pDC innate function (28). We compared the capacity of blood pDC from HD ($n = 12$), TApDC and ascite pDC from ovarian cancer patients ($n = 5$) to produce IFN- α in response to TLR ligands. Consistent with a previous report (14), ascite pDC produced high levels of IFN- α in response to TLR7 and 9 ligands (Fig. 6A). Although not significant, they produce even more IFN- α than HD blood pDC in response to Flu ($P = 0.1$; Fig. 6A) but not CpG-A ($P = 0.54$; Fig. 6B). In contrast, we observed a severe inhibition of IFN- α production in TApDC compared with ascite and blood pDC mainly in response to TLR9 (CpG-A) and to a lower extent to TLR7 ligands (flu virus). These results indicate that the capacity of pDC to produce IFN- α was selectively altered at the tumor site.

Figure 4. TApDC and ascite pDC acquire a fully mature phenotype after TLR ligands activation *in vitro*. Highly purified TApDC ($n = 5$), ascite pDC ($n = 5$), and HD blood pDC ($n = 2$) were cultured with IL-3 (20 ng/mL), inactivated flu (Influenza) virus (100 HAU/mL), and CpG-A (5 μ g/mL) for 40 hours. Activation of pDC was monitored by analyzing CD40 and CD86 expression by flow cytometry. Data are representative of 2 or 5 independent experiments and MFI values of total cells are indicated in each histogram.



pDC were profoundly depleted from the blood of ovarian cancer patients preventing their isolation. As pDC is the main cellular source of IFN- α in response to TLR ligands, we compared the capacity of total MNC (adjusted to the percentage of pDC) of blood, ascite, and tumors from the same patients ($n = 6$) and PBMC from HD ($n = 8$) to produce this cytokine. IFN- α production was reduced in tumor-associated MNC compared with ascite or blood MNC after exposure to CpG-A (Fig. 6D) confirming that only pDC into tumor mass are altered for this innate function. Although pDC are severely depleted in ovarian cancer patient's blood, they are still functional as patients' PBMC produced similar levels of IFN- α in response to TLR ligands than HD (Fig. 6C and D).

We further investigated the production of 8 cytokines/chemokines (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12p40, IL-12p70, MIP-1 β , IP-10, and RANTES) by FACS-sorted TApDC and ascite pDC that were activated *in vitro* by TLR ligands (Supplementary Fig. S2A and B). We observed, similar to IFN- α , a significant inhibition of proinflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α) and chemokines (MIP-1 β and RANTES) production by TApDC mainly in response to TLR9 ligand (Supplementary Fig. S2A). By contrast, there was no significant difference for the production of IL-8 and IP-10 by TLR-activated TApDC and ascite pDC (Supplementary Fig. S2B).

Altogether, the substantial differences between TApDC and ascite pDC in term of frequencies, phenotype, response to TLR ligands, and impact on patients' outcome suggest that pDC are differentially affected in the microenvironment of ascites and tumors suggesting that malignant ascites do not closely mirror the tumor microenvironment of the tumor mass.

Inhibition of IFN- α production of healthy pDC by ovarian tumor-derived supernatants mainly through TGF- β and TNF- α dependent mechanism *in vitro*

The weak IFN- α production of TApDC compared with ascite and blood pDC suggests that the tumor microenvironment actively and specifically inhibits TApDC ability to produce IFN- α . To decipher the mechanisms involved in TApDC dysfunction, pDC isolated from blood and/or tonsils of HD were preincubated in presence of IL-3 and ovarian tumor-derived supernatants (TUMSN, $n = 5$) for 16 hours and then stimulated during 24 hours with TLR ligands (flu virus or CpG-A). Most of TUMSN inhibited IFN- α production of pDC to both flu virus (median% of inhibition = 60.8%) and CpG-A (median% of inhibition = 53.2%; Fig. 7A). In contrast, IP-10 production remained unaffected (Fig. 7A) and no effect on pDC viability was detected (data not shown), excluding that the negative effect of TUMSN on IFN- α production by

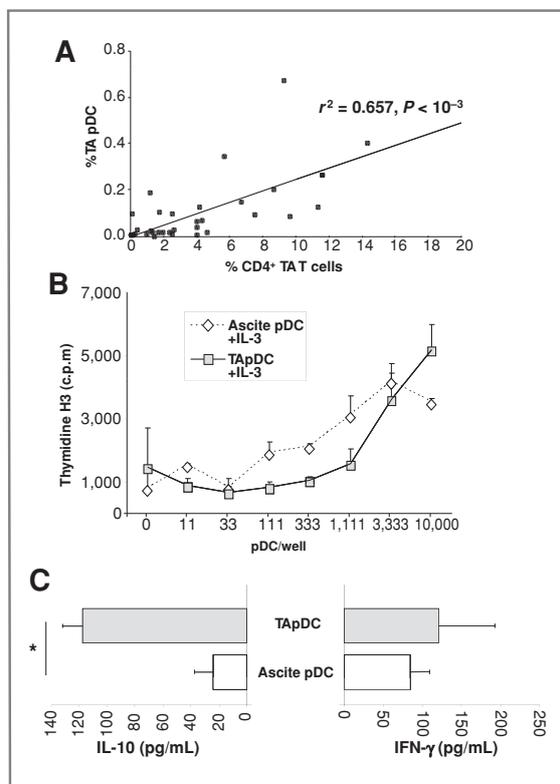


Figure 5. TApDC prime allogeneic naive CD4⁺ T cells and induce IL-10 T cell response. **A**, Spearman rank correlations between the proportion of CD4⁺BDCA2⁺CD123⁺ pDC and CD3⁺CD4⁺ T lymphocytes in ovarian tumors. **B**, FACS-sorted TApDC and ascite pDC were cultured with IL-3 (20 ng/mL) for 24 hours and then incubated at graded doses with naive allogeneic CD4⁺CD45RA⁺ T cells for 5 days. T cell proliferation was determined by ³H thymidine incorporation [mean and s.e.m (error bars) of triplicate cultures]. **C**, culture supernatants were collected and IL-10 and IFN- γ were analyzed by ELISA. Data are one of 2 independent experiments. *, <math>P < 0.05</math>. TA, tumor-associated.

TLR-activated pDC involved induction of cell death. These results suggest that soluble factors present within the tumor environment contribute to the functional inhibition of TLR-activated pDC. Of most importance, supernatants derived from tumors (TUMSN) were more efficient than those derived from ascites (ASCSN; 48%–67% compared with 14%–23% of inhibition, respectively; $P < 10^{-2}$) to block IFN- α production by CpG-A-activated pDC (Supplementary Fig. S3).

We next investigated the involvement of several well-known immunomodulators including TGF- β (29), TNF- α , and IL-10 (30) to inhibit IFN- α production by pDC. We observed that TUMSN contained significantly higher levels of TNF- α (median = 470 pg/mL, range 279–2,503 pg/mL) than ASCSN (median = 218 pg/mL, range 64–476 pg/mL; $P = 0.03$; Supplementary Fig. S4A). IL-10 was also higher in TUMSN (median = 2,900 pg/mL, range 263–5,862 pg/mL) than ASCSN (median = 1,638 pg/mL, range 530–2,864 pg/mL) but this difference was not significant ($P = 0.07$; Supplementary

Fig. S4B) whereas active TGF- β 1 was present at similar levels in both TUMSN and ASCSN (Supplementary Fig. S4C).

To investigate the role of IL-10, TGF- β , and TNF- α in pDC alteration by the tumor microenvironment, we blocked these cytokines in ovarian TUMSN using neutralizing antibodies (Ab). Blocking TNF- α and TGF- β independently, but not IL-10, induced a partial reversion of ovarian TUMSN-mediated inhibitory effect on IFN- α production of healthy pDC (Fig. 7B). TUMSN-mediated inhibitory effect on IFN- α production was totally reversed when TNF- α and TGF- β were simultaneously blocked, while blocking IL-10 together with either TNF- α or TGF- β has only minor additional effect. Collectively, these observations show that the specific inhibitory effect associated to the soluble fraction of the ovarian tumor environment on pDC innate functions is mainly mediated through TGF- β and TNF- α cooperation.

Discussion

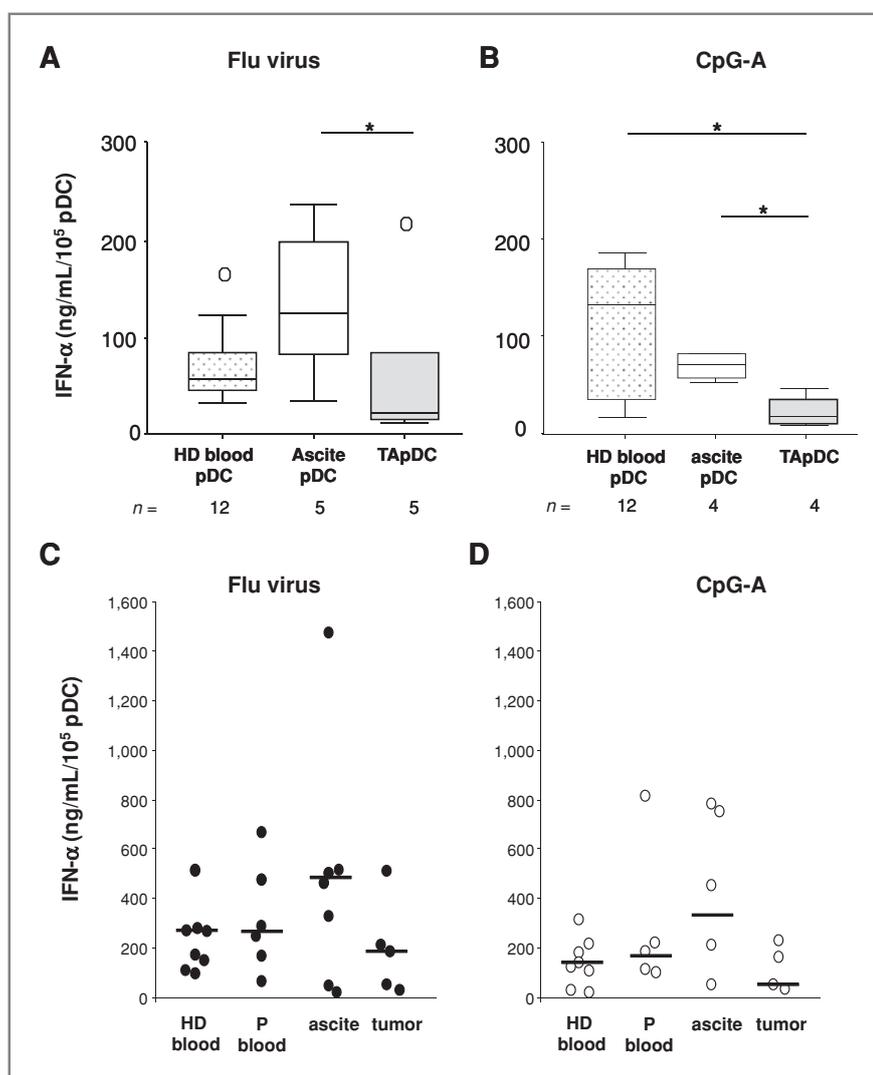
In this prospective study on 44 patients presenting ovarian cancer and using *ex vivo* analysis, we showed that TApDC are different from ascite and blood pDC in terms of distribution, phenotype, innate and adaptative functions, and impact on patients' outcome. Indeed, pDC accumulate mainly in malignant ascites whereas their frequencies were variable in ovarian tumors. Of most importance, only accumulation of TApDC was an independent prognostic factor associated with early relapse whereas their presence in ascites was not deleterious for patients. The presence of pDC in ascites and tumors had no impact on patients' outcome highlighting the specific pejorative role of pDC in the context of tumor microenvironment.

To further investigate the clinical significance of the presence of pDC in tumors and ascites, we conducted a systematic comparison of TApDC and ascite pDC. TApDC showed a semimature phenotype as illustrated by higher levels of activation molecules CD40 and CD86. This partial activation of TApDC might be due to endogenous danger signals such as self-nucleic acids released by dying cells in the tumor microenvironment (26) which were in higher proportions in tumors than ascites. We also observed increased levels of TNF- α in ovarian TUMSN when compared with ASCSN, a cytokine previously shown to induce pDC maturation (31). In addition to their baseline semimature phenotype, TApDC were more potent than ascite or blood pDC to mature *in vitro* in response to both TLR-independent and TLR-dependent signals.

In contrast, TApDC but not ascite pDC were strongly affected for their capacity to produce IFN- α upon TLR stimulation, in particular in response to CpG-A, a TLR9 ligand known to induce type I IFN secretion in pDC (32). Collectively, these results showed that TApDC seemed to respond to signals by maturing rather than by producing IFN- α , even in response to IFN- α inducers.

Moreover, ovarian tumor-derived supernatants blocked specifically IFN- α production by TLR-activated pDC *in vitro*. These results suggest that soluble factors present in the tumor microenvironment are involved in TApDC dysfunction. In this context, we showed that cytokines such as TGF- β and TNF- α

Figure 6. TApDC are inhibited for their IFN- α production following TLR ligands stimulation. A and B, FACS-sorted TApDC, ascite pDC, and blood pDC from HDs were cultured with inactivated flu virus (100 HAU/mL) and CpG-A (5 μ g/mL) for 24 hours. IFN- α production in culture supernatants was determined by ELISA. Results were standardized by calculating the production of IFN- α for 1×10^5 pDC for each sample. C and D, total MNC (1×10^6 cells/well) from blood, ascites, and tumors of the same patients ($n = 6$) and from blood of HD ($n = 8$) were activated in duplicate with TLR-7 (flu) and 9 (CpG-A) ligands for 18 hours in 24-well tissue culture plates. IFN- α production was measured by ELISA and standardized to the percentage of pDC contained in each sample as determined by FACS analysis. The production of IFN- α was adjusted to 1×10^5 pDC. Median values are represented by horizontal lines in each series.



detected in ovarian tumor derived-supernatants, were involved in this pDC dysfunction. The inhibitory role of TGF- β is consistent with a previous study showing that increased intratumoral IFN- α levels correlates with reduced TGF- β 1 in breast cancer patients (33). Moreover, recent reports in mice and human showed that this cytokine contributes to peyer patches, splenic stromal, and tumor environments mediated inhibition of pDC capacity to produce IFN- α (29, 34, 35).

The deleterious prognostic effect of TApDC in ovarian cancer could be related to the alteration of IFN- α production. This cytokine is indeed active against ovarian cancer *in vitro* (36, 37) and *in vivo* (38, 39). Inhibition of IFN- α production by TApDC might confer a selective advantage for ovarian tumors, as IFN- α has direct antitumor activities, by inhibiting tumor cell proliferation and neoangiogenesis, but also by promoting

immunosurveillance through the activation of B cells, NK cells and macrophages (reviewed in reference 40) and inhibiting tumor stem cell-like population (41).

In this study, we observed that both TLR-activated TApDC and ascite pDC were able to induce CD4⁺ T cell proliferation consistently with the acquisition of a fully mature phenotype. Importantly, T cell proliferation induced by TApDC correlated with high IL-10 production, confirming the role of TApDC in inducing immune tolerance in ovarian cancer. Taken together, the differences observed between TApDC and ascite pDC suggest that the role of these immune cells are different and possibly opposite according to the tissue. pDC play a pro-inflammatory role in malignant ascites, whereas they are immunosuppressive in tumors. IFN- α produced primarily from pDC, in addition to having direct antitumoral activity (36, 37), provides an important signal for T helper precursor differentiation

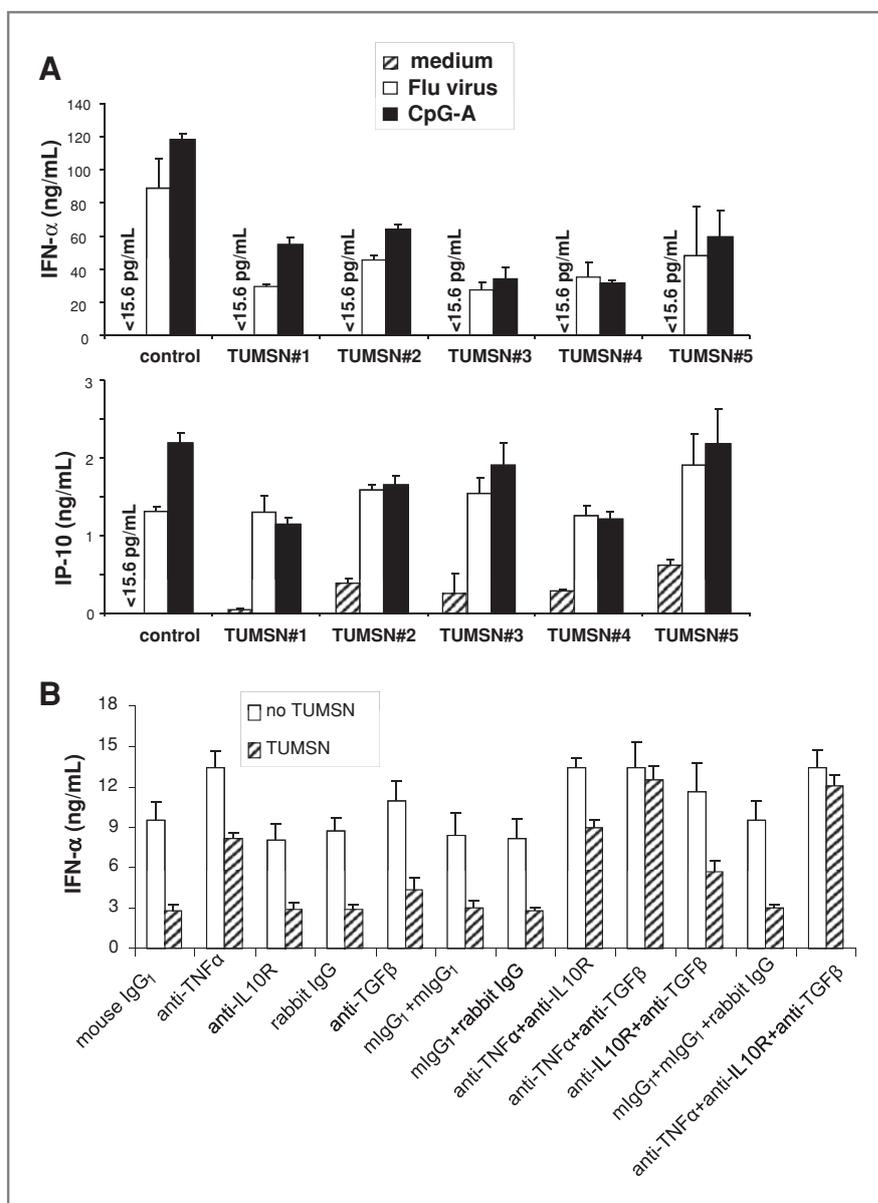


Figure 7. Ovarian tumor microenvironment inhibits IFN- α production by healthy pDC through TGF- β and TNF- α cooperation. Supernatants of single-cell suspensions from ovarian tumors (TUMSN) were collected after 48 hours and frozen. A, purified blood pDC from HD were preincubated with 20 ng/mL IL-3 either alone or with 25% of TUMSN derived from 5 different ovarian cancer patients for 16 hours and then activated or not for another 24 hours with inactivated fu virus (100 HAU/mL) or CpG-A (5 μ g/mL). After 40 hours, the production of IFN- α and IP-10 was measured by ELISA. No IFN- α was detected in media conditions (no TLR activation) and IP-10 was detected in some ovarian tumor-derived supernatants at low levels. B, purified tonsil pDC were preincubated with IL-3 either alone or in combination with 25% of ovarian TUMSN in the presence or absence of specific control isotype antibodies, anti-TNF- α , anti-IL-10 receptor, and anti-TGF- β blocking antibodies (10 μ g/mL) for 16 hours. Flu virus was then added for another 24 hours. IFN- α was measured in culture supernatants by ELISA. Data are expressed as mean \pm SD and are representative of 3 independent experiments.

in favor of a T helper type 1 immune response (42). The dramatically decreased secretion of IFN- α by TApDC associated with IL-10 T-cell response would have serious consequences on the induction of efficient antitumoral immune response and explain the deleterious impact of the presence of pDC into tumors. Therefore, tumors may deregulate immunity by attracting and manipulating pDC behaviour.

Our data also clearly show that malignant ascites could not serve as a model for tumor microenvironment in the context of ovarian cancer. Indeed, TApDC and ascite pDC from ovarian cancer patients have clearly distinct phenotype, functions, and impact on survival. Our observations are in agreement with the

work published by Zou and colleagues (14, 21) showing that pDC isolated from malignant ascites are functional in terms of IFN- α production. We further provide here novel information showing that the accumulation of pDC in ascites (up to 10-fold higher than in tumors) had no impact on patients' outcome whereas their presence in tumors was deleterious. Moreover, we showed that TApDC were strongly inhibited for their innate response. Thus, functional inhibition of TApDC is strictly dependent on ovarian tumor microenvironment.

In our study, we found that blood pDC and mDC were significantly decreased compared with HDs, consistent with prior studies in breast (13) and pancreatic cancer (18)

patients. This imbalance in the circulating pDC pool is not just exclusively a finding in cancers, but is also observed in patients with autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (43) and in chronic HIV infections (44, 45). Importantly, during primary HIV infection, numbers of blood pDC and levels of IFN- α production have been shown to be severely reduced, leading to speculation that HIV disease progression may result in part from the failure of pDC to limit viral replication (45–47). Upon initiation of effective antiretroviral therapy in HIV-infected individuals, the levels of pDC have been shown to partially recover (48, 49).

We reported in this work several similarities between ovarian cancer patients and HIV patients. Indeed, we observed severe reduction in blood pDC in patients with advanced stages ovarian cancer, similarly to HIV patients (44, 45, 50), in comparison with those with early stages, and to HDs. We have also shown severe alteration of IFN- α production in TApDC in comparison with HD blood pDC in response to TLR ligands. Similarly, to HIV patients undergoing antiretroviral therapy (48), levels of blood pDC partially recovered in patients undergoing chemotherapy or in CR whereas there was a trend toward decrease levels in patients with progressive disease. Taken together, these data suggest that the solid tumors exert systemic modulatory effects on the immune system, in addition to their effects in the tumor microenvironment. These similarities observed between HIV and ovarian cancer patients suggest similar mechanisms implicated in the disturbance of blood pDC homeostasis in both diseases.

To our knowledge, this work represents the first systematic comparison of pDC phenotype and function in blood, ascites,

and tumors from cancer patients. We showed that pDC's functional alterations occurred in tumors whereas they seem to have a proinflammatory role in malignant ascites. The correlation of TApDC with poor outcome confirms their participation in immune tolerance. Likewise, identifying molecular pathways implicated in the inhibition of IFN- α production by TApDC will help to develop targeted therapies reversing the deleterious role of TApDC in the context of ovarian cancer.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

The authors thank the ovarian cancer patients who consented to participate in this study and to the medical staff from Centre Leon Berard (CLB). We thank Dr. Philippe Gabelle from Clinique des Eaux-Clares, Grenoble, and Dr. Philippe Bouchard from Clinique des Cèdres, Grenoble, for their active participation in this translational research program. We also thank Dr. Philippe Cassier from CLB for his editorial assistance.

Grant Support

This work was supported by institutional grant from Comité départemental du Puy-de-Dôme de la Ligue nationale contre le cancer. S-I. Labidi-Galy is a recipient of a grant Soutien à la formation à la recherche translationnelle en cancérologie from Institut National du cancer (INCa), France.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received February 4, 2011; revised June 1, 2011; accepted June 15, 2011; published OnlineFirst June 22, 2011.

References

1. Society AC. Cancer facts & figures 2007. Atlanta: American Cancer Society;2007.
2. Chan JK, Zhang M, Hu JM, Shin JY, Osann K, Kapp DS. Racial disparities in surgical treatment and survival of epithelial ovarian cancer in United States. *J Surg Oncol* 2008;97:103–7.
3. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2000;165: 6037–46.
4. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Aleardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999;5:919–23.
5. Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, Nishiwaki T, Kitabatake M, Ueha S, et al. Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol* 2004;16:915–28.
6. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999;284:1835–7.
7. Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005;23: 275–306.
8. Kamath AT, Sheasby CE, Tough DF. Dendritic cells and NK cells stimulate bystander T cell activation in response to TLR agonists through secretion of IFN- α and IFN- γ . *J Immunol* 2005;174:767–76.
9. Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 2003;19:225–34.
10. Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, et al. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* 2006;7:652–62.
11. Goubier A, Dubois B, Gheit H, Joubert G, Villard-Truc F, Asselin-Paturel C, et al. Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* 2008;29:464–75.
12. de Heer HJ, Hammad H, Soullie T, Hijdra D, Vos N, Willart MA, et al. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med* 2004;200: 89–98.
13. Sisirak VGM, Renaudineau S, Menetrier-Caux C, Asporid C, Banchereau J, Palucka AK, et al. Breast carcinoma environment inhibits human plasmacytoid dendritic cells functions. In the 10th International Symposium on Dendritic Cells (Kobe, Japan). 2008.
14. Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, Borvak J, Nome F, Isaeva T, et al. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 2001;7:1339–46.
15. Vermi W, Bonecchi R, Facchetti F, Bianchi D, Sozzani S, Festa S, et al. Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J Pathol* 2003;200:255–68.
16. Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S, Wagner M, Wellisch D, Mack B, et al. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* 2003;63:6478–87.
17. Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, Guastalla JP, et al. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10: 7466–74.

18. Tjomsland V, Sandstrom P, Spangeus A, Messmer D, Emilsson J, Falkmer U, et al. Pancreatic adenocarcinoma exerts systemic effects on the peripheral blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells: an indicator of disease severity? *BMC Cancer* 10:87.
19. Wertel I, Polak G, Bednarek W, Barczynski B, Rolinski J, Kotarski J. Dendritic cell subsets in the peritoneal fluid and peripheral blood of women suffering from ovarian cancer. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;74:251–58.
20. Curiel TJ, Cheng P, Mottram P, Alvarez X, Moons L, Evdemon-Hogan M, et al. Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2004;64:5535–38.
21. Wei S, Kryczek I, Zou L, Daniel B, Cheng P, Mottram P, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8⁺ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2005;65:5020–6.
22. DR C. Regression model and lifer tables (with discussion). *JR Stat Soc* 1972;34:187–220.
23. Olweus J, BitMansour A, Warnke R, Thompson PA, Carballido J, Picker LJ, et al. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:12551–6.
24. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767–811.
25. du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer* 2009;115:1234–44.
26. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003;425:516–21.
27. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004;5:1219–26.
28. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;5:987–95.
29. Bekeredjian-Ding I, Schafer M, Hartmann E, Pries R, Parcina M, Schneider P, et al. Tumour-derived prostaglandin E and transforming growth factor-beta synergize to inhibit plasmacytoid dendritic cell-derived interferon-alpha. *Immunology* 2009;128:439–50.
30. Dolganiuc A, Chang S, Kodys K, Mandrekar P, Bakis G, Cormier M, et al. Hepatitis C virus (HCV) core protein-induced, monocyte-mediated mechanisms of reduced IFN-alpha and plasmacytoid dendritic cell loss in chronic HCV infection. *J Immunol* 2006;177:6758–68.
31. Palucka AK, Blanck JP, Bennett L, Pascual V, Banchereau J. Cross-regulation of TNF and IFN-alpha in autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:3372–7.
32. Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, et al. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001;31:2154–63.
33. Domschke C, Schuetz F, Ge Y, Seibel T, Falk C, Brors B, et al. Intratumoral cytokines and tumor cell biology determine spontaneous breast cancer-specific immune responses and their correlation to prognosis. *Cancer Res* 2009;69:8420–28.
34. Contractor N, Louten J, Kim L, Biron CA, Kelsall BL. Cutting edge: Peyer's patch plasmacytoid dendritic cells (pDCs) produce low levels of type I interferons: possible role for IL-10, TGFbeta, and prostaglandin E2 in conditioning a unique mucosal pDC phenotype. *J Immunol* 2007;179:2690–94.
35. Li L, Liu S, Zhang T, Pan W, Yang X, Cao X. Splenic stromal micro-environment negatively regulates virus-activated plasmacytoid dendritic cells through TGF-beta. *J Immunol* 2008;180:2951–56.
36. Epstein LB, Shen JT, Abele JS, Reese CC. Sensitivity of human ovarian carcinoma cells to interferon and other antitumor agents as assessed by an in vitro semi-solid agar technique. *Ann N Y Acad Sci* 1980;350:228–44.
37. Einhorn N, Cantell K, Einhorn S, Strander H. Human leukocyte interferon therapy for advanced ovarian carcinoma. *Am J Clin Oncol* 1982;5:167–72.
38. Berek JS, Markman M, Blessing JA, Kucera PR, Nelson BE, Anderson B, et al. Intraperitoneal alpha-interferon alternating with cisplatin in residual ovarian carcinoma: a phase II Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 1999;74:48–52.
39. Berek JS, Markman M, Stonebraker B, Lentz SS, Adelson MD, DeGeest K, et al. Intraperitoneal interferon-alpha in residual ovarian carcinoma: a phase II gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol* 1999;75:10–14.
40. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006;6:836–48.
41. Moserle L, Indraccolo S, Ghisi M, Frasson C, Fortunato E, Canevari S, et al. The side population of ovarian cancer cells is a primary target of IFN-alpha antitumor effects. *Cancer Res* 2008;68:5658–68.
42. Biron CA. Interferons alpha and beta as immune regulators—a new look. *Immunity* 2001;14:661–4.
43. Robak E, Smolewski P, Wozniacka A, Sysa-Jedrzejowska A, Robak T. Clinical significance of circulating dendritic cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Mediators Inflamm* 2004;13:171–80.
44. Pacanowski J, Kahi S, Baillet M, Lebon P, Deveau C, Goujard C, et al. Reduced blood CD123⁺ (lymphoid) and CD11c⁺ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood* 2001;98:3016–21.
45. Soumelis V, Scott I, Gheyas F, Bouhour D, Cozon G, Cotte L, et al. Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 2001;98:906–12.
46. Barron MA, Blyveis N, Palmer BE, MaWhinney S, Wilson CC. Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *J Infect Dis* 2003;187:26–37.
47. Donaghy H, Pozniak A, Gazzard B, Qazi N, Gilmour J, Gotch F, et al. Loss of blood CD11c⁺ myeloid and CD11c⁻ plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* 2001;98:2574–76.
48. Killian MS, Fujimura SH, Hecht FM, Levy JA. Similar changes in plasmacytoid dendritic cell and CD4 T-cell counts during primary HIV-1 infection and treatment. *Aids* 2006;20:1247–52.
49. Schmidt B, Fujimura SH, Martin JN, Levy JA. Variations in plasmacytoid dendritic cell (PDC) and myeloid dendritic cell (MDC) levels in HIV-infected subjects on and off antiretroviral therapy. *J Clin Immunol* 2006;26:55–64.
50. Feldman S, Stein D, Amrute S, Denny T, Garcia Z, Kloser P, et al. Decreased interferon-alpha production in HIV-infected patients correlates with numerical and functional deficiencies in circulating type 2 dendritic cell precursors. *Clin Immunol* 2001;101:201–10.

Supplementary figures

- **Figure S1. Identification of pDC and mDC in blood, ascites, and tumors.** A single-cell suspension of freshly resected tumor, malignant ascites, and blood of patients with OC was prepared. (A) pDC were identified as CD4+BDCA2+CD123+ cells. Numbers indicate the frequency of pDC (percentage) among total mononuclear cells of blood, tumor, and ascite single-cell suspensions. Representative FACS analysis showed a higher percentage of pDC in ascite compared to patient blood and tumor. (B) mDC were identified as Lineage-CD4+CD11c+ cells in the same samples as in (A).
- **Figure S2. TApDC were inhibited for their production of TNF- α , IL-6, MIP-1 β , and RANTES in response to TLR ligands.** FACS-sorted TApDC and ascite pDC were cultured with inactivated flu virus (100 HAU/ml) and CpG-A (5 mg/ml) for 24 h. Levels of (A) TNF- α , IL-6, MIP-1 β , and RANTES and of (B) IP-10 and IL-8 were determined in culture supernatants by multiplex quantification. Data are from 6 different OC patients. Results are compared using Mann-Whitney test. + : extremes; O : outlier. * :< 0.05.
- **Figure S3. TUMSN are more efficient than ASCSN to inhibit IFN- α production by TLR-activated pDC.** Supernatants of single-cell suspensions from ovarian tumors (TUMSN) and ascites (ASCSN) were collected after 48 h and frozen. Purified blood pDC from healthy donors were cultured with 20 ng/ml IL-3 in the presence or not of 25% TUMSN or ASCSN derived from five different OC patients for 16 h before CpG-A (5 mg/ml) was added for another 24 h. After 40 h, IFN- α production was measured by ELISA. Data are expressed as mean \pm SD of 4 to 7 independent experiments.
- **Figure S4. Ovarian tumor supernatants contain active TGF- β , IL-10, and TNF- α .** Active TGF- β 1, IL-10, and TNF- α were measured by ELISA in ovarian tumor (TUMSN) and ascite supernatants (ASCSN) from 7 different patients. TNF- α levels were significantly higher in TUMSN than ASCSN. Results are compared using Mann-Whitney test . * :< 0.05.

Figure S1

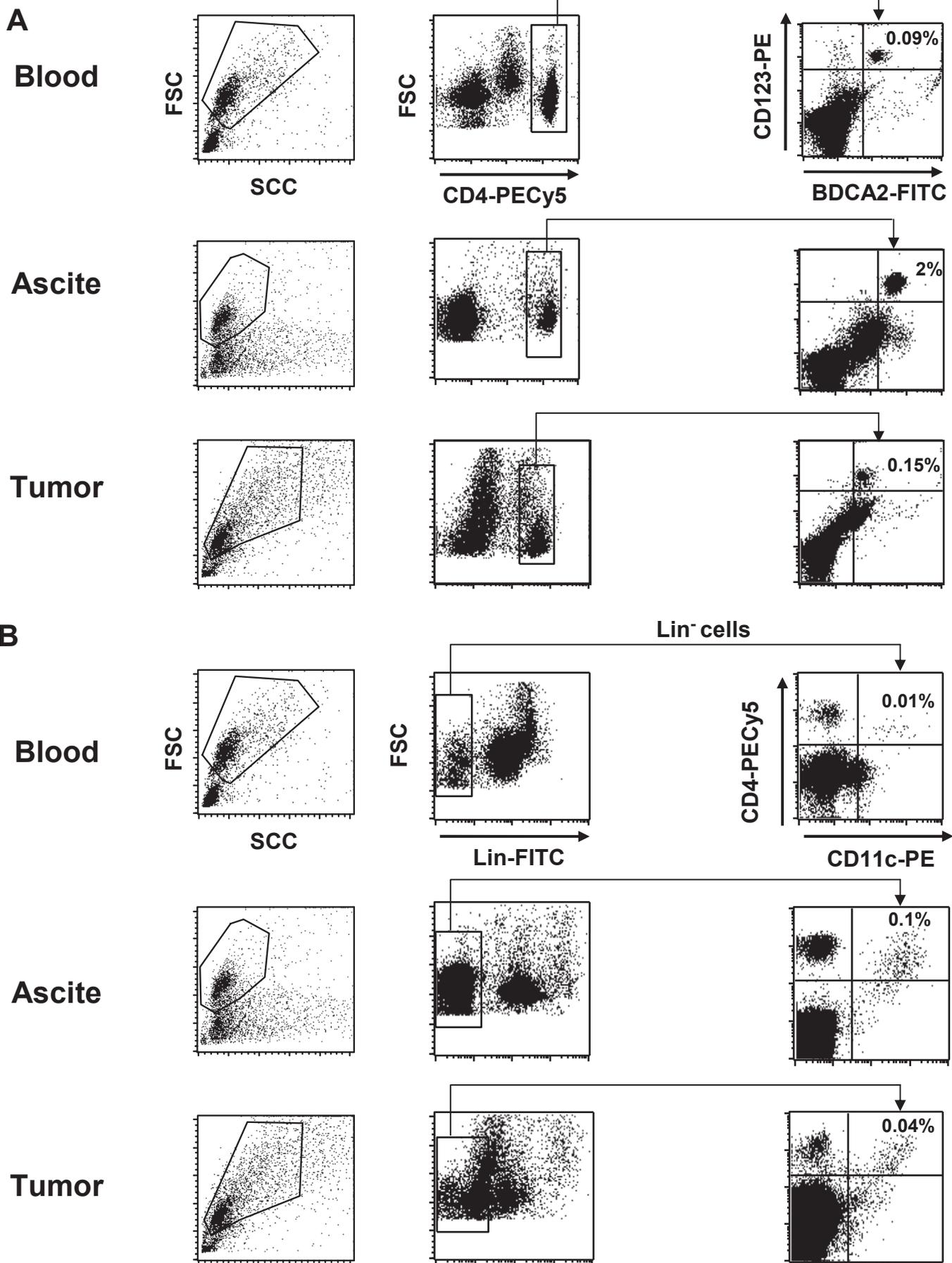


Figure S2

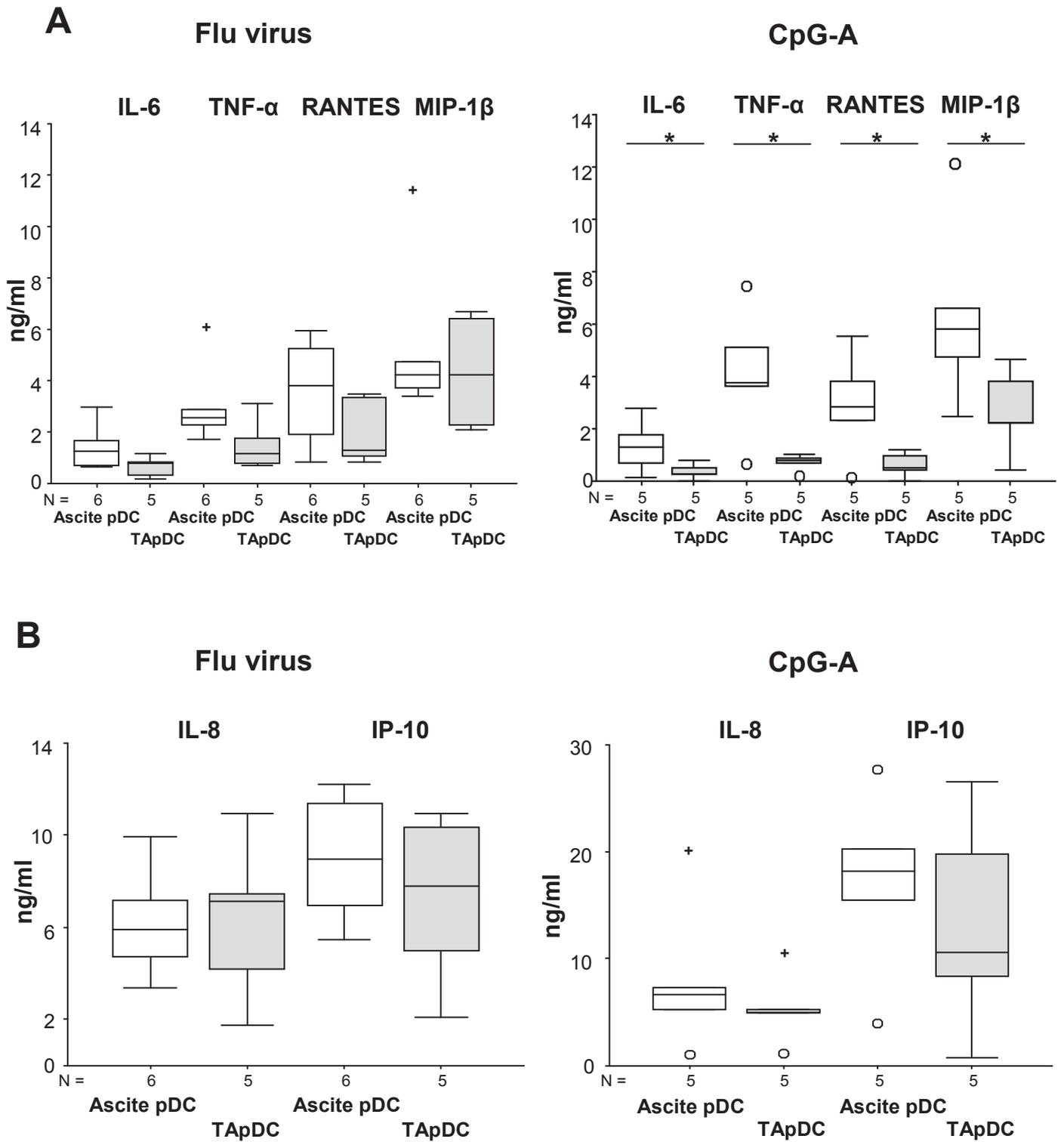


Figure S3

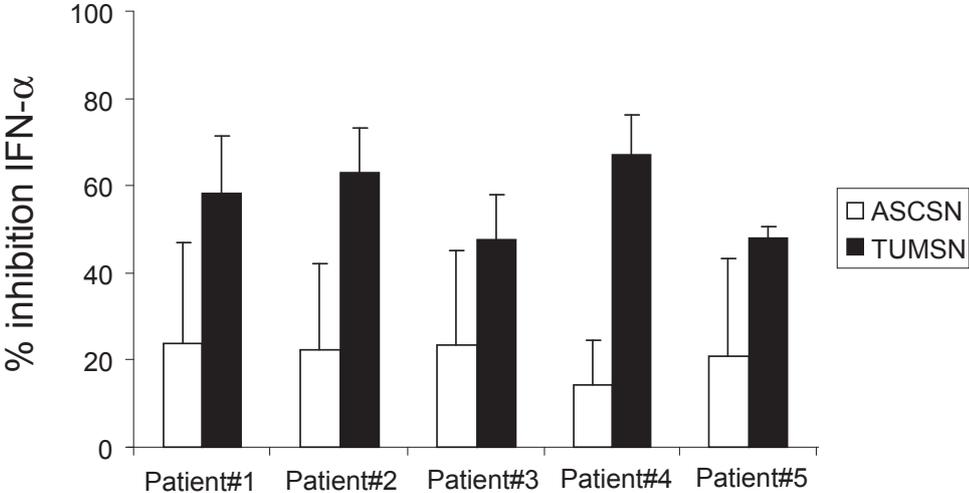
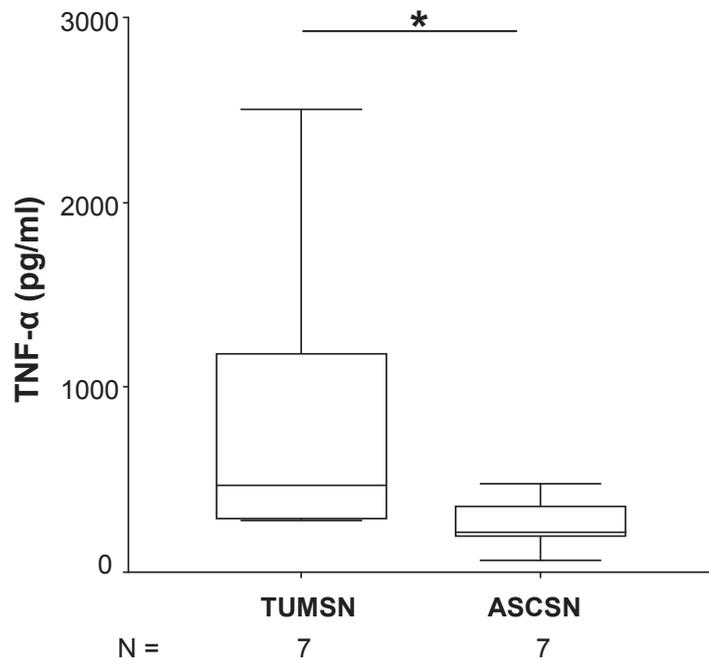
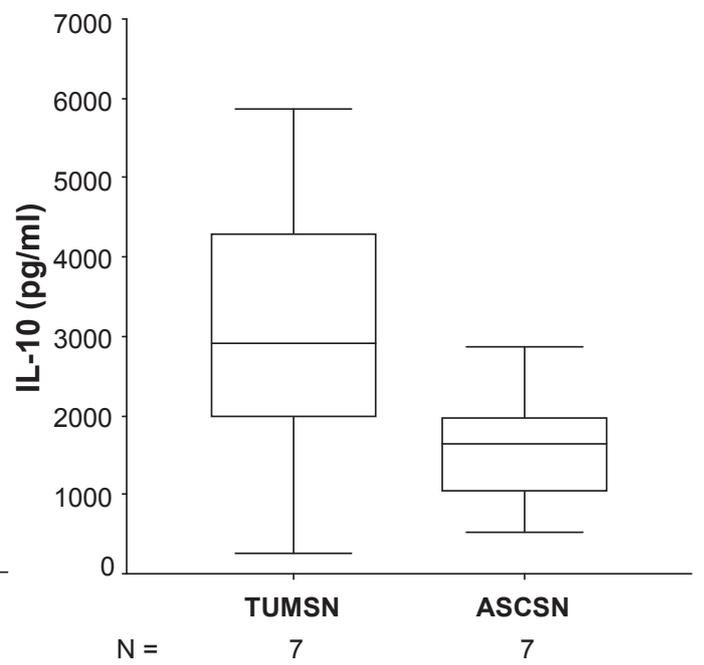


Figure S4

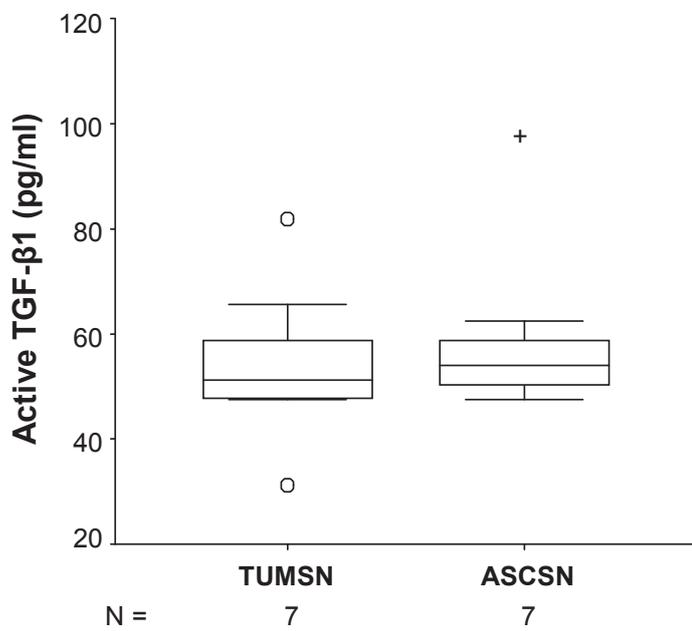
A



B



C



Supplementary tables

- **Table S1. Patient characteristics**
- **Table S2. Univariate and multivariate analysis of prognostic factors associated with progression-free survival.** PFS=Progression-free survival, NC= Not Computed (no events occurred in the I-II subgroup), HR=Hazard Ratio, CI= Confidence Index. R Reference item, * = Not computed (no events occurred in the I-II subgroup), **= No value

Table S1

Characteristics	N	%
Number of evaluable patients	44	
Age, years		
Median	67	
Range	26-90	
Stage		
I-II	5	11.4
III-IV	39	88.6
Grade		
1-2	4	13.8
3	25	86.2
Unknown	15	
Histological type		
Papillary serous	33	75
Endometrioid	3	7
Mucinous	1	3
Others	7	16
Estrogen Receptor		
Yes	21	70
No	9	30
Unknown	14	
Progesterone Receptor		
Yes	9	30
No	21	70
Unknown	14	
HER-2		
Yes	0	0
No	23	100
Unknown	21	
Involved nodes		
Yes	14	56
No	11	44
Unknown	19	
Debulking surgery		
Yes	25	57
No	19	45
Residual tumor		
Yes	34	78
No	10	22
Progression		
Yes	24	55
No	20	45

Table S2

Explanatory variables	n	Median PFS (months)	UNIVARIATE			MULTIVARIATE		
			HR	95% CI	<i>p</i>	HR	95% CI	<i>p</i>
Age (years)								
≤65 ^R	17	18.4						
>65	27	10.2	2.10	1.89 - 4.95	0.09	0.72	0.17 – 3.01	0.65
PS								
0-1 ^R	29	14.2						
>1	12	9.7	1.86	0.76 - 4.55	0.17	1.57	0.32 – 7.65	0.58
Debulking surgery								
Yes ^R	25	17.9						
No	19	7.2	3.18	1.41 - 7.18	0.005	3.70	1.02 - 13.39	0.046
Stage								
I-II ^R	5	NC*						
III-IV	39	12.4	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Residual tumor								
Absent ^R	10	18.4						
Present	34	10.8	4.0	1.18 - 13.53	0.03	1.73	0.33 – 8.96	0.51
Tumor pDC								
<0.1 ^R	20	18.4						
≥0.1	12	9.7	2.99	1.20 - 7.50	0.02	7.13	2.02 - 25.11	0.002
Ascite pDC								
<1 ^R	23	10.8						
≥1	12	13.6	0.94	0.38 - 2.34	0.89	**	**	**
Tumor mDC								
<0.02 ^R	18	14.1						
≥0.02	12	17.8	0.64	0.23 - 1.77	0.39	**	**	**
Ascite mDC								
<0.13 ^R	21	13.6						
≥0.13	11	**	0.38	0.13 - 1.16	0.09	**	**	**

Résultats complémentaires de l'article 1

Les pDC du sang corrént avec les mDC et les lymphocytes T CD4⁺

Dans l'Article 1, nous avons rapporté une déplétion profonde du taux de pDC circulantes, comme chez les patients séropositifs (HIV)(Soumelis et al., 2001). Nous avons exploré si cette altération de l'homéostasie des pDC corréle avec celles d'autres populations immunes notamment les lymphocytes T CD3⁺CD4⁺ et les mDC. Nous avons observé, en plus de la déplétion des mDC (Article 1), une déplétion profonde des lymphocytes T CD4⁺ qui représentent 10.94% des PBMC comparés à 30.21% chez les donneurs sains ($p < 10^{-3}$). Nous avons trouvé une corrélation positive et significative entre les taux de pDC et mDC ($r^2=0.35$, $p=0.029$) ainsi qu'entre les pDC et les lymphocytes T CD4⁺ ($r^2=0.296$, $p=0.041$)(Figure C1) dans le sang des patientes suggérant des mécanismes communs pour la déplétion de ces cellules immunes. Dans les ascites, nous n'avons pas observé de corrélation significative entre les pDC et les mDC ($r^2=0.173$, $p=0.322$) ni entre les pDC et les lymphocytes T CD4⁺ T ($r^2=0.154$, $p=0.356$). Enfin dans les tumeurs, il n'y avait pas de corrélation significative entre les mDC et les pDC ($r^2=0.294$, $p=0.103$) alors que les pDC et les lymphocytes T CD4⁺ corrélaient de façon importante et significative ($r^2=0.665$, $p < 10^{-3}$) suggérant une migration parallèle des lymphocytes CD4⁺ et des pDC dans les tumeurs où elles interagiraient.

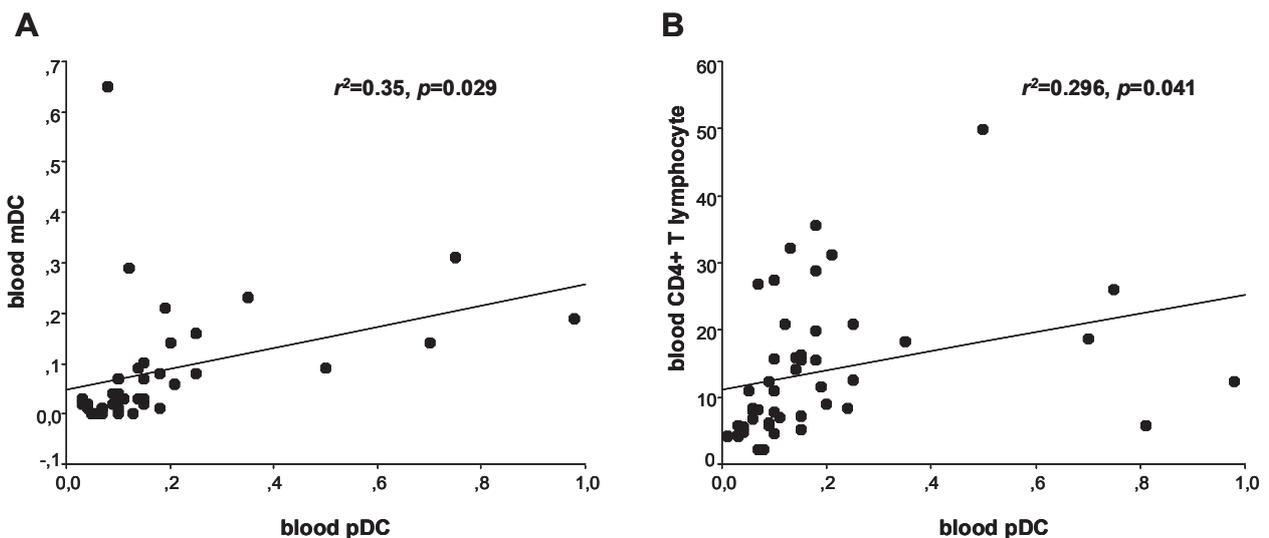


Figure C1 : Corrélation entre les taux de pDC dans le sang des patientes et autres cellules immunes. (A) Corrélation entre les pDC et les mDC, n=39 (B) Corrélation entre les pDC et les lymphocytes T CD4⁺, n=48. Corrélation selon le test de Spearman.

Les pDC du sang des patientes sont partiellement apoptotiques

Nous avons observé une profonde déplétion des pDC du sang des patientes alors qu'elles s'accumulent dans les ascites (Article 1). Nous avons voulu explorer si c'est la conséquence de leur migration du sang vers les ascites ou les tumeurs. Nous n'avons pas observé de corrélation entre les taux de pDC du sang et des ascites ($r^2=0.015$, $p=0.929$) alors que, et de façon surprenante, il y avait une corrélation positive et significative entre les taux des pDC du sang et des tumeurs ($r^2=0.455$, $p=0.008$; Figure C2). A noter également qu'il n'y a pas de corrélation entre les taux de TApDC et ascite pDC ($r^2=-0.085$, $p=0.643$) confirmant que l'ascite n'est pas le reflet de la tumeur.

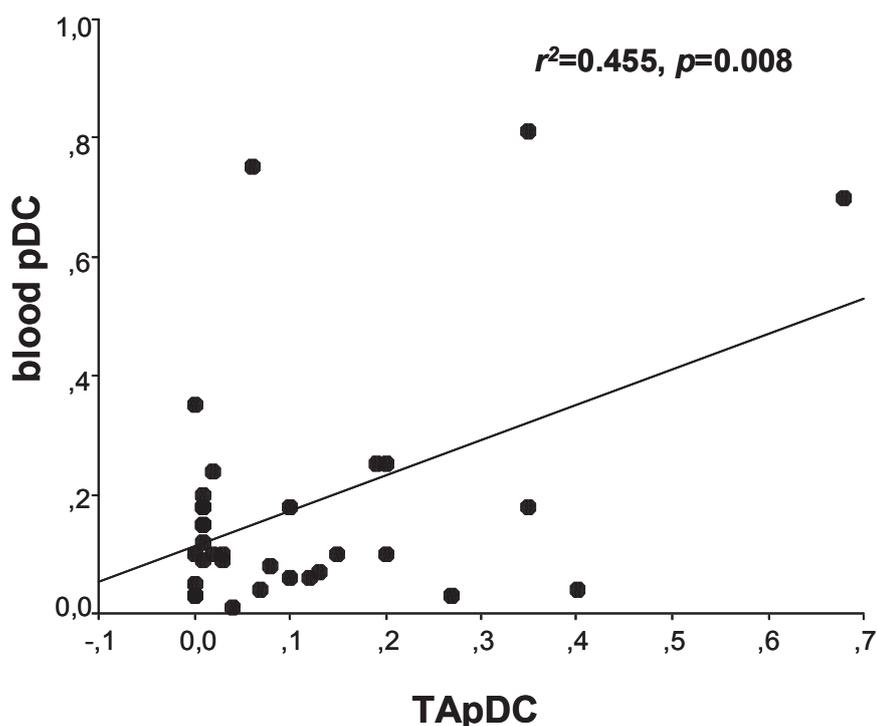


Figure C2 : Corrélation entre le taux de pDC associées aux tumeurs (TApDC) et les pDC du sang. n=33, corrélation selon le test de Spearman.

La déplétion des pDC dans le sang des patientes pourrait s'expliquer par une augmentation de l'apoptose, mécanisme décrit dans le cancer du pancréas (Tjomsland et al.) et chez les patients infectés par le HIV (Meyers et al., 2007). Nous avons analysé de façon comparative par cytométrie en flux l'incorporation de l'Annexine-PE par les pDC du sang, de l'ascite et de la

tumeur identifiées comme étant des cellules $CD4^+BDCA2^+$. Nos résultats préliminaires (n=2) montrent une augmentation importante de l'apoptose dans les pDC du sang des patientes par rapport à celles des donneurs sains, contrairement aux pDC des ascites et des tumeurs (Figure C3).

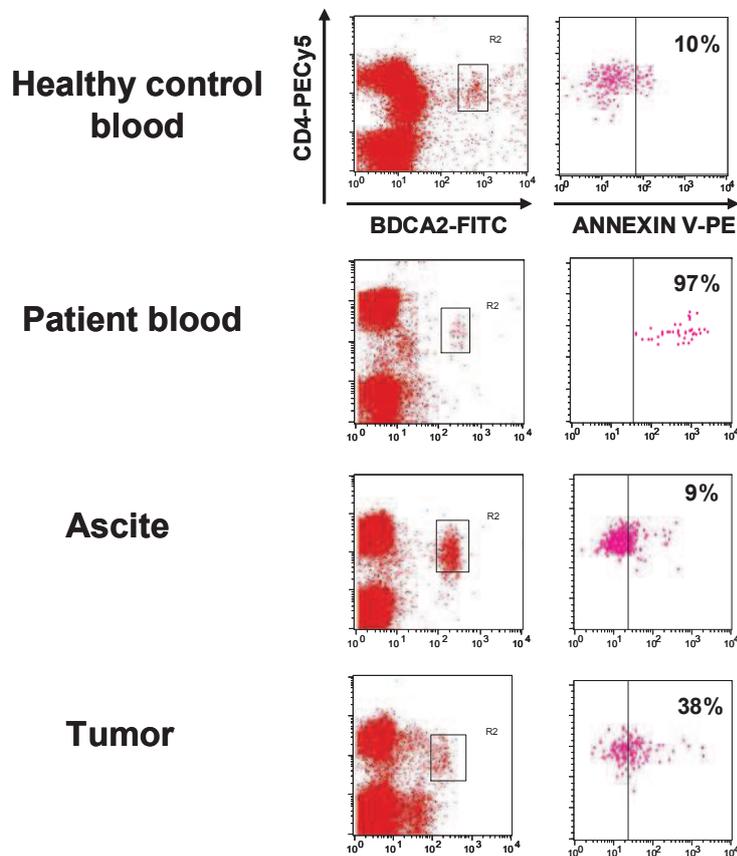


Figure C3 : Augmentation de l'apoptose dans les pDC du sang des patientes. Analyse comparative par cytométrie en flux de l'incorporation de l'Annexine V (PE) par les pDC $CD4^+$ (PE-Cy5) $BDCA2^+$ (FITC) du sang d'un donneur sain, et du sang, ascite et tumeur d'une même patiente atteinte de CO.

La présence de pDC $BDCA2^+$ dans le stroma tumoral est un facteur de mauvais pronostic

Nous avons montré dans l'Article 1 que l'accumulation des TApDC identifiées comme étant des cellules $CD4^+BDCA2^+CD123^+$ par cytométrie en flux était un facteur indépendant associé à une survie sans progression (SSP) plus courte dans une étude prospective réalisée à partir de tumeurs fraîches (n=33). Nous avons voulu confirmer ces résultats sur une plus grande série de patientes (n=98) opérées pour un carcinome épithélial de l'ovaire entre 1997 et 2009 au

Center Léon Bérard pour lesquelles des biopsies tumorales étaient stockées dans la tumorotheque. Les pDC ont été identifiées en immunohistochimie (IHC) par l'expression de BDCA2 (clone 104C12, Dendritics, 10µg/ml) grâce à la technique *Tissue micro-array* (TMA) sur des coupes de tissu tumoral fixé au formol dans des blocs de paraffine. L'un des avantages de l'étude en IHC est d'analyser la localisation des pDC par rapport aux cellules tumorales. Ainsi, nous avons procédé à une double étude des pDC à la fois dans le stroma tumoral et dans les infiltrats lymphoïdes péri-tumoraux. Les pDC ont été énumérées de façon semi-quantitative sur 10 champs au fort grossissement (x200) et classées en 3 grades i) 0 correspond à l'absence de pDC, ii) 1 correspond à la présence de moins de 5 cellules, et iii) 2 correspond à la présence de plus de 5 cellules BDCA2⁺.

L'étude des pDC dans le stroma tumoral montre que seulement 18/97 tumeurs (18%) sont infiltrées par les pDC dont une majorité 13/18 (73%) de grade 1 et 5/13 de grade 2 (27%). La quasi-totalité (17/18 soit 94%) des tumeurs infiltrées par les pDC ont été diagnostiquées à un stade tardif (III/IV). La présence de TApDC (grades1+2) dans le stroma tumoral est associée à une SSP significativement plus courte estimée à 13.7 mois comparée à 25 mois en l'absence de TApDC (grade 0) ($p=0.01$; Figure C4A). La survie globale (SG) est également plus courte avec une médiane estimée à 30 mois en présence de TApDC (grades1+2) comparée à 67 mois en l'absence de TApDC (grade 0) mais la différence est non significative ($p=0.1$, Figure C4B).

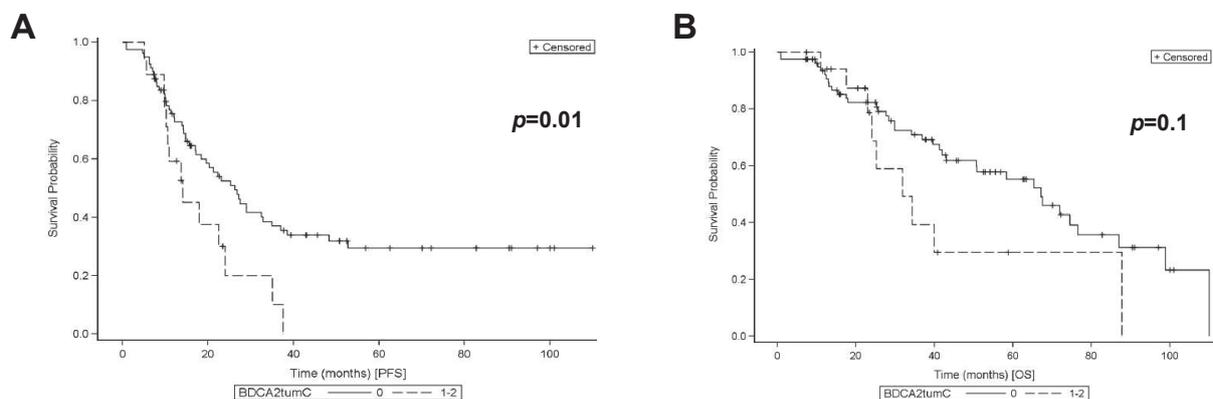


Figure C4: Survie sans progression et survie globale des patientes en fonction de la présence des pDC dans le stroma tumoral. (A) et (B) Survie sans progression (SSP) et survie globale (SG) en fonction de la présence de cellules BDCA2⁺ en immunohistochimie (IHC) dans le stroma tumoral.

En revanche, la présence de TApDC dans l'infiltrat lymphoïde péri-tumoral n'a pas d'impact ni sur la SSP ni sur la SG (Figures C5A et C5B).

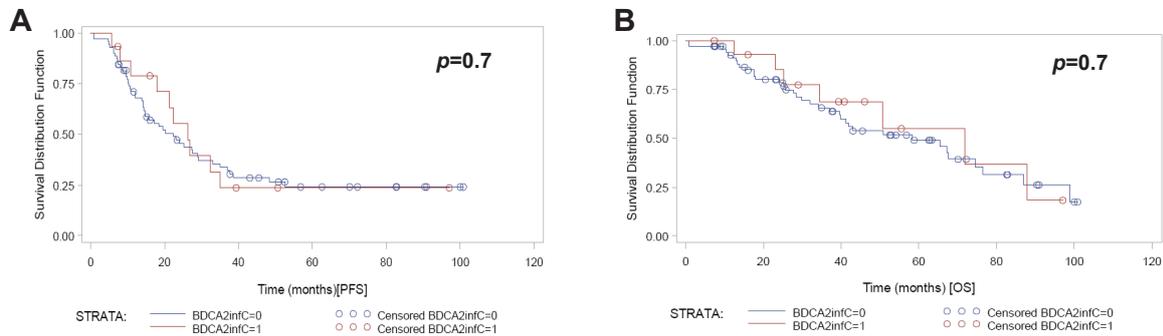


Figure C5: Survie sans progression et survie globale des patientes en fonction de la présence des pDC dans l'infiltrat lymphoïde peritumoral. (A) et (B) Survie sans progression (SSP) et survie globale (SG) en fonction de la présence de cellules BDCA2⁺ en immunohistochimie (IHC) dans l'infiltrat lymphoïde peritumoral.

Meyers, J. H., Justement, J. S., Hallahan, C. W., Blair, E. T., Sun, Y. A., O'Shea, M. A., Roby, G., Kottlil, S., Moir, S., Kovacs, C. M., *et al.* (2007). Impact of HIV on cell survival and antiviral activity of plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* 2, e458.

Soumelis, V., Scott, I., Gheyas, F., Bouhour, D., Cozon, G., Cotte, L., Huang, L., Levy, J. A., and Liu, Y. J. (2001). Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 98, 906-912.

Tjomsland, V., Sandstrom, P., Spangeus, A., Messmer, D., Emilsson, J., Falkmer, U., Falkmer, S., Magnusson, K. E., Borch, K., and Larsson, M. Pancreatic adenocarcinoma exerts systemic effects on the peripheral blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells: an indicator of disease severity? *BMC Cancer* 10, 87.

Article 2: High infiltration of regulatory T cells is associated with better outcome in ovarian cancer

Authors

Sana Intidhar Labidi-Galy, Michael Gobert, Isabelle Treilleux, Vanja Sisirak, Pierre Meeus, Jean-Damien Combes, Julien Faget, Olivier Tredan, Isabelle Durand, Christine Ménétrier-Caux, Christophe Caux, Jean-Yves Blay, Isabelle Ray-Coquard and Nathalie Bendriss-Vermare.

En préparation

Problématique

Contexte scientifique. Les lymphocytes T régulateurs (Treg) constituent une sous-population de lymphocytes T CD4⁺ qui joue un rôle clé dans le maintien de la tolérance vis-à-vis des antigènes du soi et interviennent dans diverses pathologies auto-immunes, la tolérance materno-fœtale et l'immunité antitumorale. Les Treg ont été largement étudiés en cancérologie (1), en particulier dans le cancer de l'ovaire avec au moins 8 études publiées à ce jour rapportant des résultats contradictoires (2-9) concernant l'impact de l'accumulation de Treg associés aux tumeurs (TATreg) sur la survie des patientes. En revanche, à notre connaissance, une seule de ces études a analysé le phénotype et la fonction des TATreg dans le CO (2).

Résultats. Dans ce travail, nous avons comparé de façon systématique la fréquence, le phénotype, la fonction et l'impact sur le pronostic des patientes des Treg dans les ascites néoplasiques et les cancers épithéliaux de l'ovaire. Nous avons observé une accumulation des Treg dans les ascites et les tumeurs alors que leur taux dans le sang est comparable à celui de donneurs sains. Les TATreg expriment un phénotype plus activé par rapport aux Treg d'ascite avec une augmentation de l'expression de GITR, HLA-DR, CD69 et ICOS.

Les TATreg ainsi que les Treg d'ascite sont fonctionnellement suppresseurs, c'est-à-dire qu'ils sont capables d'inhiber la prolifération des TATconv autologues. Par contre, les TATconv prolifèrent moins que les Tconv d'ascite après stimulation du TCR. De façon intéressante, en plus d'IFN- γ , les TATreg inhibent la production d'IL-10 par les TATconv, ce que nous n'avions pas observé dans le cancer du sein (10). Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Curiel et al (2) qui ont montré que les TATreg n'inhibaient pas la production d'IL-10 par les TATconv. Cependant, les auteurs de cette étude ont utilisé pour l'analyse de la production de cytokines uniquement des Tconv d'ascite et des Treg d'ascite, considérant que l'ascite est le reflet de la tumeur alors que nous venons de montrer que les TATconv et les Tconv d'ascite n'ont pas le même phénotype ni la même capacité de répondre à une stimulation du TCR.

Nous avons étudié par la suite la signification clinique de l'accumulation des Treg dans les tumeurs. Nous avons trouvé que les patientes dont les tumeurs étaient hautement infiltrées par les Treg CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ (plus haut tertile) avaient une survie sans progression (SSP) significativement plus longue et il s'agit d'un facteur pronostique indépendant. La présence de Treg dans le microenvironnement tumoral semble ainsi protectrice alors que leur accumulation dans les ascites n'a pas d'impact sur la SSP. Il s'agit de la quatrième étude montrant un effet bénéfique des TATreg dans le cancer de l'ovaire, et c'est la deuxième étude(6) qui a identifié les Treg par cytométrie en flux dans des tumeurs fraîches. L'avantage de cette méthode est qu'on peut comparer le sang, l'ascite et la tumeur d'une même patiente alors que l'immunohistochimie (IHC) ne peut-être réalisée que sur les tumeurs.

Nous nous sommes également intéressés à la réponse immune après chimiothérapie néoadjuvante. Nous avons analysé de façon séquentielle, au diagnostic et au moment de la chirurgie d'intervalle (après 3 à 4 cycles de CARBOPLATINE-PACLITAXEL) l'infiltration de 18 tumeurs par les Treg Foxp3⁺ en IHC. Nous avons observé 3 types de réponses immunes chez les patientes : i) une augmentation des TATreg (n=7), ii) pas de changement (n=4) et iii) une diminution des TATreg (n=7). De façon intéressante, les patientes dont les tumeurs ont augmenté leur infiltration par les TATreg Foxp3⁺ après chimiothérapie ont une SSP plus longue comparées aux autres. Ces observations suggèrent que la chimiothérapie, en plus d'un effet antitumoral direct, induit une réponse immune, qui peut-être bénéfique ou délétère pour le patient.

Brief report

Title

High infiltration of regulatory T cells is associated with better outcome in ovarian cancer

Authors

Sana Intidhar Labidi-Galy^{1,2}, Michael Gobert², Isabelle Treilleux^{2,3}, Vanja Sisirak², Pierre Meeus⁴, Jean-Damien Combes⁵, Julien Faget², Olivier Tredan^{1,2}, Isabelle Durand², Christine Ménétrier-Caux², Christophe Caux², Jean-Yves Blay^{1,2}, Isabelle Ray-Coquard¹, and Nathalie Bendriss-Vermare²

Affiliation

¹Department of medical oncology, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec Lyon, 69008, France

² Université Lyon 1, ISPB, F-69008 Lyon, France ; INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69008 Lyon, France ; Centre Léon Bérard, F-69008 Lyon, France

³Department of pathology, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec Lyon, 69008, France

⁴Department of surgery, Centre Léon Bérard Lyon France, 28 rue Laennec Lyon, 69008, France

⁵ Department of biostatistics, Centre Leon Bérard, 28 rue Laennec Lyon, 69008, France

Running title

Treg and ovarian cancer

Key-words

Regulatory T cell, ovarian cancer, immune response, progression-free survival

Corresponding author

Nathalie BENDRISS-VERMARE

E-mail: bendris@lyon.fnclcc.fr

Address: INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, 69373 Lyon cedex 08, France;

Tel : (33) 4 78 78 27 50;

Fax : (33) 4 78 78 27 20;

Paper length

Words: 2,389

Six figures and one table.

Abstract

In ovarian cancer (OC), T lymphocytes interact with tumors to eradicate established tumors. In this study, we investigated the contribution of regulatory T cells (Treg) in the establishment of immune response in a cohort of 44 ovarian cancer patients. $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Treg accumulate in the tumors and malignant ascites. In tumors, Tumor-Associated Treg (TATreg) express an activated phenotype, are suppressive and inhibit the production of IL-10 by TA $CD4^+CD25^-$ conventional T cells. . Importantly, the accumulation of TATreg in primary OC was an independent prognostic factor associated with longer progression-free survival (PFS) whereas ascite Treg have no impact. Following neoadjuvant chemotherapy, patients who increased TATreg levels had a significant longer PFS compared to those who decreased or did not change TATreg numbers, suggesting that antitumor effect of chemotherapy is partially mediated by an immunologic effect. Collectively, our findings suggest that Treg have a protective effect in human ovarian tumor microenvironment.

Words: 149

Introduction

Ovarian cancer (OC) represents a devastating disease that affects more than 190,000 women worldwide each year (International Agency for Research on Cancer). It is the fifth most common overall cause of cancer death among women (1). Most women (~75%) present with advanced stage disease, for which the 5 year survival rate is a dismal 30% or less, and has not changed over 3 decades (2). Nonetheless it offers many advantages to those interested in tumor immunity, including abundant and clinically significant tumor-infiltrating T cells (3) and the ability to obtain serial blood, ascites, and tumor specimens for immunological monitoring.

Regulatory T cells (Treg) constitute 5-10% of peripheral CD4⁺ T cells in humans (4). Treg have been extensively studied in human cancers (review in (5)), in particular in OC (6). Treg within ovarian tumor microenvironment expressed Foxp3, inhibited Tumor-Associated antigens (TAA)-specific CD8⁺ T cells cytotoxicity, and contributed to tumor growth *in vivo* in human severe combined immunodeficiency (SCID) chimeric model (7). Notably, Treg cells isolated from peripheral blood, ascites or solid tumors of patients with OC equally suppressed ascite T-cell activation *in vitro* (7). Therefore, Treg cells within the tumor microenvironment seem to be not functionally superior to their counterparts in blood. All these information's were derived from tumors or ascites specimens obtained at primary surgery, and we know very little about subsequent immunological changes that occur during treatment, remission, and recurrence.

The clinical impact of the presence of Treg within OC is controversial, with some studies showing a deleterious effect (7, 8), others showing a benefit (9-11) and a third group with no impact (12, 13).

In this study we analyzed the phenotype, function, clinical impact of accumulation of Treg in blood, ascites, and tumors on OC patient's outcome. Furthermore, we compared tumor

infiltration by Treg in patients at diagnosis and after neoadjuvant chemotherapy (interval surgery). Our results bring new insights on the interactions between host immunity and tumors.

Materials and Methods

Patients

We prospectively studied 44 untreated patients with International Federation of Gynaecology and Obstetrics (FIGO) stage I, II, III, and IV epithelial ovarian cancers. All patients gave written, informed consent. The study was approved by local institutional review boards. Biological samples were collected at CLB and other institutions in Rhône-Alpes Region, France.

Preparation of tumors and ascites cell suspensions

We collected fresh solid tumors and malignant ascites aseptically. Cells were harvested from ascites by centrifugation over a Ficoll-Hypaque density gradient. Ovarian tumors samples were minced into small pieces in serum free RPMI medium and digested with collagenase Ia (1 $\mu\text{g/ml}$) and DNase I (50 KU/ml) (Sigma Aldrich) for one hour at 37°C with gentle agitation. The resulting cell suspensions were filtered, washed, and resuspended in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10 % FCS (Lonza) and antibiotics (complete RPMI) before isolation of mononuclear cells (MNC) by centrifugation over a Ficoll-Hypaque density gradient for further analyses.

Peripheral blood mononuclear cells

Peripheral blood was collected aseptically from OC patients (n=37) and healthy donors (n=26) in a CTAD-coated tube. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained over a Ficoll-Hypaque density gradient, washed twice, and resuspended in phosphate-buffered saline containing 2% FCS (Lonza) and 0.5 mM EDTA for flow cytometry analysis.

Treg and conventional T cell purification

CD4⁺CD25⁻ conventional T cell (Tconv) and CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Treg cells were purified from patients' primary tumors or ascites using a cell sorter (FACSVantage SETM flow cytometer, BD Biosciences). Purity was routinely >97%.

Flow cytometry analysis

Triple staining by flow cytometry was performed on a FACScan (BD Biosciences) using monoclonal antibodies or isotype-matched controls. Intracellular Foxp3 (using either PHC101 or 259D Foxp3 clones) staining was achieved in specific Foxp3 Staining Buffer Set, according to the supplier's protocol. Treg were identified as CD4⁺Foxp3⁺ cells. The phenotypes of CD4⁺Foxp3⁺ Treg and CD4⁺Foxp3⁻ Tconv were analyzed with PE-coupled anti-ICOS (e-Bioscience), -GITR (Beckman Coulter), -HLA-DR (BD), and -CD69 (BD) monoclonal antibodies. We analyzed 20,000 events/condition on the total cell population using CellQuest Pro software (BD Biosciences) and 5,000 on purified cells.

Immunosuppression assay

Purified Treg or Tconv cells (2.5×10^4 cells/well) were cultured in triplicate with anti-CD3/CD28 coated-beads (Invitrogen) (one bead for 10 T cells) in 96-well round-bottom plates in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, glutamine, and antibiotics. 2.5×10^4 Tconv cells were co-cultured in triplicate with autologous purified Treg, at a ratio of 1:1, 5:1 or 10:1. [³H]Thymidine (Amersham) was added on day 4 for 18 hours (0.5 μCi/well), and then cells were harvested and counted in a Betaplate scintillation counter (Perkin Elmer).

Quantification of cytokines by Elisa

Cytokines (IFN-γ and IL-10) (Bender Medsystems, Tebu-Bio, France) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Detection thresholds were respectively 7.6 pg/ml and 3.1 pg/ml.

Immunohistochemical labeling.

Immunohistochemistry used monoclonal antibody against Foxp3 (Abcam). Foxp3⁺ cells were enumerated using the ARIOL system (Applied Imaging, Newcastle, UK). The number of Foxp3⁺ Treg was quantified in whole-tissue section of 18 tumor samples at diagnosis and after neoadjuvant chemotherapy using a semiquantitative scoring of lymphocytic infiltration. We

assessed at least 10 fields at high-power magnification (x200): grade 0 corresponds to the absence of Foxp3⁺ cells; grade 1 corresponds to the presence of 1 to 5 Foxp3⁺ cells; grade 2 corresponds to the presence of more than 5 Foxp3⁺ cells. For all these labels, the levels of lymphocytic infiltration were evaluated by two independent pathologists.

Statistical analysis

Comparison of independent samples was done by the student's *t* test or non-parametric tests when appropriate. Correlation analysis of the data was performed using the Spearman test. The following clinical variables were collected prospectively: age, Performance Status (PS), stage, debulking surgery, and the presence of macroscopic residual disease. Treg levels in blood, tumors and ascites were categorized in upper tertile and lower two tertiles.

Progression-free survival (PFS) was defined as the time from pathologic diagnosis to progression. PFS was calculated using Kaplan-Meier method. To evaluate the relationship between survival and biological and/or clinical factors, all potential prognostic factors were included in univariate Cox proportional hazard regression models (14). Candidate prognostic factors with a 0.1 level of significance in univariate analysis were then selected for inclusion in the multivariate analysis. Independent prognostic variables of PFS were identified by a Cox regression analysis using a backward selection procedure to adjust the time cohort effect on patient's characteristics. Univariate association between Foxp3⁺ evolution (increased compared to decreased+no change) and PFS was assessed using Breslow test. All statistical analyses were performed using SAS software v.9.2 for Microsoft Windows (SAS Institute, Cary, NC). All P values for two-tailed tests were considered significant when $P < 0.05$.

Results

CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} regulatory T cells accumulate in ascites and ovarian tumors

We evaluated the tissue distribution of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} regulatory T cells (Treg)(15) by flow cytometry as a fraction of CD4⁺T lymphocytes in 44 patients with previously untreated epithelial ovarian cancers (OC). Patients' characteristics were previously described (5). Consistent with previous investigations (7), Treg were significantly more abundant in tumors (median=9.86%, range 2.3-29.13) and ascites (median=8%, range 1.31-21.51) of OC patients than in their blood (median=3.36%, range 1.17-10.8; $p<10^{-3}$; Figure 1A) whereas blood Treg levels were similar in OC patients and healthy donors.

Tumor-associated Treg (TATreg) levels did not correlate neither with ascite Treg ($r^2=0.093$, $p=0.632$) nor with blood Treg ($r^2=0.112$, $p=0.577$) whereas ascite Treg levels significantly correlate with blood Treg ($r^2=0.537$, $p=0.005$; Figure 1B).

Phenotype of Tumor-associated and ascite Treg and Tconv

To examine the possibility that tumor microenvironment alters Treg status, expression levels of T cell activation markers were measured directly *ex vivo* comparing blood, ascite, and tumor-associated Treg CD4⁺Foxp3⁺ and Tconv CD4⁺Foxp3⁻ from 5 patients. We observed that ascite Treg (Figure 2) were partially activated when compared to blood Treg with increased expression of GITR, HLA-DR, and CD69, whereas ICOS levels were similar. Importantly, TATreg expressed higher levels of these activation markers than both blood and ascite Treg suggesting *in situ* activation of TATreg.

In contrast, ascite Tconv express higher levels of certain markers such as GITR than TATconv whereas expression of HLA-DR and CD69 were similar, and ICOS was lower.

Functions of tumor-associated and ascite Treg and Tconv

To investigate the functionality of Treg and Tconv from both ascites and tumors, we isolated them from tissues and then activated them with anti CD3/CD28 coated-beads. We observed

that ascite Tconv had a significant higher capacity to proliferate than TATconv ($p=0.05$, Figure 3B).

As previously reported (7), both TATreg and ascite Treg proliferated poorly after activation with antibodies against CD3/CD28 (Figure 3B) and inhibit autologous Tconv proliferation in a dose-dependent manner (Figure 3C and 3D).

We further observed that Treg isolated from ascites and tumors suppressed the production of IL-10 (Figure 5 A and 5B) and IFN- γ (Figure 5C and 5D) by ascite Tconv and TATconv respectively.

Correlation of TATreg with favourable outcome

The distribution of Treg was skewed with increased proportion of Treg among CD4⁺T cells in tumors and ascites in comparison to blood (Figure 1A). We questioned the impact of the presence of Treg in blood, ascites, and tumors on patients' outcome. We adopted a classification by tertile (33rd percentile) to compare the highest tertile subgroup to all others. To address this question, we analyzed all relevant clinical and pathological information's (Table 1) that were available on the 44 patients. As our study was prospective with a median follow-up of 20 months, we centred our analysis on progression free-survival (PFS). In addition to TATreg levels, five clinico-pathological variables (age, stage, PS, debulking surgery, and the presence of residual disease) were analyzed due to their previously described prognostic significance in OC (16). In univariate analysis, the following factors were associated with prolonged PFS: age < 65 years old, early stages (I-II), debulking surgery, absence of residual tumors, and high tumor-infiltration by TATreg defined as ≥ 12.88 % of CD4⁺Tcells (Figure 5A and Table 1). In contrast, high levels of ascite Treg had no significant impact on OC patients' outcome (Figure 5B and Table 1). When using a cut-off of ascite Treg ≥ 9.38 % of CD4⁺Tcells, median PFS was estimated to 8.2 months compared to 14.1 months in patients

with ascite Treg < 9.38 % (HR=1.75, CI=0.73-4.23, $p=0.21$). Blood Treg had no impact on patients' outcome (Figure 5C).

In multivariate analysis, TATreg remained an independent prognostic factor associated with delayed relapse. Median PFS for patients with the highest tertile of TATreg (≥ 12.88 % of CD4⁺Tcells) was 18.4 months whereas those with TATreg < 12.88 % of CD4⁺Tcells showed a median PFS of 9.7 months (HR=4.8, CI=1.49-15.49, $p=0.009$; Figure 5A and Table 1) suggesting that high infiltration of ovarian tumors by Treg had a protective effect.

Foxp3⁺ Treg in ovarian cancer after chemotherapy

Since high infiltration of ovarian tumors by Treg at diagnosis is associated with delayed relapse, we questioned whether immune response to neoadjuvant chemotherapy has also an impact on patient's outcome. We compared tumor infiltration by Treg, identified as Foxp3⁺ cells by immunohistochemistry, in tumor sections at diagnosis and at interval surgery, i.e. after 3 to 4 cycles of neoadjuvant chemotherapy by carboplatin and paclitaxel (17). Sequential samples at diagnosis and after chemotherapy were available for 18 patients. We observed that TATreg increased in 7 patients, decreased in 7 patients whereas 4 patients showed no change. Interestingly, median PFS of patients with increased TATreg under chemotherapy was significantly longer (17.3 months) than those with decreased or no changed TATreg (10.97 months) ($p=0.05$; Figure 6).

Discussion

In this prospective study on 44 patients presenting OC and using *ex vivo* analysis, we showed that TATreg are different from ascite and blood Treg in terms of distribution, phenotype, function, and impact on patients' outcome. Indeed, Treg accumulate in malignant ascites and tumors whereas their frequencies were slightly increased in blood. Of most importance, accumulation of TATreg was an independent prognostic factor associated with delayed relapse whereas their presence in ascites has no impact highlighting the specific role of Treg in the context of tumor microenvironment.

To further investigate the clinical significance of the presence of Treg in tumors and ascites, we performed a systematic comparison of TATreg and ascite Treg. TATreg showed an activated phenotype as illustrated by higher levels of activation molecules ICOS, HLA-DR, and CD69 suggesting an *in situ* activation into tumors. Moreover, we observed that both ascite Treg and TATreg are suppressive and inhibit the production of IL-10 and IFN- γ by autologous conventional T cells.

Many studies interested on the clinical significance of the presence of Treg into ovarian tumors but to our knowledge, only one explored the functionality of TATreg (7). Curiel et al showed that blood, ascite Treg and TATreg inhibit similarly proliferation of autologous Tconv. Since they considered that malignant ascites and ovarian tumors are similar, they studied only ascite Treg phenotype, cytokines production and migration but not TATreg (7).

Actually, the impact of the presence of Treg into ovarian tumors is controversial with at least 8 published papers, some of them showing a deleterious effect (7, 8), others showing a benefit (9-11), and a third group with no impact (12). This discrepancy is due at least in part to i) different methods for identifying TATreg as CD4⁺CD25⁺ by IHC (7) or flow-cytometry (11), Foxp3⁺ cells by PCR(8) or IHC (9, 10, 12, 13); ii) the heterogeneity of patients (advanced stages or all stages) and their treatment, and iii) the cut-off chosen to study the impact of Treg

on survival. Moreover, some studies included patients treated over a period of 20 years (10), whereas important changes occurred in the treatment of OC during this period such as the necessity of radical surgery with no residual tumor (16, 18) and chemotherapy regimen associating paclitaxel and carboplatin since early 2000's (19).

The beneficial impact of the presence of TATreg could be explained in part by their capacity to inhibit the production of IL-10 by TATconv, a suppressive cytokine known to favour progression of numerous tumors. In colorectal cancer, the positive impact of TATreg on patients' outcome (20) was relied to their capacity to suppress inflammation and consequently carcinogenesis (21). A detailed comparison of functions of TATreg and ascites Treg would be helpful for a better comprehension of their role within ovarian tumor microenvironment.

Here we studied prospectively a series of 44 patients treated homogeneously between 2008 and 2010. This is the fourth study showing a beneficial impact of high infiltration of ovarian tumors by TATreg. Moreover, this is the first report that interested on immune response under chemotherapy in the context of OC. By sequential analysis of tumors before and after chemotherapy, we showed that increased tumor infiltration by Foxp3⁺Treg has a positive impact on patients' outcome suggesting that antitumor effect of chemotherapy is partially mediated by an immunologic effect.

References

1. Society, A. C. Cancer Facts&Figures 2007. Atlanta: American Cancer Society, 2007.
2. Chan, J. K., Zhang, M., Hu, J. M., Shin, J. Y., Osann, K., and Kapp, D. S. Racial disparities in surgical treatment and survival of epithelial ovarian cancer in United States. *J Surg Oncol*, *97*: 103-107, 2008.
3. Zhang, L., Conejo-Garcia, J. R., Katsaros, D., Gimotty, P. A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M. N., Rubin, S. C., and Coukos, G. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*, *348*: 203-213, 2003.
4. Sakaguchi, S. Regulatory T cells: history and perspective. *Methods Mol Biol*, *707*: 3-17.
5. Labidi-Galy, S. I., Sisirak, V., Meeus, P., Gobert, M., Treilleux, I., Bajard, A., Combes, J. D., Faget, J., Mithieux, F., Cassagnol, A., Tredan, O., Durand, I., Menetrier-Caux, C., Caux, C., Blay, J. Y., Ray-Coquard, I., and Bendriss-Vermare, N. Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer. *Cancer Res*.
6. Zou, W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, *6*: 295-307, 2006.
7. Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M. L., Knutson, K. L., Chen, L., and Zou, W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, *10*: 942-949, 2004.
8. Wolf, D., Wolf, A. M., Rumpold, H., Fiegl, H., Zeimet, A. G., Muller-Holzner, E., Deibl, M., Gastl, G., Gunsilius, E., and Marth, C. The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, *11*: 8326-8331, 2005.
9. Milne, K., Kobel, M., Kalloger, S. E., Barnes, R. O., Gao, D., Gilks, C. B., Watson, P. H., and Nelson, B. H. Systematic analysis of immune infiltrates in high-grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors. *PLoS One*, *4*: e6412, 2009.
10. Leffers, N., Gooden, M. J., de Jong, R. A., Hoogeboom, B. N., ten Hoor, K. A., Hollema, H., Boezen, H. M., van der Zee, A. G., Daemen, T., and Nijman, H. W. Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother*, *58*: 449-459, 2009.
11. Tsiatas, M. L., Gyftaki, R., Liacos, C., Politi, E., Rodolakis, A., Dimopoulos, M. A., and Bamias, A. Study of T lymphocytes infiltrating peritoneal metastases in advanced ovarian cancer: associations with vascular endothelial growth factor levels and prognosis in patients receiving platinum-based chemotherapy. *Int J Gynecol Cancer*, *19*: 1329-1334, 2009.
12. Sato, E., Olson, S. H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A. A., Frosina, D., Gnjjatic, S., Ambrosone, C., Kepner, J., Odunsi, T., Ritter, G., Lele, S., Chen, Y. T., Ohtani, H., Old, L. J., and Odunsi, K. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*: 18538-18543, 2005.
13. Barnett, J. C., Bean, S. M., Whitaker, R. S., Kondoh, E., Baba, T., Fujii, S., Marks, J. R., Dressman, H. K., Murphy, S. K., and Berchuck, A. Ovarian cancer tumor

- infiltrating T-regulatory (T(reg)) cells are associated with a metastatic phenotype. *Gynecol Oncol*, *116*: 556-562.
14. DR, C. Regression model and lifer tables (with discussion). *JR Stat Soc*, *34*: 187-220, 1972.
 15. Liu, W., Putnam, A. L., Xu-Yu, Z., Szot, G. L., Lee, M. R., Zhu, S., Gottlieb, P. A., Kapranov, P., Gingeras, T. R., Fazekas de St Groth, B., Clayberger, C., Soper, D. M., Ziegler, S. F., and Bluestone, J. A. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*, *203*: 1701-1711, 2006.
 16. du Bois, A., Reuss, A., Pujade-Lauraine, E., Harter, P., Ray-Coquard, I., and Pfisterer, J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer*, *115*: 1234-1244, 2009.
 17. Vergote, I., Trope, C. G., Amant, F., Kristensen, G. B., Ehlen, T., Johnson, N., Verheijen, R. H., van der Burg, M. E., Lacave, A. J., Panici, P. B., Kenter, G. G., Casado, A., Mendiola, C., Coens, C., Verleye, L., Stuart, G. C., Pecorelli, S., and Reed, N. S. Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer. *N Engl J Med*, *363*: 943-953.
 18. Chi, D. S., Eisenhauer, E. L., Lang, J., Huh, J., Haddad, L., Abu-Rustum, N. R., Sonoda, Y., Levine, D. A., Hensley, M., and Barakat, R. R. What is the optimal goal of primary cytoreductive surgery for bulky stage IIIC epithelial ovarian carcinoma (EOC)? *Gynecol Oncol*, *103*: 559-564, 2006.
 19. Ozols, R. F., Bundy, B. N., Greer, B. E., Fowler, J. M., Clarke-Pearson, D., Burger, R. A., Mannel, R. S., DeGeest, K., Hartenbach, E. M., and Baergen, R. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol*, *21*: 3194-3200, 2003.
 20. Salama, P., Phillips, M., Grieu, F., Morris, M., Zeps, N., Joseph, D., Platell, C., and Iacopetta, B. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol*, *27*: 186-192, 2009.
 21. Erdman, S. E. and Poutahidis, T. Roles for inflammation and regulatory T cells in colon cancer. *Toxicol Pathol*, *38*: 76-87.

Acknowledgements

The authors are grateful to the ovarian cancer patients who consented to participate to this study and to the medical staff from Centre Leon Berard (CLB). We thank Dr Philippe Gabelle from Clinique des Eaux-Clares, Grenoble and Dr Philippe Bouchard from Clinique des Cèdres, Grenoble for their active participation in this translational research program. We also thank Dr Philippe Cassier from CLB for his editorial assistance.

Grant support: This work was supported by institutional grant from Comité départemental du Puy-de-Dôme de la Ligue nationale contre le cancer. S-I L-G is a recipient of a grant Soutien à la formation à la recherche translationnelle en cancérologie from Institut National du cancer (INCa), France

Table 1

Explanatory variables	n	Median PFS (months)	Univariate			Multivariate		
			HR	95%CI	<i>p</i>	HR	95%CI	<i>p</i>
%Treg%TCD4⁺ tumor								
≥12.9 ^R	12	18.4						
<12.9	21	9.7	3.24	1.23-8.56	0.018	4.8	1.49-15.49	0.009
Age (years)								
≤65 ^R	17	18.4						
>65	27	10.2	2.36	1.01-5.48	0.047	2.4	0.8-7.17	0.118
Debulking surgery								
Yes ^R	25	17.9						
No	19	8.0	3.2	1.46-7.05	0.004	1.76	0.67-4.6	0.25
Residual tumor								
Absent ^R	10	18.4						
Present	34	10.8	3.85	1.15-12.9	0.029	1.86	0.46-7.52	0.383
PS								
0-1 ^R	29	14.2						
>1	12	9.7	2.01	0.87-4.64	0.101			
Stage								
I-II ^R	5	NC*						
III-IV	39	12.4	NC	NC	NC			
%Treg%TCD4⁺ ascite								
<9.38 ^R	21	14.1						
≥9.38	12	8.2	1.75	0.73-4.23	0.21			
%Treg%TCD4⁺ blood								
<4.04 ^R	22	13.6						
≥4.04	12	9.7	1.09	0.45-2.65	0.86			

Figures legends

Figure 1. Distribution and frequency of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} regulatory T cells (Treg) obtained by FACS analysis in biological samples. Mononuclear cells (MNC) from freshly untreated tumor specimens, malignant ascites, and peripheral blood from OC patients (P) and healthy donors (HD) were prepared. Box plot set of Treg levels were determined as a percentage among total CD4⁺Tcells. *P* values were derived from Mann-Whitney test or Student test for each comparison. (A) Treg were identified as CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} by flow cytometry. (B) Treg levels among CD4⁺ Tcells in blood, ascite, and tumors of OC patients. (C) Spearman rank correlations between the proportion of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Treg in blood and ascite. * < 0.05 ; *** $< 10^{-3}$.

Figure 2. TATreg isolated from ovarian tumors display an activated phenotype. The phenotype of Treg from primary tumors, ascites, and patient peripheral blood was compared after triple staining with Foxp3-FITC, CD4-PE-Cy5 and specific antibodies coupled to PE without purification step. Treg activation status was characterized after gating on the CD4⁺Foxp3⁺ population and compared with the CD4⁺Foxp3⁻ Tconv population. Cell surface GITR, HLA-DR, ICOS, and CD69 and intracytoplasmic (Foxp3) stainings were performed. Specific isotypes were used as negative controls. Values are expressed as Mean Fluorescence Intensity (MFI) minus FMO control. Data are representative of one from five patients.

Figure 3. Functional analysis of ascite and tumor CD4⁺ Tcells. (A) Spearman rank correlations between the proportion of CD4⁺CD25⁻CD127^{high} Tumor-Associated (TA) conventional T cells (Tconv) and CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} TATreg. (B) CD4⁺CD25⁻ Tconv were isolated from ascites or tumor and stimulated with anti CD3/CD28 coated beads for 5 days. (C) and (D) CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Treg cells from ascite and tumor were added to the culture at the indicated ratio of Treg to Tconv cells. Results are representative of more than

four independent experiments. (E) and (F) TATreg and ascite Treg inhibit the production of IL-10 and IFN- γ by respectively TATconv and ascite Tconv (n=3, *:p<0.05).

Figure 4. Tumors highly infiltrated by Treg showed delayed relapse. Progression-free survival (PFS) rates were calculated using Kaplan-Meier method and compared using Log-Rank test. (A), (B), and (C) PFS of patients with the highest tertile (33rd percentile) frequency of TATreg ($\geq 12.88\%$), ascite Treg ($\geq 9.38\%$), and blood Treg ($\geq 4.04\%$) among CD4⁺ Tcells compared to all others.

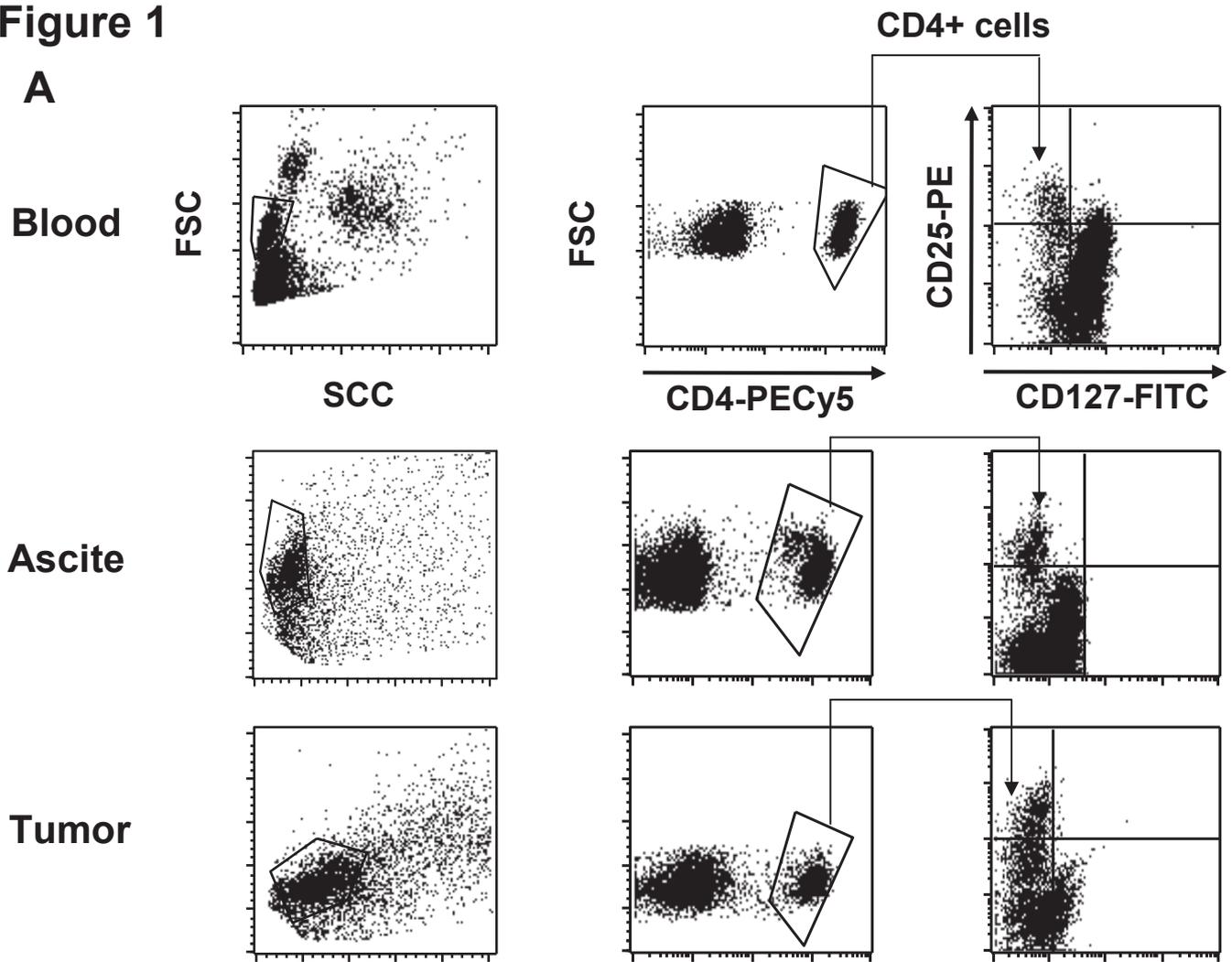
Figure 5. Increased TATreg under chemotherapy is associated with delayed relapse. (A), grade 0 (B) grade 1 and (C) grade 2 immunohistochemical staining of Foxp3⁺ Treg within ovarian tumors. (D) Progression-free survival (PFS) rates were calculated using Kaplan-Meier method and compared using Breslow test. Patients with increased Foxp3⁺ Treg (n=7) were compared to those with decreased or no changed Foxp3⁺ Treg (n=11).

Table legends

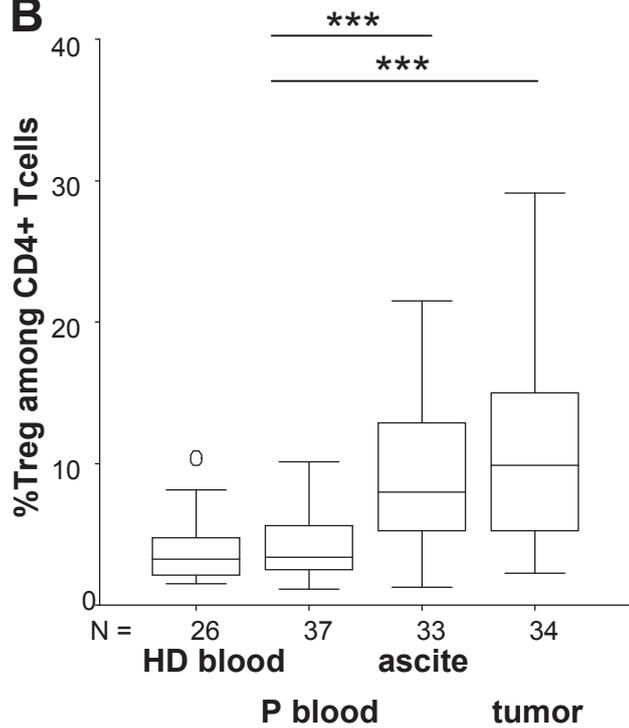
Table 1: Univariate and multivariate analysis of prognostic factors associated with progression-free survival. PFS=Progression-free survival, NC= Not Computed (no events occurred in the I-II subgroup), HR=Hazard Ratio, CI= Confidence Index. R Reference item, * = Not computed (no events occurred in the I-II subgroup).

Figure 1

A



B



C

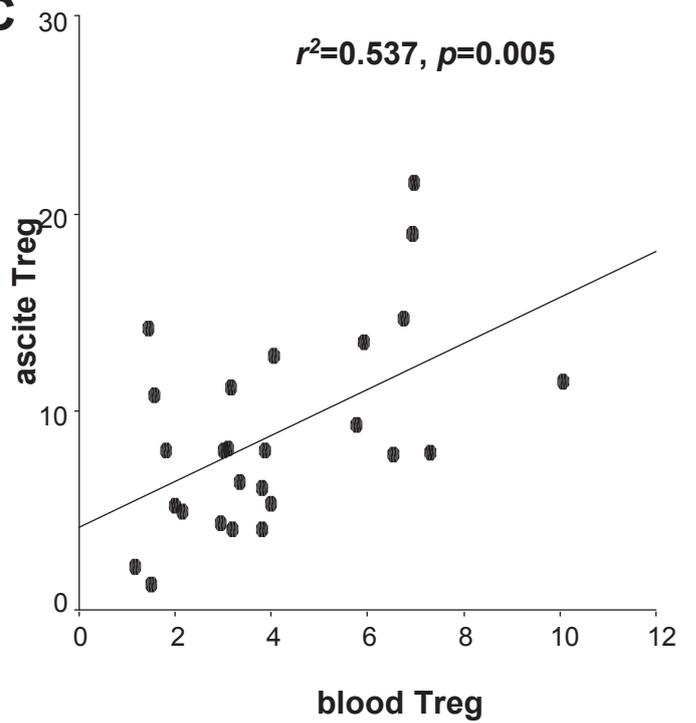


Figure 2

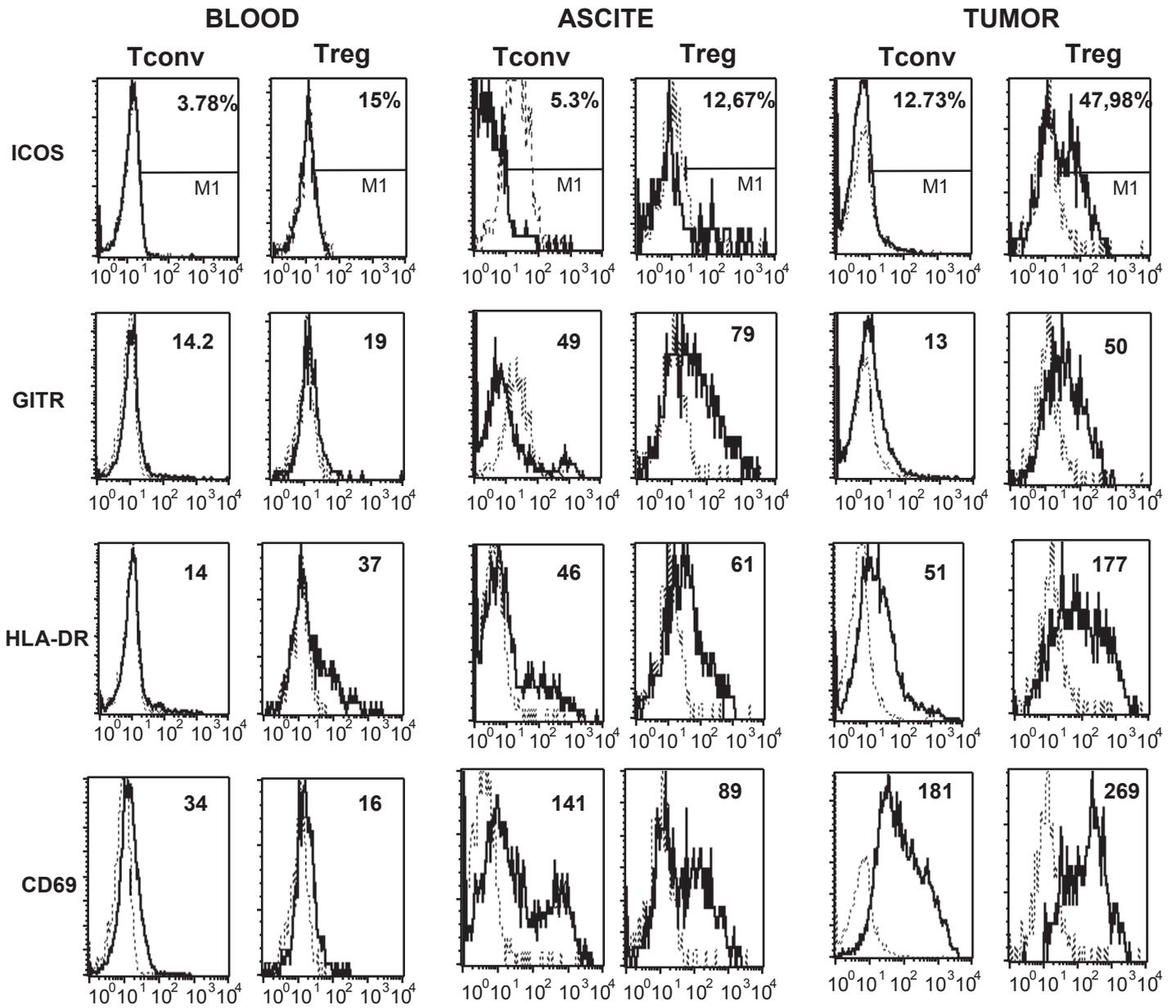
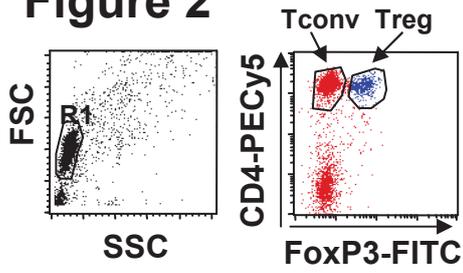


Figure 3

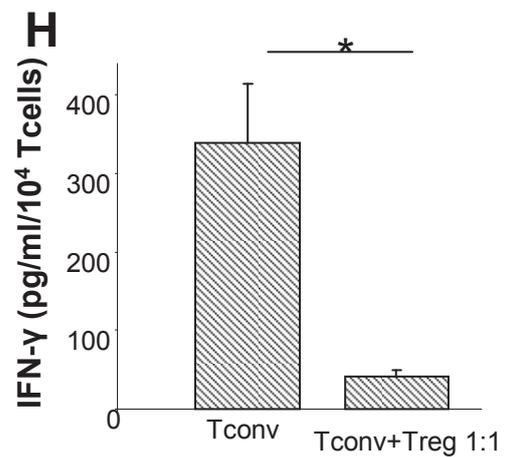
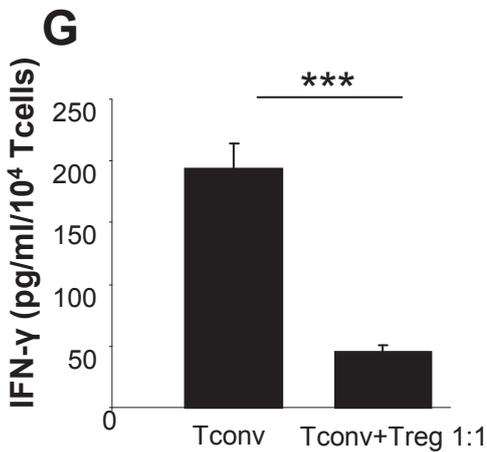
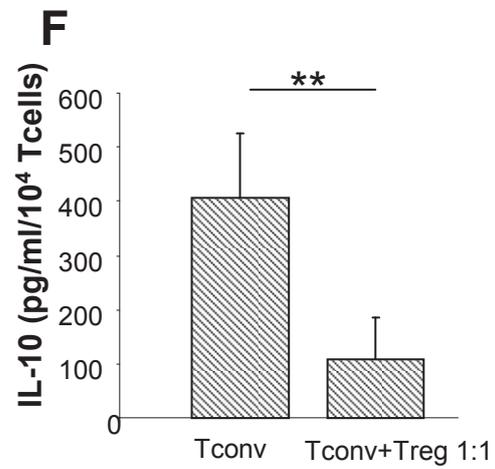
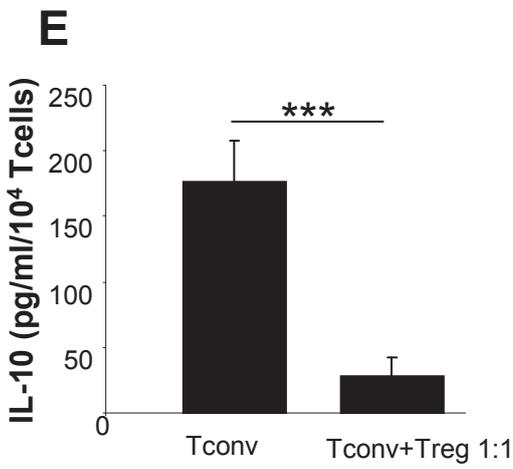
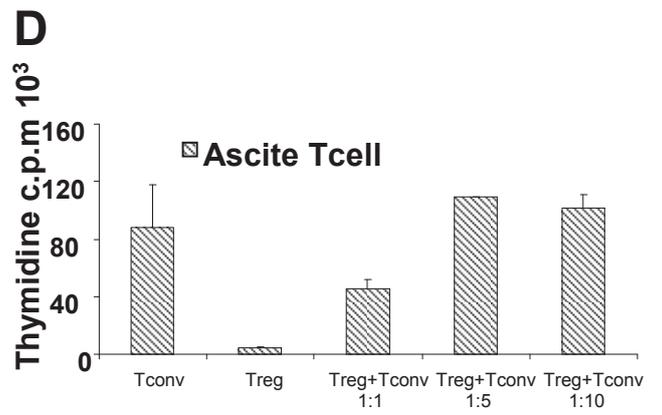
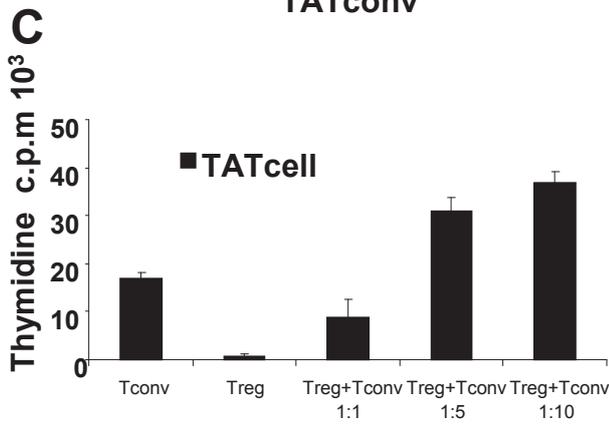
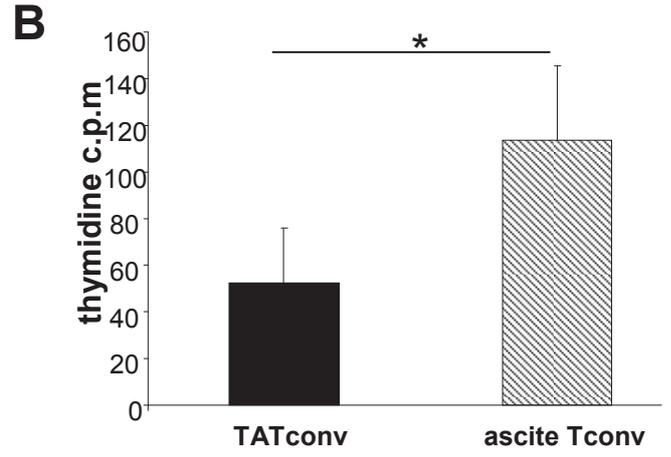
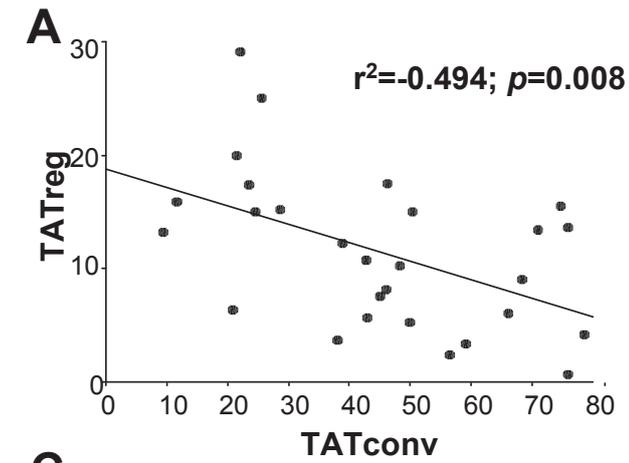
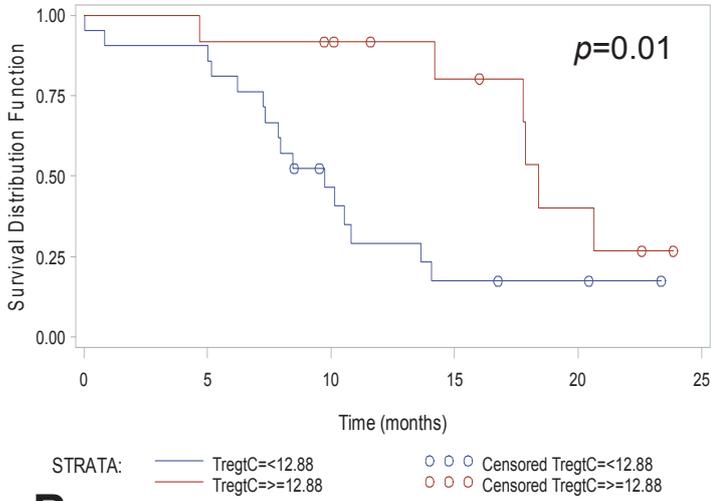
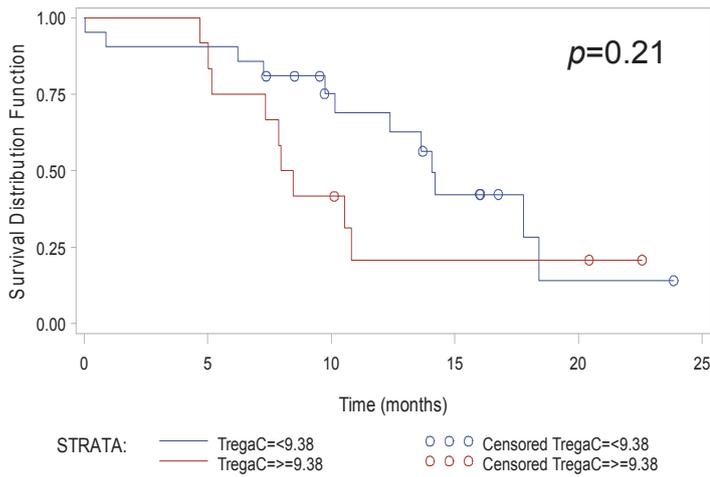


Figure 4

A



B



C

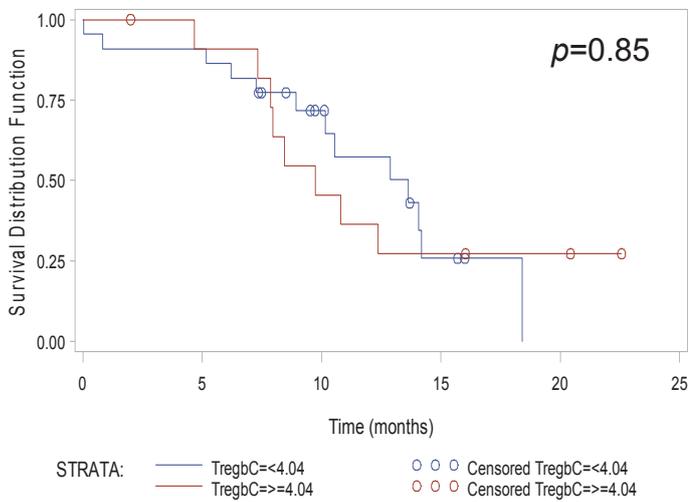
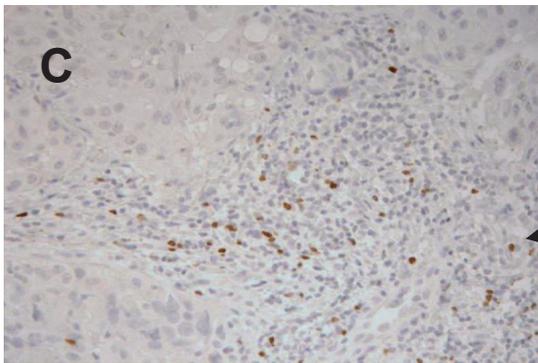
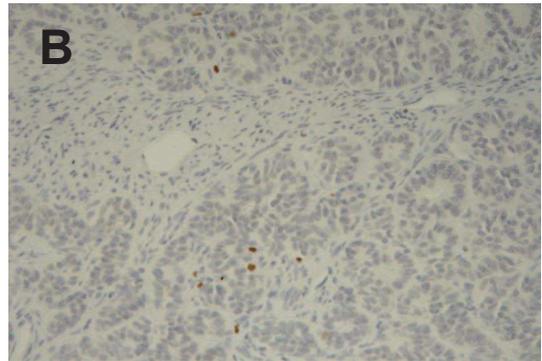
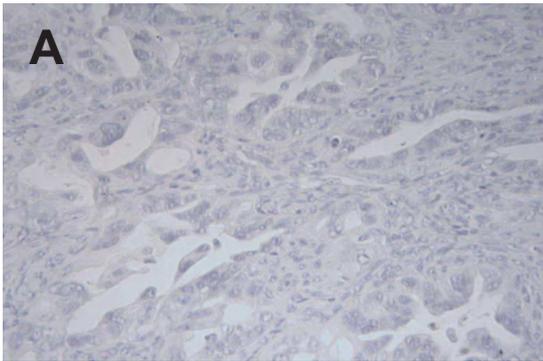
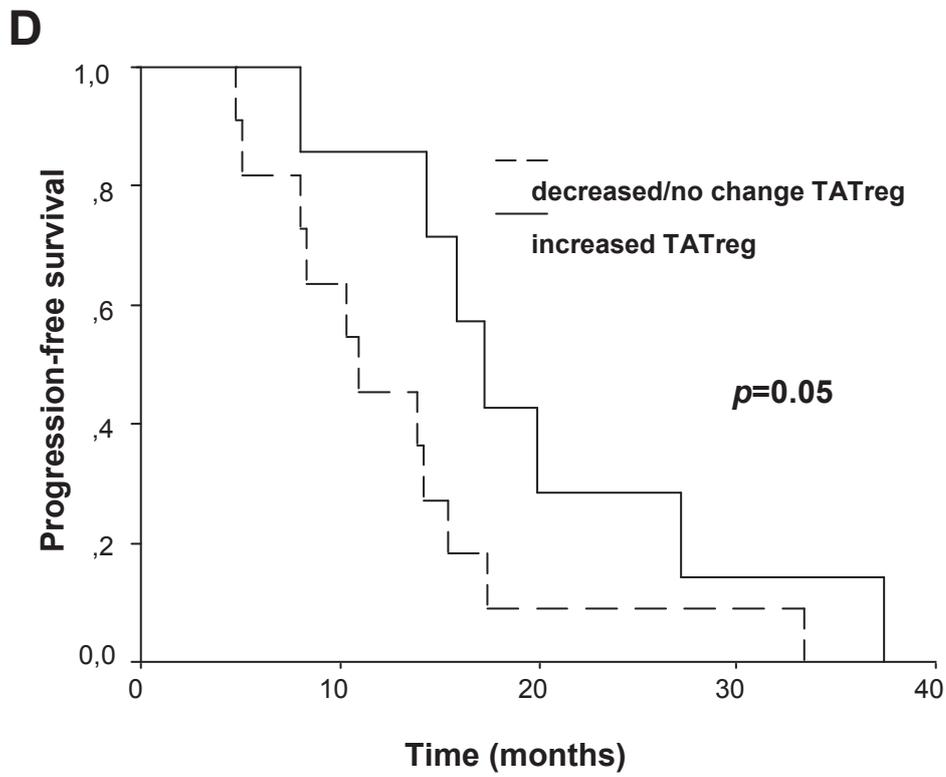


Figure 5



Foxp3⁺ cell



Discussion et perspectives

La progression tumorale nécessite, en plus des différents événements liés à la tumorigenèse tels que la prolifération cellulaire, l'angiogénèse et l'envahissement des tissus proximaux et à distance, une tolérance du système immunitaire qui va « ignorer » la tumeur voire même favoriser sa progression.

Comme nous l'avons vu précédemment, le cancer de l'ovaire constitue un bon modèle pour l'étude de l'immunité antitumorale à la fois grâce à i) la facilité d'accès à de larges prélèvements d'ascites malignes et de tumeurs et ii) son immunodépendance. En effet, de nombreuses études ont analysé l'impact sur la survie des patientes ainsi que la fonction de différentes populations immunes présentes dans le sang, l'ascite et la tumeur, en particulier les lymphocytes T, les lymphocytes T régulateurs, les cellules dendritiques et les macrophages (revue de la littérature dans (Nelson, 2008)). A travers ce travail, nous nous sommes intéressés à deux populations immunes connues pour jouer un rôle dans la tolérance vis-à-vis des tumeurs : les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et les lymphocytes T régulateurs (Treg).

1. Les pDC s'accumulent dans les ascites et sont déplétées dans le sang

Nous avons observé, comme précédemment rapporté (Curiel et al., 2004a; Wertel et al., 2008; Zou et al., 2001) une accumulation des pDC dans les ascites malignes, où elles représentent jusqu'à 3% des cellules mononucléées (MNC) alors qu'elles sont profondément déplétées dans le sang des patientes par rapport aux sujets sains (Article 1). Cette déplétion n'est pas spécifique des pDC mais elle concerne également les mDC même si celles-ci représentent une faible portion des DC dans les ascites malignes. La déplétion des pDC circulantes a été rapportée dans d'autres types de cancers, notamment le cancer du sein (Sisirak V, 2008) et du pancréas (Tjomsland et al.). Plusieurs mécanismes ont été avancés pour expliquer cette déplétion, notamment une augmentation de l'apoptose des pDC circulants (Tjomsland et al.) et leur migration dans les ascites qui peuvent être très abondantes (plusieurs litres) et riches en cellules mononucléées. Nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre les taux de pDC dans le sang et les ascites. Par contre et de façon surprenante, il y avait une corrélation positive et significative entre les taux des pDC du sang et associées aux tumeurs (TApDC). Nos résultats préliminaires montrent également une augmentation de l'apoptose des pDC du sang des patientes par rapport à celles de donneurs sains et aux pDC d'ascite et de tumeur, suggérant un effet délétère systémique de la masse tumorale sur les pDC circulantes alors que les pDC semblent protégées de l'apoptose dans le microenvironnement tumoral. Les mécanismes

d'apoptose ont été étudiés chez les patients infectés par le HIV, chez qui le virus pénètre dans les pDC et induit leur mort par apoptose et nécrose (Meyers et al., 2007). Il serait intéressant d'identifier le facteur responsable de l'augmentation de l'apoptose et la mort cellulaire chez les pDC circulants des patients cancéreux.

Nous avons également observé une correction partielle des taux de pDC circulantes sous chimiothérapie. Un des effets indésirables majeurs de la chimiothérapie est la toxicité hématologique avec survenue de leucopénie (Crawford et al., 2004). Ainsi, la correction de la déplétion des pDC après 3 à 4 cycles de chimiothérapie était inattendue et suggère qu'un contrôle systémique de la maladie grâce à la chimiothérapie permet de reverser l'effet délétère de la masse tumorale. Cette correction se maintient chez les patients en RC alors que le taux de pDC baisse lorsque la maladie progresse. Dans le cancer du pancréas, une correction partielle des taux de pDC est aussi observée après résection chirurgicale de la tumeur (Tjomsland et al.). L'ensemble de ces observations suggère que le taux de pDC circulantes est lié à la masse tumorale existante qui peut-être réduite par chimiothérapie ou chirurgie.

2. L'accumulation des pDC dans les tumeurs est associée à une rechute plus précoce

Les pDC infiltrent certaines tumeurs de l'ovaire et s'accumulent dans la majorité des ascites malignes. Nous avons étudié la signification clinique de la présence des pDC dans les ascites et les tumeurs. Comme l'étude en cytométrie en flux était prospective sur 2 ans, le suivi médian était seulement de 14 mois permettant une analyse de la survie sans progression (SSP) mais pas de la survie globale (SG). La cytométrie en flux a l'avantage de permettre de réaliser une étude comparative ascite/tumeur. L'accumulation des pDC dans les tumeurs (plus haut tertile) était un facteur indépendant de mauvais pronostic car associé à une rechute plus précoce, alors que leur accumulation dans les ascites où elles représentent jusqu'à 10 fois le taux de TApDC n'avait pas d'impact sur la SSP.

Nous avons voulu confirmer ces résultats sur une plus grande série (n=97) et en utilisant une méthodologie différente. Les pDC ont été identifiées comme des cellules BDCA2⁺ en IHC sur des biopsies tumorales de patientes atteintes de CO opérées au Centre Léon Bérard entre 1997 et 2009 et pour lesquelles nous disposions des données cliniques associées (Figure C4, résultats complémentaires de l'Article 1). Comme dans le cancer du sein (Treilleux et al., 2004), peu de tumeurs (18%) sont infiltrées par ces cellules. La présence des pDC dans le stroma tumoral et non dans l'infiltrat lymphoïde est associée à une survie sans progression significativement plus courte. De même la survie globale (SG) est plus courte lorsqu'il y a des pDC dans le stroma tumoral mais la différence est non significative en raison d'un suivi

médian court (38 mois) et un nombre d'événements insuffisant puisque seulement 46 des 98 patientes de notre série sont décédées. L'impact des pDC sur la SG sera à nouveau analysé lorsqu'au moins les deux tiers des patientes seront décédées.

Le fait que seules les pDC présentes dans le stroma tumoral et non dans les infiltrats lymphoïdes aient un effet délétère sur la survie est en faveur d'une interaction directe entre les pDC et les cellules tumorales pour induire une tolérance dans le microenvironnement favorisant la progression tumorale. L'effet des pDC sur les cellules tumorales a été principalement étudié dans le myélome multiple (MM) et les cancers du sein et de l'ovaire. Une étude originale récemment publiée dans *Cancer Cell* a montré que les pDC s'accumulent dans la moelle osseuse des patients ayant un MM où elles favorisent la croissance, la survie, la migration et la chimiorésistance des cellules tumorales myélomateuses (Chauhan et al., 2009). Les pDC sont également capables d'induire *in vivo* une angiogénèse, facteur de mauvais pronostic (Bamias et al., 2008; Giuliani et al., ; Hefler et al., 2006), dans des modèles murins de cancer de l'ovaire (Curiel et al., 2004a) et MM (Chauhan et al., 2009). Dans le cancer du sein, nous avons montré que les lignées de cellules tumorales n'inhibent pas la production d'IFN- α par les pDC de donneurs sains *in vitro* (Sisirak V, 2008) alors que les surnageants de tumeurs bloquent cette production. Il serait intéressant d'étudier l'effet des TApDC sur la prolifération des cellules tumorales épithéliales (ovaire et sein).

Nos observations dans le CO montrant d'une part qu'il n'y a pas de corrélation entre les taux de TApDC et ascite pDC, et d'autre part que l'accumulation des pDC des ascites n'a pas d'impact sur la SSP, suggèrent que les ascites ne constituent pas un bon reflet du microenvironnement tumoral. Ces observations renforcent l'intérêt d'une étude comparative des phénotypes et fonctions des cellules immunes infiltrant les ascites et les tumeurs de l'ovaire.

A travers ce travail, nous avons montré l'impact délétère des TApDC sur le pronostic des patientes ayant un cancer de l'ovaire par deux méthodologies différentes (cytométrie en flux et IHC). L'impact des pDC sur le pronostic a été étudié dans d'autres types de tumeurs solides et hématologiques. Notre équipe a été la première à montrer que la présence de pDC dans les tumeurs du sein est rare (13%) mais constitue un facteur pronostic indépendant associé à la fois à une SSP et une SG plus courtes (Treilleux et al., 2004). Un effet délétère des pDC infiltrant la moelle osseuse a été également rapporté dans les myélomes (Chauhan et al., 2009) où elles semblent jouer un rôle dans la chimiorésistance mais elles n'ont pas d'impact sur la survie dans les lymphomes folliculaires (Alvaro et al., 2006).

3. Fonctions adaptatives et régulatrices des pDC associées aux tumeurs

Afin de comprendre le rôle joué par les pDC dans le microenvironnement tumoral, nous avons procédé à une analyse comparative systématique du phénotype et de la fonction des pDC du sang, de l'ascite et de la tumeur chez les patientes ayant un cancer épithélial de l'ovaire. Nous avons observé que les TApDC expriment un phénotype partiellement mature avec une augmentation significative de l'expression de molécules de costimulation des lymphocytes T, CD40 et CD86, par rapport aux pDC du sang et de l'ascite, suggérant une activation *in situ* des TApDC. Cette activation pourrait être provoquée par des signaux de danger tels que les acides nucléiques autologues libérés par les cellules mortes (Shi et al., 2003) dans les tumeurs et dont la fréquence est 5 fois plus élevée que dans les ascites.

De plus, nous avons retrouvé des taux élevés de TNF- α dans le microenvironnement tumoral (surnageants de tumeurs), cytokine connue pour induire la maturation des pDC (Palucka et al., 2005). Outre leur phénotype semi-mature à l'état basal, les TApDC ont une plus grande capacité que les pDC du sang et de l'ascite de murer *in vitro* en réponse à la fois à des signaux dépendants et indépendants (IL-3) des TLR, y compris des TLR ligands connus pour induire plutôt la production d'IFN- α que la maturation des pDC. Cette observation suggère une activation préférentielle et amplifiée de la voie de signalisation NF κ B (O'Keeffe et al., 2005) dans les TApDC par rapport à la voie IRF7 (Honda et al., 2005; O'Keeffe et al., 2005).

Dans cette étude, nous avons montré que les TApDC et les pDC d'ascites activées par IL-3 (Figure 5 de l'Article 1) ou un ligand de TLR7 (Figure D1) sont capables d'induire la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ naïfs allogéniques. Ces observations sont en contradiction avec celles de Zou et al dans le cancer de l'ovaire (Zou et al., 2001), ainsi que Perrot et al dans le cancer du poumon (Perrot et al., 2007) puisque nous rapportons que les TApDC ne sont pas bloquées à un stade immature et gardent leur capacité à activer des lymphocytes T naïfs.

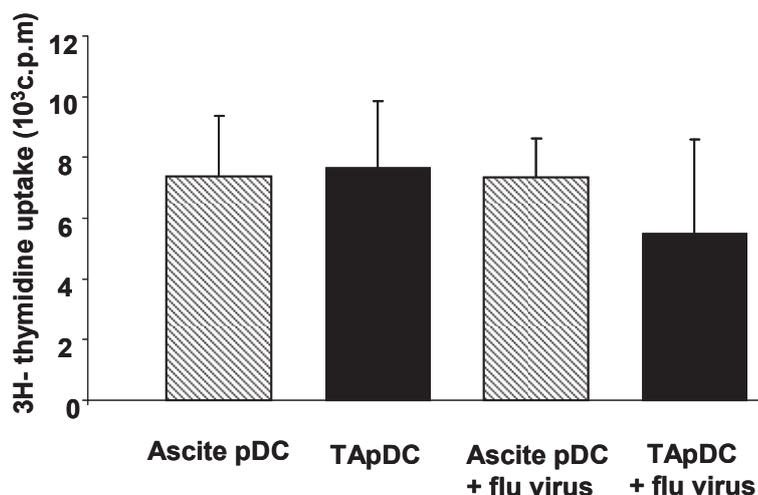


Figure D1 : Les TADC et pDC d'ascites activées par flu virus induisent la prolifération des lymphocytes T naïfs CD4⁺. Les pDC triés par cytométrie à partir de la tumeur (TApDC) et de l'ascite sont activées pendant 18 heures avec flu virus (TLR7 ligand) puis incubées avec des lymphocytes T naïfs CD4⁺ allogéniques avec un gradient 1 pDC : 10 lymphocytes T CD4⁺ pendant 5 jours. La prolifération des lymphocytes T est évaluée par l'incorporation de la 3H thymidine [moyenne et écart-type de culture cellulaire en triplicats].

De plus, les TApDC dans le CO induisent la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ sécrétant IL-10 et IFN- γ . L'expression d'ICOSL par les pDC leur confère la capacité d'induire la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T suppresseurs produisant IL-10 et IFN- γ appelés lymphocytes *Tr1* (Ito et al., 2007). Il semblerait que les TApDC dans le CO induiraient des lymphocytes T CD4⁺ suppresseurs de type *Tr1* car ayant le même profil de cytokines mais cette hypothèse reste à confirmer. A noter que les pDC d'ascite induisent la différenciation des lymphocytes T naïfs CD8⁺ en lymphocytes T CD8⁺ suppresseurs produisant IL-10 (Wei et al., 2005). Il y a donc une amplification de l'effet tolérant des TApDC favorisant le maintien d'un microenvironnement immunosuppresseur.

Enfin, les pDC sont capables d'induire la différenciation des lymphocytes T naïfs CD4⁺ en Treg exprimant Foxp3 (Manches et al., 2008; Moseman et al., 2004). Dans le contexte de CO, nos résultats préliminaires montrent que les pDC activés en présence de surnageants de tumeurs n'augmentent pas leur capacité à induire une différenciation des Treg (résultats non montrés), contrairement à ce qu'on observe chez la souris dans les ganglions lymphoïdes drainant les mélanomes (Sharma et al., 2007)

4. Altération de la production d'IFN- α des pDC associées aux tumeurs

La fonction effectrice principale des pDC est la production d'IFN- α en réponse aux ligands des récepteurs TLR7 et 9. Nous avons observé une forte inhibition de la capacité des TApDC à produire de l'IFN- α par rapport aux pDC d'ascite et aux pDC du sang de sujets sains. De manière intéressante, cette inhibition était essentiellement observée en réponse à CpG-A, un ligand de TLR9 connu pour induire une forte sécrétion d'IFN de type I par les pDC (Krug et al., 2001).

L'altération de la production d'IFN- α par les TApDC a été précédemment rapporté par notre équipe dans le cancer du sein (Sisirak V, 2008) ainsi que par d'autres équipes dans les cancers tête et cou (Hartmann et al., 2003) et les cancers du poumon (Perrot et al., 2007).

En accord avec le travail de Zou (Zou et al., 2001), nous avons observé une augmentation de la sécrétion d'IFN- α par les pDC d'ascite par rapport aux pDC de sang en réponse à un ligand de TLR7, mais elle n'est pas significative. Cette différence pourrait s'expliquer par la nature des ligands de TLR7 puisque nous avons utilisé un flu virus alors qu'un adénovirus a été utilisé par Zou et al. Concernant les TApDC, nous n'avons pas observé d'inhibition significative de la production d'IFN- α par rapport aux pDC de sang, alors qu'elles sont inhibées par rapport aux pDC d'ascite. Il semble donc que l'inhibition de la production d'IFN- α par les TApDC soit plus marquée en réponse aux ligands de TLR9 (CpG-A) que TLR7.

Contrairement au cancer de la tête et du cou (Hartmann et al., 2003), nous avons exclu que l'inhibition de la réponse aux ligands de TLR9 était liée à un défaut d'expression de TLR9. En effet, les TApDC d'ovaire expriment des taux intracellulaires de la protéine TLR9 identiques aux pDC d'ascite et de sang par cytométrie en flux (résultats non montrés). Ainsi, la spécificité de l'altération de la sécrétion d'IFN- α dans les TApDC en réponse à CpG-A s'expliquerait par un défaut soit i) de reconnaissance de TLR9 par son ligand soit ii) de signalisation en aval de TLR9 menant à la synthèse d'I IFN- α même si cette dernière hypothèse semble peu probable étant donné que TLR7 et TLR9 partagent les mêmes cascades de signalisation intracellulaire.

Outre l'altération de leur production de l'IFN de type I, les TApDC sont inhibées pour la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-6 et des chimiokines MIP-1 β et RANTES en réponse à CpG-A (Figure S2A de l'Article 1). En revanche, il n'y avait pas de différence pour la production d'IL-8 et IP-10 (Figure S2B de l'Article 1).

5. Rôle des facteurs solubles dans l'inhibition des fonctions innées des TApDC

In vitro, les surnageants de tumeurs (TUMSN) dérivant des cancers de l'ovaire bloquent la production d'IFN- α par les pDC activés par des ligands de TLR (TLR-L). Ces observations

suggèrent que des facteurs solubles présents dans le microenvironnement tumoral sont impliqués dans le dysfonctionnement des TApDC. Dans ce contexte, nous avons montré que les cytokines TNF- α et TGF- β présentes dans les surnageants tumoraux participent à ce blocage. Le rôle inhibiteur de TGF- β concorde avec la présence d'une corrélation inverse entre les taux de TGF- β 1 et IFN- α intratumoraux chez les patientes ayant un cancer du sein (Domschke et al., 2009). Par ailleurs, des études réalisées chez l'homme et la souris montrent que cette cytokine intervient dans l'inhibition de la production d'IFN- α par les pDC dans les plaques de Peyer, le stroma splénique et le microenvironnement tumoral du cancer de la tête et du cou (Bekeredjian-Ding et al., 2009; Contractor et al., 2007; Li et al., 2008). Comme mentionné précédemment, le TNF- α pourrait réguler négativement la synthèse d'IFN- α par les TApDC en favorisant leur maturation (Palucka et al., 2005). En accord avec i) la démonstration de la phosphorylation de Smad2/3 dans les TApDC *in situ* dans le cancer du sein (Sisirak V, 2008) et ii) les pDC de souris déficientes en Smad3 sont insensibles aux effets du TGF- β exogène, notre hypothèse est que le TGF- β régulerait négativement la synthèse d'IFN- α dans les TApDC via l'activation de la voie de signalisation des protéines Smad.

Outre le TGF- β et le TNF- α , d'autres facteurs solubles présents dans le microenvironnement tumoral pourraient intervenir dans l'altération fonctionnelle des TApDC. Nous avons détecté des taux élevés d'IL-10 dans les TUMSN dérivés de tumeurs primaires, cytokine connue pour inhiber la sécrétion d'IFN- α par les pDC activées (Duramad et al., 2003). Cependant, le blocage d'IL-10 dans les TUMSN n'affecte pas leur effet négatif sur les pDC. De plus, les pDC présentes dans les ascites malignes d'ovaire qui contiennent des taux élevés d'IL-10 (Zou et al., 2001) produisent de l'IFN- α après stimulation *in vitro* (Article 1, (Zou et al., 2001)), confirmant que l'IL-10 n'est pas impliquée dans le dysfonctionnement des TApDC. Finalement, les cellules tumorales pourraient sécréter ou libérer lors de leur mort cellulaire d'autres facteurs immunomodulateurs tels que la PGE2 et les nucléotides (ATP, UDP, UTP, adénosine) décrits pour bloquer la synthèse d'IFN- α dans les pDC activées par engagement de récepteurs couplés à des protéines Gs (Bekeredjian-Ding et al., 2009; Fabricius et al., ; Schnurr et al., 2004; Shin et al., 2008; Son et al., 2006).

Plusieurs récepteurs membranaires spécifiques ont été décrits à la surface des pDC chez l'homme, en particulier BDCA2 (Dzionek et al., 2001) et ILT7 (Cao et al., 2006) qui une fois activés sont capables d'inhiber la capacité des pDC à produire de l'IFN de type I, TNF- α , et IL-6 en réponse à un TLR-L 7/9 (flu virus ou CpG-A). Cet effet est médié par l'engagement de ces récepteurs régulateurs par des molécules présentes dans le microenvironnement

tumoral. Plusieurs lignées cellulaires tumorales sont capables d'inhiber la production d'IFN de type I par les pDC en réponse à TLR-L7/9 grâce à l'interaction d'ILT7 présents à la surface des pDC (Tsukamoto et al., 2009). Récemment, BST2 a été identifié comme le ligand naturel d'ILT7(Cao et al., 2009). Dans ce contexte, nous avons observé une diminution significative de l'expression d'ILT7 en cytométrie en flux par les TApDC comparés aux pDC de l'ascite (Figure D2). Par ailleurs BST2 est exprimé par les cellules tumorales ovariennes EpCAM⁺ CD45⁻ (résultats non montrés) ainsi que par une sous-population de cellules immunes CD45⁺ infiltrant les tumeurs (Cao et al., 2009).

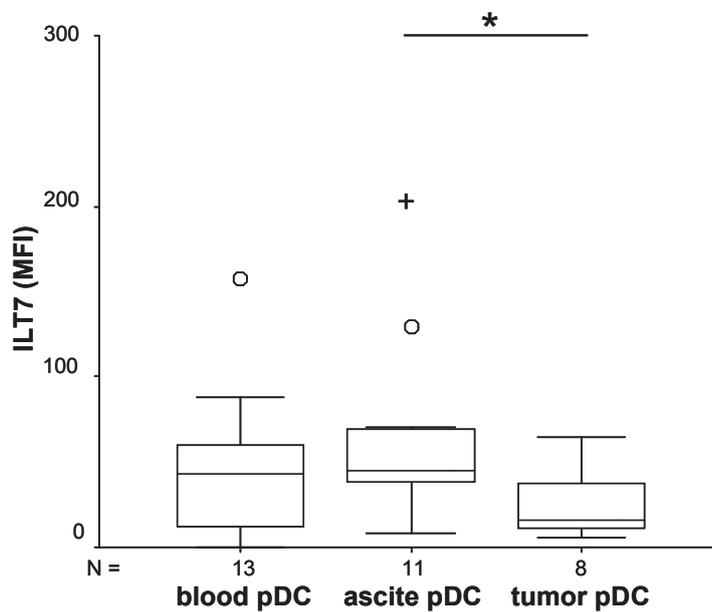


Figure D2 : Expression d'ILT7 par les pDC du sang, de l'ascite et les tumeurs de l'ovaire. Etude en cytométrie en flux de l'expression d'ILT7 (PE) par les pDC CD4⁺ (FITC) BDCA2⁺ (PECy5) du sang, de l'ascite et des tumeurs chez 13 patientes. Les moyennes ont été comparées par un test non paramétrique (Mann-Whitney). * : p<0.05, + : extrême. ° :outlier.

Ces observations suggèrent une interaction entre ILT7 exprimé à la surface des pDC et BST2 exprimé par les cellules tumorales, *in situ* dans la tumeur, contribuant au dysfonctionnement des TApDC. Cette hypothèse est actuellement en cour d'exploration dans notre laboratoire.

6. Altération de la production d'IFN- α par les TApDC : un avantage sélectif pour les tumeurs de l'ovaire

L'altération de la production d'IFN- α a été principalement décrite dans les infections virales chroniques (HIV et HCV) pour empêcher le développement d'une immunité antivirale (Hirsch et al.). L'inhibition de la sécrétion d'IFN- α par les TApDC dans le microenvironnement tumoral pourrait conférer un avantage sélectif aux tumeurs favorisant leur progression.

En effet, l'IFN- α possède de nombreuses propriétés anti-tumorales directes (blocage de la prolifération des cellules tumorales de l'ovaire à la fois *in vitro* (Einhorn et al., 1982; Epstein et al., 1980) et *in vivo* (Berek et al., 1999a; Berek et al., 1999b) et de l'angiogénèse, induction d'apoptose) et indirectes (activation de l'immunité innée/adaptative (revue de la littérature dans (Dunn et al., 2006)), blocage de la prolifération des Treg (Golding et al., ; Pace et al.) et inhibition des cellules souches-like tumorales (Moserle et al., 2008)). Par ailleurs l'IFN- α i) joue un rôle critique dans l'immunosurveillance antitumorale puisque la croissance tumorale est accélérée dans des souris invalidées pour le récepteur à l'IFN- α (IFNAR1) dans différents modèles tumoraux (Dunn et al., 2005) et ii) a été testé dans des approches d'immunothérapie dans différents types de cancers solides et hémopathies malignes avec une certaine efficacité (Kirkwood, 2002). Actuellement on assiste à une renaissance de cette cytokine dans le traitement des leucémies myéloïdes chroniques, la maladie systémique à mastocytes et le syndrome d'hyperéosinophilie (Kiladjian et al.). Ainsi, les TApDC via leur production d'IFN- α pourraient empêcher la progression des tumeurs de l'ovaire à un stade précoce. L'inhibition de la production d'IFN- α représenterait donc une étape critique dans la progression tumorale pour échapper au rôle physiologique des pDC dans l'immunosurveillance antitumorale.

Le développement par la tumeur de mécanismes de régulation inhibant les fonctions innées des pDC suggère que les TApDC seraient activées localement par des ligands endogènes de TLR7 ou 9 interférant avec leur production d'IFN- α . Dans ce contexte il a été décrit la présence permanente dans les tissus tumoraux d'un certain taux d'apoptose et de nécrose des cellules tumorales contribuant au relargage de molécules associées aux dommages tissulaires (*Damage Associated Molecular Patterns*) telles que les molécules d'ARNm et les ADN autologues (Kono and Rock, 2008). Ce mécanisme a été particulièrement étudié dans les maladies auto-immunes telles que le psoriasis et le lupus érythémateux disséminé. Dans ces pathologies, les acides nucléiques dérivant des cellules mortes s'associent avec le peptide antimicrobien LL37 ou des auto-anticorps et activent de façon chronique les récepteurs TLR7/9 des pDC induisant la production de taux élevés d'IFN de type I (Barrat et al., 2005; Ganguly et al., 2009; Lande et al., 2007). Des mécanismes similaires pourraient intervenir

dans le cancer de l'ovaire, vu l'expression par des lignées cellulaires et des tumeurs de l'ovaire de taux élevés de LL37 (Coffelt et al., 2008).

7. L'ascite maligne n'est pas le reflet de la tumeur dans le cancer de l'ovaire

Dans ce travail, nous avons observé des différences majeures entre les pDC d'ascite et les TApDC en termes de fréquence, phénotype, fonction et impact sur l'évolution des patientes ayant un cancer de l'ovaire. Ainsi les pDC s'accumulent dans la majorité des ascites néoplasiques où elles représentent jusqu'à 3% des cellules mononuclées alors qu'elles infiltrent une minorité des tumeurs (18% en IHC).

Nous avons montré par deux techniques différentes (IHC et cytométrie en flux) et sur deux différentes cohortes de patientes que les TApDC ont un impact délétère sur l'évolution des patientes, puisque leur accumulation est associée à une survie sans progression plus courte alors que leur présence à des taux dix fois plus élevés dans les ascites n'a pas d'impact. Par ailleurs, les TApDC apparaissent plus activées avec une expression plus élevée de molécules de costimulation des lymphocytes T CD40 et CD86. Et surtout les TApDC sont altérées dans leur fonction principale, la production d'IFN- α en réponse aux TLR-L 7/9 par rapport aux pDC d'ascite.

Toutes ces différences entre les TApDC et les pDC d'ascite suggèrent que le rôle de ces cellules immunes est différent et possiblement opposé selon le tissu où elles se trouvent. Les pDC joueraient un rôle proinflammatoire dans les ascites et immunosuppresseur dans les tumeurs. La production d'IFN- α par les pDC, en plus d'avoir un effet antitumoral direct, constituerait un important signal pour la différenciation des lymphocytes T effecteurs en faveur d'une réponse immune de type *Th1* (Biron, 2001). La réduction majeure de la production de cette cytokine par les TApDC associée à une réponse T cellulaire de type IL-10 vont altérer de façon significative l'induction d'une réponse immune antitumorale efficace et expliquent le mauvais pronostic lié à la présence de pDC dans les tumeurs. Ainsi les tumeurs peuvent altérer l'immunité en attirant et modifiant les fonctions des pDC.

8. Similitudes des dysfonctionnements des pDC dans l'infection par HIV et le cancer de l'ovaire

Dans ce travail, nous avons observé plusieurs similitudes concernant les altérations fonctionnelles, phénotypiques et quantitatives des pDC chez les patients infectés par le VIH et ceux atteints par un cancer de l'ovaire (CO).

Ainsi, comme chez les patients ayant un CO, ceux infectés par le VIH présentent une déplétion profonde des pDC et des mDC au stade avancé (SIDA), par analogie aux stades III/IV du cancer de l'ovaire, et ont une correction partielle des taux de pDC après traitement par trithérapie antivirale (HAART)(Dillon et al., 2008; Pacanowski et al., 2001; Soumelis et al., 2001) de façon similaire à ce qu'on observe après chimiothérapie. Cette déplétion est au moins en partie due à une augmentation de l'apoptose des pDC circulantes (Meyers et al., 2007).

Par ailleurs, en plus de la déplétion des pDC et des mDC, nous avons observé des taux très bas de lymphocytes T CD4⁺ dont le taux corrèle de façon significative avec celui des pDC circulantes (Barron et al., 2003; Dillon et al., 2008; Killian et al., 2006; Schmidt et al., 2006). Dans le HIV les mécanismes de déplétion des cellules immunes circulantes ont été étudiés de façon extensive, et il en ressort qu'une activation chronique du système immunitaire par le virus aboutit à la mort progressive du système immunitaire (Grossman et al., 2006). Un travail est actuellement en cours au sein de notre équipe sur les mécanismes de lymphopénie, facteur pronostique associé à une survie plus courte des patientes ayant un cancer de l'ovaire (Labidi-Galy et al., 2011). Notre hypothèse est que les patientes lymphopéniques (15% des patientes au diagnostic) ont une activation chronique du système immunitaire.

Chez les patients séropositifs et virémiques (charge virale positive), les pDC ont un phénotype partiellement mature avec augmentation de l'expression des molécules de costimulation CD40 et CD86 (Barron et al., 2003; Dillon et al., 2008; Yokoyama et al., 2003) et murent *in vitro* en réponse aux TLR-L (Dillon et al., 2008). De plus, la production d'IFN- α par les pDC, cytokine antivirale majeure, est également altérée chez les patients infectés par le VIH (Almeida et al., 2005; Donaghy et al., 2001), comme les TApDC.

En conclusion, même si ces deux maladies agressent différemment le système immunitaire, elles aboutissent aux mêmes conséquences. Ces similitudes suggèrent que des mécanismes similaires sont impliqués dans la perturbation de l'homéostasie et le fonctionnement des pDC dans ces deux pathologies.

9. Ciblage thérapeutique des pDC pour induire une immunité antitumorale dans les cancers

Comme nous l'avons vu précédemment, la présence des pDC dans certaines tumeurs a un effet délétère favorisant la progression tumorale mais le mécanisme varie selon la pathologie. Ainsi dans les tumeurs épithéliales du sein et de l'ovaire, cet effet est lié au blocage de la production d'IFN- α en réponse aux TLR-L par des cytokines présentes dans le

microenvironnement tumoral (TNF- α et TGF- β) mais il pourrait également impliquer des molécules exprimées à la surface des cellules tumorales telles que BST2 qui interagirait avec ILT7. Si cette hypothèse se confirme, on pourrait développer un anticorps monoclonal bloquant BST2 et évaluer son efficacité dans des modèles murins de cancers du sein et de l'ovaire.

Dans le MM, les TApDC ont un effet direct sur les cellules tumorales qui sont hématopoïétiques (plasmocytes malins), favorisant leur croissance, leur survie, leur migration et leur chimiorésistance mais la production d'IFN- α en réponse à CpG-A n'est pas altérée (Chauhan et al., 2009). De plus CpG-A restaure la capacité des TApDC à induire une prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et bloque la prolifération tumorale induite par les pDC. Par conséquent, CpG-A semble avoir un potentiel thérapeutique dans le MM.

Dans le cancer du poumon, les TApDC sont altérées pour la production d'IFN- α en réponse à CpGA (Perrot et al., 2007). PF-351676, un oligonucléotide synthétique agoniste de TLR9 (CpG-B)(Krieg, 2006) a été testé en association avec une chimiothérapie par CARBOPLATINE-PACLITAXEL (la chimiothérapie de référence dans le cancer du poumon en Amérique du nord) dans une étude de phase III randomisée incluant 828 patients qui a montré l'absence de bénéfice clinique (Hirsh et al.). L'échec de cette association démontre l'importance d'évaluer la sensibilité de la cible, dans ce contexte les TApDC isolées de tumeurs du poumon, aux TLR9L. En effet, les investigateurs de cette drogue se sont basés dans leurs études précliniques sur des résultats obtenus sur des modèles de souris. Or l'effet de différents TLR-L sur les pDC (maturation, production de cytokines) n'est pas le même chez l'homme et la souris. D'où l'importance d'évaluer au moins *ex vivo* la sensibilité de la cible, dans ce contexte des TApDC triés de tumeurs du poumon chez l'homme, avant d'engager de larges études cliniques incluant des centaines de patients.

En se basant sur nos observations, il n'y a pas d'intérêt à traiter des patientes ayant un cancer du sein ou de l'ovaire par un ligand de TLR9 vu que les TApDC produisent peu d'IFN- α en réponse à ce ligand. Par contre, identifier les mécanismes de cette inhibition et la reverser pourrait constituer une nouvelle stratégie d'immunothérapie.

Au total, il nous semble important d'identifier le mécanisme de dysfonctionnement des pDC qui varie selon la pathologie tumorale afin de développer des thérapeutiques ciblées qui restaurent la fonction des pDC et induisent une réponse immune antitumorale efficace.

10. L'accumulation des Treg dans les tumeurs de l'ovaire est associée à un meilleur pronostic

Les lymphocytes T régulateurs ont été largement étudiés dans le cancer de l'ovaire. Comme précédemment rapporté par Curiel et al (Curiel et al., 2004b), nous avons retrouvé une accumulation des Treg $CD4^+CD25^{high}CD127^-$ dans les ascites malignes et les cancers épithéliaux de l'ovaire où ils représentent jusqu'à 30% des lymphocytes T $CD4^+$. Cependant et contrairement à une étude récemment publiée (Napoletano et al.), nous n'avons pas observé d'augmentation significative des Treg dans le sang des patientes par rapport aux donneurs sains.

Les TATreg ont un phénotype activé par rapport aux Treg d'ascite et du sang avec une augmentation de l'expression des molécules d'activation GITR, HLA-DR, CD69 et ICOS suggérant une activation *in situ* des TATreg. Ces observations sont similaires à ce que notre équipe a précédemment rapporté dans le cancer du sein (Gobert et al., 2009).

Les TATreg sont fonctionnels puisqu'ils sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T conventionnels $CD4^+CD25^-$. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Curiel et al qui ont montré une capacité suppressive similaire des TATreg, des Treg d'ascite et du sang (Curiel et al., 2004b). De façon surprenante, aussi bien les TATreg que les Treg d'ascite inhibent la production d'IL-10 par les Tconv autologues. Ceci est en contradiction avec ce que nous avons observé dans le cancer du sein (Gobert, 2008) et avec les observations de Curiel et al pour les Treg d'ascite (Curiel et al., 2004b).

A notre connaissance au moins 8 études se sont intéressées à la signification clinique de la présence de Treg dans les cancers de l'ovaire (Barnett et al., ; Curiel et al., 2004b; Leffers et al., 2009; Milne et al., 2009; Sato et al., 2005; Shah et al., 2008; Tsiatas et al., 2009; Wolf et al., 2005) mais une seule a comporté une étude fonctionnelle et phénotypique des TATreg (Curiel et al., 2004b). Les résultats rapportés concernant l'impact sur la survie sont contradictoires. En effet, certaines études ont montré un effet délétère des TATreg (Curiel et al., 2004b; Wolf et al., 2005), alors que d'autres montrent au contraire un effet protecteur (Leffers et al., 2009; Milne et al., 2009; Tsiatas et al., 2009) ou pas d'impact sur la survie des patientes (Barnett et al., ; Sato et al., 2005; Shah et al., 2008).

La localisation des Treg dans le parenchyme tumoral semble influencer leur impact sur la survie des patients cancéreux (Menetrier-Caux et al., 2009). Ainsi, dans le cancer du colon, les Treg intratumoraux sont associés à un bon pronostic alors que leur présence dans le tissu normal est au contraire délétère (Salama et al., 2009). Dans le contexte du cancer de l'ovaire, deux études réalisées en IHC montrent un effet protecteur des Treg $Foxp3^+$ situés dans l'épithélium tumoral (Leffers et al., 2009; Milne et al., 2009). A l'inverse, deux études ont montré un effet délétère des TATreg (Curiel et al., 2004b; Wolf et al., 2005). La première

publiée en 2004 (Curiel et al., 2004b) a identifié les Treg par un double marquage CD4⁺CD25⁺. Or, CD25 (IL-2R α) étant également exprimé par les lymphocytes T CD4⁺ activés (Tact), l'utilisation de ce marqueur ne semble pas appropriée pour discriminer les Treg et les Tact. En effet, jusqu'à 40% des lymphocytes T CD4⁺ du sang peuvent exprimer CD25 sans qu'ils aient une activité suppressive (Baecher-Allan et al., 2001). La deuxième étude a analysé l'impact sur la survie en se basant sur l'expression de l'ARNm par PCR quantitative du facteur de transcription Foxp3 (Wolf et al., 2005), actuellement reconnu comme le meilleur marqueur des Treg chez l'homme (Hori et al., 2003; Williams and Rudensky, 2007). Contrairement à l'IHC, cette méthode de quantification de l'ARNm ne permet pas d'identifier ni la morphologie ni la localisation des cellules exprimant Foxp3. Or, il a été récemment montré que Foxp3 peut aussi être exprimé par les cellules tumorales (revue de la littérature dans (Martin et al.)), notamment dans le cancer de l'ovaire (Zhang and Sun) où il agirait comme un gène suppresseur de tumeur. Il est également exprimé par des macrophages intratumoraux qui exercent un effet suppresseur sur les lymphocytes T, favorisant la progression tumorale (Manrique et al.). Les Treg intratumoraux doivent donc être identifiés à la fois comme des lymphocytes par leur morphologie et par l'expression de la protéine Foxp3 en IHC.

Au cours de notre travail, nous avons identifié les Treg intratumoraux à la fois sur la base de i) leur morphologie lymphocytaire et ii) deux phénotypes différents, CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ (Liu et al., 2006) en cytométrie en flux et Foxp3⁺ en IHC. Nous avons étudié leur impact sur la survie des patientes et nous avons montré que les TATreg ont un effet protecteur car leur accumulation dans les tumeurs au diagnostic et après chimiothérapie néoadjuvante est associée à une plus longue survie sans progression.

L'accumulation des TATreg Foxp3⁺ est un facteur de mauvais pronostic dans de nombreuses tumeurs solides, notamment le cancer du sein (Gobert et al., 2009), du pancréas (Hiraoka et al., 2006) et le carcinome hépatocellulaire (Gao et al., 2007). Un rôle protecteur des TATreg a été décrit dans les tumeurs ORL (Badoual et al., 2006) et le cancer du colon (Salama et al., 2009). Dans le cancer du colon (CRC), cet effet protecteur a été étudié sur des modèles murins (revue de la littérature dans (Erdman and Poutahidis)) où les Treg exerceraient un rétrocontrôle négatif bloquant l'inflammation et par conséquent la carcinogénèse. Les colites associées aux CRC sont riches en cytokines proinflammatoires telles que TNF- α et IL-6 qui sont nécessaires à la progression tumorale (Balkwill and Coussens, 2004). L'administration de traitements anti-inflammatoires tels que des anticorps anti-TNF- α dans des modèles tumoraux

murins réduit le nombre de cellules Foxp3⁺ circulantes et augmente le nombre de cellules Foxp3⁺ infiltrant les tumeurs parallèlement à leur régression (Erdman and Poutahidis).

L'effet protecteur des TATreg dans le cancer de l'ovaire pourrait être expliqué en partie par l'inhibition de la production d'IL-10, une cytokine immunosuppressive, par les TATconv. Au contraire dans le cancer du sein, notre équipe a récemment montré que l'accumulation des TATreg dans les agrégats lymphoïdes était associée à un mauvais pronostic et que ces Treg sont incapables de réguler la production d'IL-10 par les TATconv (Gobert, 2008; Gobert et al., 2009). Une étude fonctionnelle comparative plus approfondie entre les TATreg et les Treg d'ascite, notamment de leur potentiel suppressif et de la production d'autres cytokines en *Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester* (CFSE) est nécessaire afin de corrélérer les altérations fonctionnelles avec l'impact sur la survie des patientes.

11. L'augmentation des TATreg après chimiothérapie néoadjuvante est de bon pronostic

La majorité des études dans le cancer de l'ovaire se sont focalisées sur l'immunité antitumorale au diagnostic (Nelson, 2008) et certaines ont étudié l'évolution des populations immunes circulantes au cours de la maladie (Feng et al., 2009; Labidi-Galy et al., ; Napoletano et al.). En revanche, peu d'études ont analysé l'impact de la chimiothérapie sur l'immunité intratumorale. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'effet de la chimiothérapie néoadjuvante sur la réponse immune intratumorale de type Treg.

Nous avons ainsi observé 3 types de réponses quantitatives: augmentation des TATreg, pas de changement et diminution des TATreg. De façon intéressante, les patientes dont les tumeurs ont augmenté leur infiltration par les TATreg après chimiothérapie néoadjuvante ont un meilleur pronostic. Ces observations suggèrent que la chimiothérapie, en plus d'un effet antitumoral direct, induit une réponse immune, qui peut-être bénéfique ou délétère pour le patient.

Les Treg sont connus pour leur plasticité, pouvant se transformer en périphérie en lymphocytes T effecteurs ou *Th17* (revue de la littérature dans (Zhou et al., 2009)). Il serait intéressant d'analyser de façon approfondie et comparer les fonctions des TATreg avant et après chimiothérapie néoadjuvante.

Les agents de chimiothérapie administrés dans le cancer de l'ovaire ont des propriétés immunostimulantes. Chez l'homme, les taxanes induisent une lymphopénie transitoire mais peuvent également augmenter l'activité des lymphocytes T et NK (Carson et al., 2004; Fitzpatrick and Wheeler, 2003) et augmentent l'infiltration des tumeurs du sein par les

lymphocytes T (Demaria et al., 2001). Chez la souris, le docetaxel n'altère pas la fonction suppressive des Treg mais augmente la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8⁺ (Garnett et al., 2008). Les sels de platine peuvent eux aussi avoir un effet immunologique bénéfique en augmentant la synthèse des cytokines par les lymphocytes T (Riesbeck, 1999), en bloquant la fonction suppressive des lymphocytes T en particulier dans le cancer de l'ovaire (Tsuda et al., 1994) et en augmentant la réponse cellulaire T CD8⁺ aux antigènes viraux (Coleman et al., 2005). L'effet immunostimulant ou immunobloquant de la chimiothérapie varie probablement d'un patient à un autre en fonction de l'état d'activation de son système immunitaire.

Conclusion

Le cancer de l'ovaire constitue un bon modèle pour l'étude de l'immunité antitumorale chez l'homme. A travers ce travail, nous nous sommes intéressés à deux populations immunes connues pour participer à la tolérance vis-à-vis des tumeurs. Nos observations sur les altérations fonctionnelles et phénotypiques des pDC associées aux tumeurs ainsi que l'effet délétère de leur accumulation en intratumoral sur l'évolution clinique des patientes apportent de nouveaux éléments pour la compréhension des interactions entre les tumeurs et le système immunitaire. L'identification des mécanismes impliqués dans l'altération fonctionnelle des pDC permettra le développement de nouvelles stratégies d'immunothérapies ciblées dans le cancer de l'ovaire.

Nos travaux sur les Treg dans le cancer de l'ovaire montrent, de façon inattendue, que ces cellules ont un effet protecteur dans cette pathologie. De plus, nous avons rapporté que les patientes dont l'infiltration intratumorale par ces cellules augmente sous chimiothérapie ont un meilleur pronostic. Il s'agit là d'observations originales car c'est le premier travail, à notre connaissance, qui s'intéresse à la corrélation entre immunité intratumorale sous chimiothérapie (et non pas seulement au diagnostic) et évolution clinique dans le cancer de l'ovaire. Une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels les Treg exercent un effet protecteur permettra de développer des immunothérapies qui renforcent cet effet bénéfique dans cette pathologie.

Références

- Almeida, M., Cordero, M., Almeida, J., and Orfao, A. (2005). Different subsets of peripheral blood dendritic cells show distinct phenotypic and functional abnormalities in HIV-1 infection. *Aids* *19*, 261-271.
- Alvaro, T., Lejeune, M., Salvado, M. T., Lopez, C., Jaen, J., Bosch, R., and Pons, L. E. (2006). Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiologic behavior in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol* *24*, 5350-5357.
- Badoual, C., Hans, S., Rodriguez, J., Peyrard, S., Klein, C., Agueznay Nel, H., Mosseri, V., Laccourreye, O., Bruneval, P., Fridman, W. H., *et al.* (2006). Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res* *12*, 465-472.
- Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J., and Hafler, D. A. (2001). CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* *167*, 1245-1253.
- Balkwill, F., and Coussens, L. M. (2004). Cancer: an inflammatory link. *Nature* *431*, 405-406.
- Bamias, A., Koutsoukou, V., Terpos, E., Tsiatas, M. L., Liakos, C., Tsitsilonis, O., Rodolakis, A., Voulgaris, Z., Vlahos, G., Papageorgiou, T., *et al.* (2008). Correlation of NK T-like CD3+CD56+ cells and CD4+CD25+(hi) regulatory T cells with VEGF and TNFalpha in ascites from advanced ovarian cancer: Association with platinum resistance and prognosis in patients receiving first-line, platinum-based chemotherapy. *Gynecol Oncol* *108*, 421-427.
- Barnett, J. C., Bean, S. M., Whitaker, R. S., Kondoh, E., Baba, T., Fujii, S., Marks, J. R., Dressman, H. K., Murphy, S. K., and Berchuck, A. Ovarian cancer tumor infiltrating T-regulatory (T(reg)) cells are associated with a metastatic phenotype. *Gynecol Oncol* *116*, 556-562.
- Barrat, F. J., Meeker, T., Gregorio, J., Chan, J. H., Uematsu, S., Akira, S., Chang, B., Duramad, O., and Coffman, R. L. (2005). Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* *202*, 1131-1139.
- Barron, M. A., Blyveis, N., Palmer, B. E., MaWhinney, S., and Wilson, C. C. (2003). Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *J Infect Dis* *187*, 26-37.
- Bekeredjian-Ding, I., Schafer, M., Hartmann, E., Pries, R., Parcina, M., Schneider, P., Giese, T., Endres, S., Wollenberg, B., and Hartmann, G. (2009). Tumour-derived prostaglandin E and transforming growth factor-beta synergize to inhibit plasmacytoid dendritic cell-derived interferon-alpha. *Immunology* *128*, 439-450.
- Berek, J. S., Markman, M., Blessing, J. A., Kucera, P. R., Nelson, B. E., Anderson, B., and Hanjani, P. (1999a). Intraperitoneal alpha-interferon alternating with cisplatin in residual ovarian carcinoma: a phase II Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* *74*, 48-52.
- Berek, J. S., Markman, M., Stonebraker, B., Lentz, S. S., Adelson, M. D., DeGeest, K., and Moore, D. (1999b). Intraperitoneal interferon-alpha in residual ovarian carcinoma: a phase II gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol* *75*, 10-14.
- Biron, C. A. (2001). Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity* *14*, 661-664.
- Cao, W., Bover, L., Cho, M., Wen, X., Hanabuchi, S., Bao, M., Rosen, D. B., Wang, Y. H., Shaw, J. L., Du, Q., *et al.* (2009). Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction. *J Exp Med* *206*, 1603-1614.
- Cao, W., Rosen, D. B., Ito, T., Bover, L., Bao, M., Watanabe, G., Yao, Z., Zhang, L., Lanier, L. L., and Liu, Y. J. (2006). Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *J Exp Med* *203*, 1399-1405.

Carson, W. E., 3rd, Shapiro, C. L., Crespin, T. R., Thornton, L. M., and Andersen, B. L. (2004). Cellular immunity in breast cancer patients completing taxane treatment. *Clin Cancer Res* *10*, 3401-3409.

Chauhan, D., Singh, A. V., Brahmandam, M., Carrasco, R., Bandi, M., Hideshima, T., Bianchi, G., Podar, K., Tai, Y. T., Mitsiades, C., *et al.* (2009). Functional interaction of plasmacytoid dendritic cells with multiple myeloma cells: a therapeutic target. *Cancer Cell* *16*, 309-323.

Coffelt, S. B., Waterman, R. S., Florez, L., Honer zu Bentrup, K., Zwezdaryk, K. J., Tomchuck, S. L., LaMarca, H. L., Danka, E. S., Morris, C. A., and Scandurro, A. B. (2008). Ovarian cancers overexpress the antimicrobial protein hCAP-18 and its derivative LL-37 increases ovarian cancer cell proliferation and invasion. *Int J Cancer* *122*, 1030-1039.

Coleman, S., Clayton, A., Mason, M. D., Jasani, B., Adams, M., and Tabi, Z. (2005). Recovery of CD8⁺ T-cell function during systemic chemotherapy in advanced ovarian cancer. *Cancer Res* *65*, 7000-7006.

Contractor, N., Louten, J., Kim, L., Biron, C. A., and Kelsall, B. L. (2007). Cutting edge: Peyer's patch plasmacytoid dendritic cells (pDCs) produce low levels of type I interferons: possible role for IL-10, TGFbeta, and prostaglandin E2 in conditioning a unique mucosal pDC phenotype. *J Immunol* *179*, 2690-2694.

Crawford, J., Dale, D. C., and Lyman, G. H. (2004). Chemotherapy-induced neutropenia: risks, consequences, and new directions for its management. *Cancer* *100*, 228-237.

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.

Demaria, S., Volm, M. D., Shapiro, R. L., Yee, H. T., Oratz, R., Formenti, S. C., Muggia, F., and Symmans, W. F. (2001). Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy. *Clin Cancer Res* *7*, 3025-3030.

Dillon, S. M., Robertson, K. B., Pan, S. C., Mawhinney, S., Meditz, A. L., Folkvord, J. M., Connick, E., McCarter, M. D., and Wilson, C. C. (2008). Plasmacytoid and myeloid dendritic cells with a partial activation phenotype accumulate in lymphoid tissue during asymptomatic chronic HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* *48*, 1-12.

Domschke, C., Schuetz, F., Ge, Y., Seibel, T., Falk, C., Brors, B., Vlodaysky, I., Sommerfeldt, N., Sinn, H. P., Kuhnle, M. C., *et al.* (2009). Intratumoral cytokines and tumor cell biology determine spontaneous breast cancer-specific immune responses and their correlation to prognosis. *Cancer Res* *69*, 8420-8428.

Donaghy, H., Pozniak, A., Gazzard, B., Qazi, N., Gilmour, J., Gotch, F., and Patterson, S. (2001). Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* *98*, 2574-2576.

Dunn, G. P., Bruce, A. T., Sheehan, K. C., Shankaran, V., Uppaluri, R., Bui, J. D., Diamond, M. S., Koebel, C. M., Arthur, C., White, J. M., and Schreiber, R. D. (2005). A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunol* *6*, 722-729.

Dunn, G. P., Koebel, C. M., and Schreiber, R. D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* *6*, 836-848.

Duramad, O., Fearon, K. L., Chan, J. H., Kanzler, H., Marshall, J. D., Coffman, R. L., and Barrat, F. J. (2003). IL-10 regulates plasmacytoid dendritic cell response to CpG-containing immunostimulatory sequences. *Blood* *102*, 4487-4492.

Dzionic, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Gunther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., *et al.* (2001). BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med* 194, 1823-1834.

Einhorn, N., Cantell, K., Einhorn, S., and Strander, H. (1982). Human leukocyte interferon therapy for advanced ovarian carcinoma. *Am J Clin Oncol* 5, 167-172.

Epstein, L. B., Shen, J. T., Abele, J. S., and Reese, C. C. (1980). Sensitivity of human ovarian carcinoma cells to interferon and other antitumor agents as assessed by an in vitro semi-solid agar technique. *Ann N Y Acad Sci* 350, 228-244.

Erdman, S. E., and Poutahidis, T. Roles for inflammation and regulatory T cells in colon cancer. *Toxicol Pathol* 38, 76-87.

Fabricius, D., Neubauer, M., Mandel, B., Schutz, C., Viardot, A., Vollmer, A., Jahrsdorfer, B., and Debatin, K. M. Prostaglandin E2 inhibits IFN-alpha secretion and Th1 costimulation by human plasmacytoid dendritic cells via E-prostanoid 2 and E-prostanoid 4 receptor engagement. *J Immunol* 184, 677-684.

Feng, Q. M., Di, W., and Wu, X. (2009). [Immune reconstitution in advanced ovarian cancer patients undergoing first line chemotherapy]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 25, 1023-1025.

Fitzpatrick, F. A., and Wheeler, R. (2003). The immunopharmacology of paclitaxel (Taxol), docetaxel (Taxotere), and related agents. *Int Immunopharmacol* 3, 1699-1714.

Ganguly, D., Chamilos, G., Lande, R., Gregorio, J., Meller, S., Facchinetti, V., Homey, B., Barrat, F. J., Zal, T., and Gilliet, M. (2009). Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med* 206, 1983-1994.

Gao, Q., Qiu, S. J., Fan, J., Zhou, J., Wang, X. Y., Xiao, Y. S., Xu, Y., Li, Y. W., and Tang, Z. Y. (2007). Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol* 25, 2586-2593.

Garnett, C. T., Schlom, J., and Hodge, J. W. (2008). Combination of docetaxel and recombinant vaccine enhances T-cell responses and antitumor activity: effects of docetaxel on immune enhancement. *Clin Cancer Res* 14, 3536-3544.

Giuliani, N., Storti, P., Bolzoni, M., Palma, B. D., and Bonomini, S. Angiogenesis and Multiple Myeloma. *Cancer Microenviron*.

Gobert, M. (2008) Le cancer du sein, un environnement immunotolérant : émergence, mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs CD4+ CD25+ et relations avec les cellules dendritiques plasmacytoïdes, Université Claude Bernard, Lyon I, Lyon.

Gobert, M., Treilleux, I., Bendriss-Vermare, N., Bachelot, T., Goddard-Leon, S., Arfi, V., Biota, C., Doffin, A. C., Durand, I., Olive, D., *et al.* (2009). Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res* 69, 2000-2009.

Golding, A., Rosen, A., Petri, M., Akhter, E., and Andrade, F. Interferon-alpha regulates the dynamic balance between human activated regulatory and effector T cells: implications for antiviral and autoimmune responses. *Immunology* 131, 107-117.

Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Paul, W. E., and Picker, L. J. (2006). Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med* 12, 289-295.

Hartmann, E., Wollenberg, B., Rothenfusser, S., Wagner, M., Wellisch, D., Mack, B., Giese, T., Gires, O., Endres, S., and Hartmann, G. (2003). Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* 63, 6478-6487.

Hefler, L. A., Zeillinger, R., Grimm, C., Sood, A. K., Cheng, W. F., Gadducci, A., Tempfer, C. B., and Reinthaller, A. (2006). Preoperative serum vascular endothelial growth factor as a prognostic parameter in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 103, 512-517.

Hiraoka, N., Onozato, K., Kosuge, T., and Hirohashi, S. (2006). Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res* *12*, 5423-5434.

Hirsch, I., Caux, C., Hasan, U., Bendriss-Vermare, N., and Olive, D. Impaired Toll-like receptor 7 and 9 signaling: from chronic viral infections to cancer. *Trends Immunol* *31*, 391-397.

Hirsh, V., Paz-Ares, L., Boyer, M., Rosell, R., Middleton, G., Eberhardt, W. E., Szczesna, A., Reiterer, P., Saleh, M., Arrieta, O., *et al.* Randomized Phase III Trial of Paclitaxel/Carboplatin With or Without PF-3512676 (Toll-Like Receptor 9 Agonist) As First-Line Treatment for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* *29*, 2667-2674.

Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., and Taniguchi, T. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* *434*, 772-777.

Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* *299*, 1057-1061.

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

Kiladjian, J. J., Mesa, R. A., and Hoffman, R. The renaissance of interferon therapy for the treatment of myeloid malignancies. *Blood* *117*, 4706-4715.

Killian, M. S., Fujimura, S. H., Hecht, F. M., and Levy, J. A. (2006). Similar changes in plasmacytoid dendritic cell and CD4 T-cell counts during primary HIV-1 infection and treatment. *Aids* *20*, 1247-1252.

Kirkwood, J. (2002). Cancer immunotherapy: the interferon-alpha experience. *Semin Oncol* *29*, 18-26.

Kono, H., and Rock, K. L. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* *8*, 279-289.

Krieg, A. M. (2006). Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* *5*, 471-484.

Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z. K., Endres, S., Krieg, A. M., and Hartmann, G. (2001). Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* *31*, 2154-2163.

Labidi-Galy, S. I., Sisirak, V., Meeus, P., Gobert, M., Treilleux, I., Bajard, A., Combes, J. D., Faget, J., Mithieux, F., Cassignol, A., *et al.* Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer. *Cancer Res*.

Labidi-Galy, S. I., Treilleux, I., Bajard, A., Tredan, O., Meeus, P., Guastalla, J. P., Ménétrier-Caux, C., Blay, J. Y., Bendriss-Vermare, N., and Ray-Coquard, I. (2011). Lymphopenia is an independent prognostic factor in ovarian cancer and could be associated with immune activation Paper presented at: ESMO annual meeting (Stockholm).

Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y. H., Homey, B., Cao, W., Wang, Y. H., Su, B., Nestle, F. O., *et al.* (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* *449*, 564-569.

Leffers, N., Gooden, M. J., de Jong, R. A., Hooijboom, B. N., ten Hoor, K. A., Hollema, H., Boezen, H. M., van der Zee, A. G., Daemen, T., and Nijman, H. W. (2009). Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother* *58*, 449-459.

Li, L., Liu, S., Zhang, T., Pan, W., Yang, X., and Cao, X. (2008). Splenic stromal microenvironment negatively regulates virus-activated plasmacytoid dendritic cells through TGF-beta. *J Immunol* *180*, 2951-2956.

Liu, W., Putnam, A. L., Xu-Yu, Z., Szot, G. L., Lee, M. R., Zhu, S., Gottlieb, P. A., Kapranov, P., Gingeras, T. R., Fazekas de St Groth, B., *et al.* (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med* 203, 1701-1711.

Manches, O., Munn, D., Fallahi, A., Lifson, J., Chaperot, L., Plumas, J., and Bhardwaj, N. (2008). HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *J Clin Invest* 118, 3431-3439.

Manrique, S. Z., Correa, M. A., Hoelzinger, D. B., Dominguez, A. L., Mirza, N., Lin, H. H., Stein-Streilein, J., Gordon, S., and Lustgarten, J. Foxp3-positive macrophages display immunosuppressive properties and promote tumor growth. *J Exp Med* 208, 1485-1499.

Martin, F., Ladoire, S., Mignot, G., Apetoh, L., and Ghiringhelli, F. Human FOXP3 and cancer. *Oncogene* 29, 4121-4129.

Menetrier-Caux, C., Gobert, M., and Caux, C. (2009). Differences in tumor regulatory T-cell localization and activation status impact patient outcome. *Cancer Res* 69, 7895-7898.

Meyers, J. H., Justement, J. S., Hallahan, C. W., Blair, E. T., Sun, Y. A., O'Shea, M. A., Roby, G., Kottlilil, S., Moir, S., Kovacs, C. M., *et al.* (2007). Impact of HIV on cell survival and antiviral activity of plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* 2, e458.

Milne, K., Kobel, M., Kalloger, S. E., Barnes, R. O., Gao, D., Gilks, C. B., Watson, P. H., and Nelson, B. H. (2009). Systematic analysis of immune infiltrates in high-grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors. *PLoS One* 4, e6412.

Moseman, E. A., Liang, X., Dawson, A. J., Panoskaltsis-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.

Moserle, L., Indraccolo, S., Ghisi, M., Frasson, C., Fortunato, E., Canevari, S., Miotti, S., Tosello, V., Zamarchi, R., Corradin, A., *et al.* (2008). The side population of ovarian cancer cells is a primary target of IFN-alpha antitumor effects. *Cancer Res* 68, 5658-5668.

Napoletano, C., Bellati, F., Landi, R., Pauselli, S., Marchetti, C., Visconti, V., Sale, P., Liberati, M., Rughetti, A., Frati, L., *et al.* Ovarian cancer cytoreduction induces changes in T cell population subsets reducing immunosuppression. *J Cell Mol Med* 14, 2748-2759.

Nelson, B. H. (2008). The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol Rev* 222, 101-116.

O'Keeffe, M., Grumont, R. J., Hochrein, H., Fuchsberger, M., Gugasyan, R., Vremec, D., Shortman, K., and Gerondakis, S. (2005). Distinct roles for the NF-kappaB1 and c-Rel transcription factors in the differentiation and survival of plasmacytoid and conventional dendritic cells activated by TLR-9 signals. *Blood* 106, 3457-3464.

Pacanowski, J., Kahi, S., Baillet, M., Lebon, P., Deveau, C., Goujard, C., Meyer, L., Oksenhendler, E., Sinet, M., and Hosmalin, A. (2001). Reduced blood CD123⁺ (lymphoid) and CD11c⁺ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood* 98, 3016-3021.

Pace, L., Vitale, S., Dettori, B., Palombi, C., La Sorsa, V., Belardelli, F., Proietti, E., and Doria, G. APC activation by IFN-alpha decreases regulatory T cell and enhances Th cell functions. *J Immunol* 184, 5969-5979.

Palucka, A. K., Blanck, J. P., Bennett, L., Pascual, V., and Banchereau, J. (2005). Cross-regulation of TNF and IFN-alpha in autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3372-3377.

Perrot, I., Blanchard, D., Freymond, N., Isaac, S., Guibert, B., Pacheco, Y., and Lebecque, S. (2007). Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage. *J Immunol* 178, 2763-2769.

Riesbeck, K. (1999). Cisplatin at clinically relevant concentrations enhances interleukin-2 synthesis by human primary blood lymphocytes. *Anticancer Drugs* *10*, 219-227.

Salama, P., Phillips, M., Grieu, F., Morris, M., Zeps, N., Joseph, D., Platell, C., and Iacopetta, B. (2009). Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol* *27*, 186-192.

Sato, E., Olson, S. H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A. A., Frosina, D., Gnjatic, S., Ambrosone, C., *et al.* (2005). Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 18538-18543.

Schmidt, B., Fujimura, S. H., Martin, J. N., and Levy, J. A. (2006). Variations in plasmacytoid dendritic cell (PDC) and myeloid dendritic cell (MDC) levels in HIV-infected subjects on and off antiretroviral therapy. *J Clin Immunol* *26*, 55-64.

Schnurr, M., Toy, T., Shin, A., Hartmann, G., Rothenfusser, S., Soellner, J., Davis, I. D., Cebon, J., and Maraskovsky, E. (2004). Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells. *Blood* *103*, 1391-1397.

Shah, C. A., Allison, K. H., Garcia, R. L., Gray, H. J., Goff, B. A., and Swisher, E. M. (2008). Intratumoral T cells, tumor-associated macrophages, and regulatory T cells: association with p53 mutations, circulating tumor DNA and survival in women with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* *109*, 215-219.

Sharma, M. D., Baban, B., Chandler, P., Hou, D. Y., Singh, N., Yagita, H., Azuma, M., Blazar, B. R., Mellor, A. L., and Munn, D. H. (2007). Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* *117*, 2570-2582.

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.

Shin, A., Toy, T., Rothenfusser, S., Robson, N., Vorac, J., Dauer, M., Stuplich, M., Endres, S., Cebon, J., Maraskovsky, E., and Schnurr, M. (2008). P2Y receptor signaling regulates phenotype and IFN- α secretion of human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* *111*, 3062-3069.

Sisirak V, G. M., Renaudineau S, Menetrier-Caux C, Asford C, Banchereau J, Palucka AK, Blay JY, Caux C, Bendriss-Vermare N (2008). Breast carcinoma environment inhibits human plasmacytoid dendritic cells functions. In the 10th international symposium on dendritic cells(kobe, japan).

Son, Y., Ito, T., Ozaki, Y., Tanijiri, T., Yokoi, T., Nakamura, K., Takebayashi, M., Amakawa, R., and Fukuhara, S. (2006). Prostaglandin E2 is a negative regulator on human plasmacytoid dendritic cells. *Immunology* *119*, 36-42.

Soumelis, V., Scott, I., Gheyas, F., Bouhour, D., Cozon, G., Cotte, L., Huang, L., Levy, J. A., and Liu, Y. J. (2001). Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* *98*, 906-912.

Tjomsland, V., Sandstrom, P., Spangeus, A., Messmer, D., Emilsson, J., Falkmer, U., Falkmer, S., Magnusson, K. E., Borch, K., and Larsson, M. Pancreatic adenocarcinoma exerts systemic effects on the peripheral blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells: an indicator of disease severity? *BMC Cancer* *10*, 87.

Treilleux, I., Blay, J. Y., Bendriss-Vermare, N., Ray-Coquard, I., Bachelot, T., Guastalla, J. P., Bremond, A., Goddard, S., Pin, J. J., Barthelemy-Dubois, C., and Lebecque, S. (2004). Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* *10*, 7466-7474.

Tsiatas, M. L., Gyftaki, R., Liacos, C., Politi, E., Rodolakis, A., Dimopoulos, M. A., and Bamias, A. (2009). Study of T lymphocytes infiltrating peritoneal metastases in advanced

ovarian cancer: associations with vascular endothelial growth factor levels and prognosis in patients receiving platinum-based chemotherapy. *Int J Gynecol Cancer* 19, 1329-1334.

Tsuda, H., Kitahashi, S., Umesaki, N., Kanaoka, Y., Kawabata, M., and Ogita, S. (1994). Abrogation of suppressor cells activity by cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) treatment using therapeutic doses in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol* 52, 218-221.

Tsukamoto, N., Okada, S., Onami, Y., Sasaki, Y., Umezawa, K., and Kawakami, Y. (2009). Impairment of plasmacytoid dendritic cells for IFN production by the ligand for immunoglobulin-like transcript 7 expressed on human cancer cells. *Clin Cancer Res* 15, 5733-5743.

Wei, S., Kryczek, I., Zou, L., Daniel, B., Cheng, P., Mottram, P., Curiel, T., Lange, A., and Zou, W. (2005). Plasmacytoid dendritic cells induce CD8⁺ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 65, 5020-5026.

Wertel, I., Polak, G., Bednarek, W., Barczynski, B., Rolinski, J., and Kotarski, J. (2008). Dendritic cell subsets in the peritoneal fluid and peripheral blood of women suffering from ovarian cancer. *Cytometry B Clin Cytom* 74, 251-258.

Williams, L. M., and Rudensky, A. Y. (2007). Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol* 8, 277-284.

Wolf, D., Wolf, A. M., Rumpold, H., Fiegl, H., Zeimet, A. G., Muller-Holzner, E., Deibl, M., Gastl, G., Gunsilius, E., and Marth, C. (2005). The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 11, 8326-8331.

Yokoyama, Y., Charnock-Jones, D. S., Licence, D., Yanaihara, A., Hastings, J. M., Holland, C. M., Emoto, M., Umemoto, M., Sakamoto, T., Sato, S., *et al.* (2003). Vascular endothelial growth factor-D is an independent prognostic factor in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 88, 237-244.

Zhang, H. Y., and Sun, H. Up-regulation of Foxp3 inhibits cell proliferation, migration and invasion in epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett* 287, 91-97.

Zhou, L., Chong, M. M., and Littman, D. R. (2009). Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation. *Immunity* 30, 646-655.

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.

Résumé

Le cancer de l'ovaire est immunogène et constitue un bon modèle pour étudier l'immunité antitumorale. Nous avons effectué une étude comparative et systématique de la fréquence, du phénotype, de la fonction et de l'impact sur la survie des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et des lymphocytes T régulateurs (Treg) dans le sang, l'ascite et la tumeur. Nous avons observé que les pDC s'accumulent dans les ascites et sont présentes dans certaines tumeurs alors qu'elles sont profondément déplétées dans le sang des patientes. La présence de pDC associées aux tumeurs (TApDC) est un facteur pronostique indépendant associé à une survie sans progression (SSP) plus courte. De plus, les TApDC, mais pas les pDC d'ascite, sont altérées dans leur fonction innée principale de production d'IFN- α en réponse aux TLR ligands *in vitro* et induisent le développement de lymphocytes T CD4⁺ producteurs d'IL-10 responsables d'une tolérance immunitaire favorisant la progression tumorale. Les Treg s'accumulent dans les ascites et les tumeurs de l'ovaire mais leur taux dans le sang est comparable aux donneurs sains. Leur accumulation dans les tumeurs et non dans les ascites est un facteur pronostique indépendant associé à une SSP plus longue. Les TATreg ont un phénotype activé et inhibent la production d'IL-10 par les lymphocytes T CD4⁺ conventionnels associés aux tumeurs. De façon intéressante, les patientes dont les tumeurs augmentent l'infiltration par les Treg Foxp3⁺ après chimiothérapie néoadjuvante ont une rechute retardée suggérant qu'en plus d'un effet antitumoral direct, la chimiothérapie induit une réponse immunitaire.

Title:

Functional and phenotypical alterations of plasmacytoid dendritic cells and regulatory T cells in ovarian cancer

Abstract

Ovarian cancer (OC) is an immunogenic disease and represents a good model for studying antitumoral immunity. We performed a systematic comparison between plasmacytoid dendritic cells (pDC) and regulatory T cells (Treg) in blood, ascites, and tumors in term of frequencies, phenotypes, functions, and impact on outcome of OC patients. We found that pDC accumulate in ascites and are present in some tumors whereas they are profoundly depleted in patients' blood. Their presence within tumors (but not ascites) is deleterious because associated with early relapse of OC patients. Moreover, Tumor associated pDC (TApDC) but not ascite pDC were altered in their innate function, i.e. the production of IFN- α in response to TLR ligands *in vitro*, and they induce the development of IL-10⁺ CD4⁺T cells. All these results suggest that TApDC but not ascite pDC induce immune tolerance allowing cancer progression. Treg accumulate in ascites and tumors but their levels in patients' blood were not increased. Their accumulation in tumors, but not ascites, was an independent prognostic factor associated with delayed relapse. TATreg showed an activated phenotype and inhibit IL-10 production by CD4⁺conventional TAT cells. Interestingly, patients whose tumor infiltration by Foxp3⁺ Treg is increased after neoadjuvant chemotherapy showed delayed relapse suggesting that chemotherapy, in addition to its direct antitumoral effect, induces an immune response.

Discipline

Immunologie

Mots clés

Cellules dendritiques plasmacytoïdes, lymphocytes T régulateurs, cancer de l'ovaire, tolérance
Plasmacytoid dendritic cell, regulatory T cell, ovarian cancer, tolerance

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL)

Département Immunité, Virus et Microenvironnement

UMR INSERM 1052 - CNRS 5286

Equipe 11 "Ciblage thérapeutique de la cellule tumorale et de son environnement immunitaire" (Pr JY Blay & C Caux) Bâtiment Cheney D, 3ème étage

Centre Léon Bérard, Département d'oncologie médicale

28 rue Laënnec, 69008 Lyon

phases : élimination, équilibre et échappement. Au stade précoce de carcinogénèse, la réponse immune est efficace, résultant en l'élimination de la tumeur. Cette phase est suivie par une longue période d'équilibre lors de laquelle le système immunitaire exerce une pression de sélection sur les cellules tumorales génétiquement instables et douées d'une forte capacité de mutation conduisant à l'émergence de nouveaux variants tumoraux non reconnus ou ignorés par le système immunitaire. Le cancer n'est donc pas éliminé mais n'est pas détectable cliniquement. Le cancer se manifeste cliniquement quand il échappe à une réponse immunitaire efficace. Ce concept suggère que le système immunitaire non seulement protège l'hôte contre le développement de cancers mais peut sculpter de façon dynamique l'immunogénicité des tumeurs [1]. L'immunogénicité correspond à la capacité des antigènes à induire une réponse immune. Certaines tumeurs malignes peuvent être immunogènes par l'expression de certains antigènes associés à l'oncogénèse. Dans ce contexte, le cancer de l'ovaire, qui est particulièrement immunogène, a été largement utilisé comme modèle pour étudier l'immunité antitumorale [3-5].

Immunosurveillance et cancer de l'ovaire

Le microenvironnement tumoral correspond à un ensemble hétérogène de cellules tumorales, de fibroblastes du stroma, de cellules endothéliales et de leucocytes tels que les macrophages, les lymphocytes T et les cellules dendritiques. Une grande variété de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance sont libérés dans l'environnement tumoral par ces cellules, responsables de la progression tumorale, de la dissémination ou au contraire de l'induction d'une réponse antitumorale efficace conduisant au rejet de la tumeur. Nous allons détailler les principales dérégulations du système immunitaire rapportées dans le cancer de l'ovaire qui participent à la progression tumorale.

Corrélation entre lymphocytes T effecteurs et pronostic

L'étude majeure traitant du rôle des lymphocytes T CD3⁺ dans l'immunosurveillance dans le cancer de l'ovaire a été publiée en 2003 dans le *New England Journal of Medicine*. Zhang *et al.* ont analysé en immunohistochimie (IHC) la distribution des lymphocytes T intratumoraux (TIL) dans 186 tumeurs congelées prélevées sur des patientes présentant un cancer de l'ovaire à un stade avancé (III/IV) [3]. Les TIL CD3⁺ ont été détectés dans les îlots cellulaires intratumoraux dans 102 des 186 tumeurs (54,8 %), alors qu'ils étaient absents

dans 72 tumeurs (38,7 %). Cette étude a montré que la présence de TIL était associée de façon significative à une meilleure survie des patientes. En effet, les patientes dont les tumeurs étaient infiltrées par les TIL avaient un taux de survie globale (SG) à 5 ans estimée à 38 %, alors que celles qui n'étaient pas infiltrées avaient un taux de survie de seulement 4,5 %. Les auteurs ont également quantifié les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans 30 tumeurs et ont montré une corrélation positive ($R^2 = 0,66$; $p < 0,001$) entre les deux sous-populations de lymphocytes T. En analyse multivariée de la SG, la présence de TIL et l'absence de résidu tumoral étaient les deux facteurs pronostiques indépendants associés à une meilleure survie ($p < 0,001$).

Les auteurs de cette étude ont également observé une augmentation de l'expression des ARN messagers de l'interféron- γ (IFN- γ) et de l'interleukine-2 (IL-2) dans les tumeurs infiltrées par les TIL. Or, ces deux cytokines sont produites principalement par les lymphocytes T, suggérant que ces cellules étaient fonctionnellement actives. Deux autres études publiées par la suite ont confirmé ces résultats et ont montré une corrélation positive entre les TIL et la réponse clinique à la première ligne de chimiothérapie ainsi que l'évolution favorable de la maladie [6, 7].

Récemment, Sato *et al.* ont montré sur une série de 117 patientes que celles dont les tumeurs étaient hautement infiltrées par les lymphocytes T CD8⁺ avaient une survie plus longue (médiane = 55 vs 26 mois ; $p = 0,0003$) [5]. Le sous-groupe de patientes ayant un ratio CD8⁺/CD4⁺ élevé avait une survie particulièrement longue, estimée à 74 mois (HR = 0,3 ; $p = 0,0001$). L'impact positif des lymphocytes T CD8⁺ a été confirmé dans deux larges séries indépendantes [8, 9].

D'autres équipes se sont intéressées aux lymphocytes T non pas dans la tumeur, mais dans le sang et l'ascite des patientes [10, 11]. Bamias *et al.* [11] ont ainsi montré une accumulation de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ activés ainsi que de lymphocytes T CD3⁺ CD56⁺, potentiellement des cellules de type NKT dotées d'une activité cytotoxique importante, dans les ascites par rapport au sang des patientes. Enfin, deux études se sont intéressées à une sous-population récemment identifiée de lymphocytes T CD4⁺ effecteurs, *T-helper 17 (Th17)* [12, 13] qui se caractérisent par la production spécifique d'IL-17. Ces cellules sont essentiellement de phénotype CD4⁺ et produisent des cytokines de type effecteur (IL-2, TNF- α et IFN- γ). Des taux élevés d'IL-17 dans les ascites sont associés à une survie plus longue suggérant un rôle protecteur des *Th17* dans l'immunité antitumorale, ce qui favoriserait une réponse de type cytotoxique *via* les lymphocytes T CD8⁺.

Mécanismes d'immunosuppression

Lymphocytes T régulateurs (Treg)

Les Treg constituent une sous-population de lymphocytes T CD4⁺CD25^{high} Foxp3⁺ qui représente 2 à 5 % des lymphocytes T CD4⁺ du sang chez les sujets sains [14]. Ils jouent un rôle majeur dans le maintien de la tolérance immunitaire et l'homéostasie des lymphocytes T périphériques (i) en bloquant les fonctions et la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ auto-réactifs et (ii) en exerçant un effet immunosuppresseur sur les DC et les macrophages en modulant leur sécrétion de cytokines et l'expression des molécules de costimulation. Les Treg sont des cellules fortement anergiques dont la prolifération *in vitro* est dépendante de l'IL-2 exogène même en présence des signaux activateurs provenant du *T Cell Receptor* (TCR) et des molécules de costimulation. Ils inhibent *in vivo* et *in vitro* la prolifération des lymphocytes T naïfs et mémoires par contact cellulaire direct, *via* la séquestration et le blocage des sécrétions d'IL-2 produite par les lymphocytes T effecteurs ou par l'intermédiaire des cytokines qu'ils produisent, en particulier IL-10 et TGF- β [15]. Les Treg participent également à la régulation négative de la réponse immunitaire antitumorale et constituent un élément important du microenvironnement néoplasique. La présence de Treg en nombre important dans les tumeurs ou dans le sang périphérique de patients a été fréquemment corrélée à un pronostic péjoratif dans de nombreux types de cancers [4, 16].

Les Treg ont été largement étudiés dans le cancer de l'ovaire. Curiel *et al.* ont montré que l'infiltration tumorale par les Treg était associée à un pronostic sombre des patientes ayant un cancer de l'ovaire avec une survie plus courte et un risque de décès plus élevé [4]. Ainsi, les Treg s'accumulent dans les ascites malignes représentant 10 à 17 % des lymphocytes T. Ces cellules expriment le phénotype « classique » des Treg CD4⁺CD25⁺CD3⁺GITR⁺CTLA4⁺CCR7⁺Foxp3^{high}, inhibent la prolifération des lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ effecteurs ainsi que leur production d'IFN- γ et d'IL-2 *in vitro*. Les Treg s'accumulent préférentiellement dans les tumeurs où ils représentent 10 à 25 % des lymphocytes T CD4⁺ infiltrants par rapport aux ganglions lymphoïdes qui les drainent *via* un mécanisme impliquant le couple CCL22/CCR4 et une capacité à proliférer *in situ*. En utilisant une méthodologie différente, Wolf *et al.* ont confirmé l'effet délétère des Treg dans cette pathologie [17]. Enfin, deux études ont montré qu'un ratio CD8⁺/Treg élevé parmi les TIL avait un impact positif sur la survie [5, 18].

Une des hypothèses pour expliquer le rôle péjoratif des Treg est qu'ils favorisent la tolérance vis-à-vis des antigènes associés aux tumeurs (TAA) qui sont des antigènes du soi tels que HER-2, et bloquent donc l'induction d'une réponse immunitaire antitumorale efficace. Il a également été montré que les Treg bloquent le développement des Th17.

Cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) hautement spécialisées qui intègrent une variété de signaux et initient et orchestrent la réponse immune. Il existe deux principales classes de DC humaines dans le sang : les DC myéloïdes (mDC) et plasmacytoïdes (pDC). Les mDC expriment les Ag CD4, CD11c et le récepteur du *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF). Elles produisent principalement de l'IL-12 en réponse aux ligands des récepteurs Toll (*Toll-like receptor*, TLR). Au contraire, les pDC n'expriment pas CD11c ni les marqueurs de la lignée myéloïde mais sont CD4⁺CD123⁺ (récepteur de l'IL-3) BDCA2⁺. La principale caractéristique des pDC est la production d'interféron- α (IFN- α) en réponse aux ligands de TLR 7 et 9 [19, 20]. En situation inflammatoire, les mDC migrent vers les tissus pour capturer les pathogènes invasifs avant de rejoindre les ganglions lymphatiques où elles vont activer les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ naïfs (*priming*) en leur présentant respectivement les Ag associés à des molécules du CMH de classes II et I. Les pDC sont majoritairement présentes autour des veinules dans les zones T des ganglions lymphatiques qu'elles rejoignent directement du sang, y compris à l'homéostasie. Le recrutement des pDC dans les sites inflammés peut contribuer à entretenir une réponse inflammatoire par la libération de cytokines et de chimiokines ainsi que l'induction de tolérance [21, 22].

Le rôle des pDC dans l'immunité antitumorale a été principalement étudié dans le cancer de l'ovaire en raison de leur accumulation dans les ascites malignes représentant en moyenne 0,71 % des cellules mononucléées (MNC) alors qu'elles sont déplétées du sang des patientes [22]. Ces pDC migrent vers les ascites grâce au *stromal-derived factor 1* (SDF-1), produisent de grandes quantités d'IFN- α en réponse aux ligands de TLR et induisent la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ naïfs allogéniques. Les pDC d'ascites néoplasiques sont également capables d'induire le développement de lymphocytes T CD8⁺ régulateurs [23]. Enfin, les pDC d'ascite induisent une angiogenèse *in vivo* grâce à la production de *tumor necrosis factor α* (TNF- α) et d'IL-8 [24].

Toutes ces études ont pris comme modèle les pDC d'ascite, en considérant que l'ascite étant au contact avec la carcinose, elle est un bon reflet du microenvironnement tumoral. Nous avons récemment étudié des tumeurs de l'ovaire et avons montré qu'elles peuvent être également infiltrées par des pDC mais à des proportions moindres que les ascites [25]. Ces pDC associées aux tumeurs (TApDC) présentent un phénotype plus activé que les pDC d'ascites. De plus, elles pourraient participer à l'immunosuppression en raison de : (i) l'inhibition de leur fonction innée principale, c'est-à-dire la production IFN- α en réponse aux TLR ligands ; (ii) leur capacité à polariser la réponse des lymphocytes T CD4⁺ naïfs allogéniques vers une forte production d'IL-10 et à induire la prolifération de Treg allogéniques *in vitro*. Nous avons également observé

que l'accumulation des pDC dans les tumeurs, et non dans les ascites, était un facteur indépendant de mauvais pronostic associé à une survie sans progression plus courte [25]. Ces observations suggèrent que les pDC présentes dans le microenvironnement tumoral induisent une tolérance vis-à-vis de la tumeur, favorisant sa progression.

L'analyse de l'évolution des taux de pDC dans le sang des patientes atteintes de cancer de l'ovaire a permis de montrer que la profonde déplétion de ces cellules chez les patientes au diagnostic était partiellement restaurée sous chimiothérapie et après mise en rémission complète. Ces observations suggèrent un retentissement systémique de la masse tumorale sur le système immunitaire, qui est partiellement corrigé lorsque la maladie est contrôlée avec la chimiothérapie.

Une des hypothèses pour expliquer le rôle délétère des pDC est qu'elles sont activement recrutées dans les tumeurs *via* des chimiokines sécrétées par les cellules tumorales et que, une fois sur place, elles favorisent la prolifération et l'activation des Treg intratumoraux contribuant ainsi à la tolérance vis-à-vis de la tumeur. Nous avons récemment confirmé cette hypothèse (données non publiées) à la fois dans le cancer de l'ovaire et le cancer du sein [26].

Macrophages

Les macrophages sont issus des monocytes du sang qui se différencient en macrophages après migration dans les tissus. Le phénotype de ces macrophages matures, bien différenciés, peut varier en fonction des tissus où ils résident : les cellules microgliales dans le cerveau, les cellules de Kupffer dans le foie. Ces différentes cellules ont cependant des fonctions communes telles que la capacité de défense contre les infections microbiennes, la régulation de la multiplication cellulaire normale, le remodelage tissulaire et la réparation des sites de blessure.

Classiquement, les macrophages sont activés par des produits microbiens ainsi que par l'IFN- γ . Par analogie à la dichotomie Th1/Th2 définissant deux types de réponse des lymphocytes T, on retrouve des macrophages de type I (M1) et II (M2). Les macrophages M1 sont de puissants effecteurs cellulaires qui tuent les micro-organismes et les cellules tumorales et produisent des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12 et TNF- α , IL-1, CXCL10 et CXCL11. Au contraire, les macrophages M2 sont subdivisés en trois sous-catégories M2a, M2b et M2c qui interviennent respectivement dans la réponse immune adaptative lors de l'inflammation (réaction antiparasitaire) (M2a), la régulation de la réponse Th2 et l'immunosuppression (M2b), l'angiogenèse ainsi que la réparation tissulaire (M2c). De façon générale, les macrophages M2 produisent de l'IL-10, de l'IL-6, CCL17, CCL18, CCL22 et l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1RA).

Les macrophages sont des constituants majeurs de l'infiltrat inflammatoire observé dans les tumeurs primaires et secondaires, où ils expriment un phénotype distinct et sont dénommés macrophages associés aux tumeurs (TAM). Il s'agit de macrophages M2 très proches fonctionnellement de la sous catégorie M2c. Les TAM sont présents dans les tumeurs de l'initiation jusqu'aux stades avancés et métastatiques.

Les caractéristiques fonctionnelles des TAM précédemment décrites ainsi que leur expression de la molécule de co-stimulation B7-H4, protéine récemment identifiée de la famille B7, sont un facteur de mauvais pronostic chez les patientes ayant un cancer de l'ovaire [27], en lien étroit avec la présence d'IL-10 et d'IL-6 dans le microenvironnement tumoral. La présence de TAM exprimant B7-H4 est associée à une infiltration par les Treg [28].

Cytokines et cancer de l'ovaire

Les cytokines sont des protéines produites par différentes cellules et interviennent dans le dialogue intercellulaire. Dans le microenvironnement tumoral, les cytokines sont le plus souvent produites par les leucocytes, en particulier les monocytes-macrophages et les lymphocytes infiltrant les tumeurs. Cependant, des études sur des lignées cellulaires de cancer de l'ovaire et les biopsies fraîches ont montré que les cellules tumorales participent, à une moindre mesure, à la production de ces cytokines.

L'interleukine-6 (IL-6) est une cytokine pro-inflammatoire et intervient dans les réponses immunes de type Th2. Elle a été largement étudiée chez les patients porteurs de cancer. Elle a été décrite initialement comme une cytokine produite par les lymphocytes T et qui induit la différenciation des lymphocytes B normaux en plasmocytes producteurs d'immunoglobulines. L'IL-6 produite par les cellules tumorales et les macrophages du microenvironnement tumoral peut bloquer la différenciation de progéniteurs CD34⁺ en DC au profit de la génération de macrophages [16]. Par ailleurs, des études aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* ont montré que l'IL-6 stimule de façon autocrine et paracrine la prolifération des cellules tumorales ovariennes [29].

La présence, chez les patientes porteuses d'une tumeur ovarienne, de taux sériques élevés d'IL-6 est un facteur pronostique indépendant associé à une survie plus courte [30]. L'IL-6 est également un puissant stimulateur de la mégacaryocytopoïèse. Des taux élevés d'IL-6 dans les ascites de tumeurs ovariennes ont été corrélés à une thrombocytose [31], elle-même associée à un pronostic plus sombre [32]. Enfin, une analyse du polymorphisme du promoteur de l'IL-6 a montré que le génotype 174 GG était associé à une meilleure survie sans qu'il n'y ait de corrélation entre les génotypes étudiés et les taux sériques d'IL-6 [33].

Le TGF- β est une cytokine pléiotrope qui possède des propriétés immunorégulatrices et antiprolifératives. Elle joue un rôle important dans la régulation de l'activation, la prolifération et la fonctionnalité des lymphocytes T et des DC. Elle est produite par les lymphocytes T naïfs, les Treg, les cellules mésenchymateuses, les plaquettes mais également certaines lignées tumorales. Le TGF- β inhibe la maturation, la migration et la fonctionnalité des mDC et des pDC. Il est également responsable d'une réduction de l'expression par les DC des molécules de CMH et des molécules de costimulation.

Dans le contexte du cancer de l'ovaire, le TGF- β sécrété par les cellules tumorales est capable de convertir *in vitro* des lymphocytes T effecteurs en Treg. Il favorise également l'angiogenèse *in vivo* qui est bloquée par des anticorps anti-TGF- β et il augmente le potentiel invasif des cellules tumorales en augmentant l'activité des métalloprotéinases [34].

D'autres cytokines associées à l'immunité cellulaire ont été corrélées à l'évolution du cancer de l'ovaire. Des taux élevés d'IFN- γ [35, 36] et d'IL-18 [37] sont associés à un meilleur pronostic. Ces cytokines interviennent dans la réponse cellulaire T de type Th1. En effet, l'IFN- γ exerce à la fois un effet stimulateur sur les lymphocytes T effecteurs et un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules tumorales de l'ovaire [38]. Ces observations concordent avec l'impact favorable de la présence des lymphocytes T IFN- γ en intratumoral rapporté dans le carcinome ovarien [3].

Les observations concernant l'effet d'IL-12, une autre cytokine de type Th1 principalement produite par les mDC, sont contradictoires selon l'origine des prélèvements et les techniques utilisées. Ainsi la détection de l'ARNm de la sous-unité IL-12p40 dans des échantillons de tumeurs est associée à un bon pronostic [36]. En revanche, des taux élevés de cette protéine dans les ascites sont associés à une survie plus courte [39] alors que les taux sériques élevés n'ont aucun impact [40]. Mais ces trois études manquent de puissance statistique avec une quarantaine de prélèvements dans chacune d'elles, ce qui ne permet pas de conclure. Enfin, les taux sériques de la sous-unité d'IL-12p70 sont trop faibles pour être exploitables [41].

Le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) est une cytokine multifonctionnelle ayant une action mitogène sur les cellules endothéliales *in vitro* et un effet pro-angiogénique *in vivo*. Il est produit par la plupart des cellules tumorales. Le VEGF joue un rôle majeur dans l'échappement tumoral au système immunitaire. Il se lie au récepteur VEGFR1/FLT1 situé sur les progéniteurs CD34⁺ de la moelle osseuse, réduisant la capacité de ces cellules à se différencier en DC fonctionnelles, ce qui entraîne une réduction du nombre et la maturation des DC intratumorales. Par ailleurs, le blocage du VEGF combiné à des approches d'immunothérapie antitumorale augmente le ratio Teffecteurs/Treg dans le microenvironnement tumoral révélant ainsi un nouveau mécanisme d'immunosuppression médié par le VEGF [42].

Le VEGF a été détecté à la fois sur des prélèvements de tumeurs, d'ascites et de sérums de patientes traitées pour un cancer de l'ovaire. Une analyse combinée

des données à partir de 314 patientes incluses dans cinq études montre que des taux sériques élevés de VEGF sont un facteur pronostique indépendant associé à une survie plus courte [43]. De même, des taux élevés de VEGF dans les ascites sont associés à une faible sensibilité aux sels de platine et une survie sans progression plus courte [44].

L'interleukine-7 (IL-7) joue un rôle essentiel dans le développement et la survie des lymphocytes B et T chez la souris et l'homme. Elle favorise leur prolifération et les protège de la mort cellulaire, en partie par induction du gène anti-apoptotique Bcl-2. Seulement 3 % des tumeurs de l'ovaire expriment cette cytokine [45] alors que des taux élevés de cette cytokine sont retrouvés chez la majorité des patientes et sont associés à une survie plus courte [41]. Cette observation suggère qu'IL-7 est produite par les cellules immunes de l'hôte en réponse à la prolifération tumorale.

Au total, de nombreuses études se sont intéressées aux cytokines dans le cancer de l'ovaire. Cependant, la majorité des études citées ci-dessus sont limitées par leur caractère rétrospectif et le nombre de patientes incluses, réduisant leur puissance statistique. Il ressort de ces travaux qu'un état inflammatoire important, défini par des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-6 et VEGF est délétère pour l'évolution des patientes.

Lymphopénie et cancer de l'ovaire

La lymphopénie a été décrite dans de nombreux types de tumeurs à la fois solides et hématologiques. Elle est notamment associée à un risque plus élevé de toxicité liée à la chimiothérapie, de neutropénie fébrile [46] et de décès précoce [47]. Deux études récemment publiées ont analysé l'impact de la lymphopénie sur la survie des patientes dans le contexte de cancer de l'ovaire. La première a porté sur une étude rétrospective de 136 patientes avec un suivi médian de 31 mois. Un ratio lymphocytes/leucocytes bas était un facteur pronostique indépendant associé à un risque plus élevé de mortalité [48]. La deuxième étude a inclus 192 patientes dont une majorité de stades avancés (III/IV) [49] avec un suivi médian de 20 mois. Les auteurs ont observé un taux moyen de lymphocytes plus bas dans les stades III/IV ($1\,364/\text{mm}^3$) que les stades I/II ($1\,646/\text{mm}^3$). En prenant comme valeur seuil le taux moyen de lymphocytes ($1\,440/\text{mm}^3$), les patientes ayant un taux bas avaient une survie plus courte.

Nous avons mené une étude rétrospective (article soumis) sur une série de 136 patientes traitées au centre Léon Bérard entre 1993 et 2009 pour un cancer de l'ovaire. Nous avons également observé un taux médian de lymphocytes significativement plus bas dans les stades avancés par rapport aux stades localisés ($p = 0,04$). En choisissant comme seuil $1\,000/\text{mm}^3$ qui correspond à une valeur précédemment validée dans une étude multicentrique et incluant 600 patients ayant des carcinomes, des sarcomes et des lymphomes [47], la lymphopénie qui

est retrouvée chez 13 % des patientes apparaît comme un facteur pronostique indépendant associé à une survie plus courte en analyse multivariée. Une des hypothèses pour expliquer la survenue de lymphopénie est une hyperactivation du système immunitaire par la tumeur. Cette hyperactivation se manifeste par une augmentation des lymphocytes T mémoire et activés, une augmentation des cytokines pro-inflammatoires et une augmentation de la prolifération des lymphocytes circulants. Nos résultats préliminaires retrouvent une augmentation des lymphocytes T activés et mémoire chez les patientes lymphopéniques.

Perspectives d'immunothérapies

Plusieurs stratégies d'immunothérapies sont actuellement évaluées chez les patientes traitées pour un cancer de l'ovaire. Des anticorps monoclonaux dirigés contre différents antigènes tumoraux tels qu'EpCAM (catumaxomab), CA-125 (oregovomab) et MUC1 (HMGF1) sont évalués avec une administration systémique ou intrapéritonéale. Catumaxomab vient d'obtenir l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement palliatif des ascites néoplasiques. Des essais de vaccination par des peptides dérivés d'antigènes tumoraux tels que HER-2 et NY-ESO-1 sont également en cours [50]. Une troisième stratégie d'immunothérapie est l'administration de cytokines exogènes afin de potentialiser l'induction et l'amplification d'une réponse immune appropriée. Un essai de phase II récemment publié par l'équipe du M.D. Anderson a évalué l'intérêt d'associer le GM-CSF, l'IFN- γ 1b et le carboplatine chez 54 patientes traitées pour un cancer de l'ovaire sensible aux platines et en rechute [51]. Les auteurs de cette étude ont rapporté un taux de réponse intéressant estimé à 56 % et une survie sans progression médiane estimée à six mois.

Le blocage de certaines cytokines est une autre stratégie d'immunothérapie dans le cancer de l'ovaire qui montre un succès clinique manifeste. Ainsi, le bevacizumab, un anticorps monoclonal anti-VEGF, a été évalué en association avec le carboplatine et le Taxol® dans deux grands essais cliniques de phase III et a montré un gain significatif de survie sans progression. Par ailleurs, un anticorps monoclonal chimérique anti-IL-6 (CNTO 328) est en cours d'étude de phase I/II dans cette pathologie [52].

La vaccination avec des cellules dendritiques (DC) qui sont les principales CPA et jouent donc un rôle majeur dans le contrôle des réponses immunes est également en développement clinique. Brossart *et al.* ont traité des patientes ayant un cancer de l'ovaire/sein par des DC pulsées avec des peptides dérivés des antigènes HER-2 et MUC1 [53]. Chez cinq des dix patientes, des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques des peptides ont pu être générés.

Enfin une nouvelle piste en cours d'exploration est la réversion de l'état d'immunosuppression induit par la tumeur. Dans cette perspective, des études précliniques chez la souris ont évalué l'intérêt de bloquer des cellules

immunosuppressives telles que les Treg [54] ou les cellules dendritiques [55]. Partant du constat de l'effet délétère des Treg, la déplétion de Treg chez des souris porteuses de tumeurs améliore la réponse immune spécifique de TAA et l'efficacité des immunothérapies associées en réduisant la taille tumorale [56]. Chez l'homme, la déplétion des Treg par l'administration d'un anticorps monoclonal anti-CTLA4 chez des patientes ayant un cancer de l'ovaire associée à une vaccination par des cellules tumorales autologues irradiées induit une nécrose tumorale importante [54]. Ces expériences ouvrent la voie à de nouveaux traitements d'immunothérapies antitumorales où l'on ciblerait les cellules immunes et non pas les cellules tumorales [57].

Conclusion

Le cancer de l'ovaire offre une opportunité avantageuse pour ceux qui étudient l'immunité antitumorale et l'immunothérapie, grâce à l'accès à de larges échantillons de tumeurs et d'ascites qui sont infiltrées par les cellules immunes, avec une possibilité de prélèvements tumoraux répétés chez les patientes sous chimiothérapie lors de la chirurgie d'intervalles.

Malgré la présence de TIL activés dans les tumeurs reflétant l'activation du système immunitaire chez les patientes, les cellules tumorales ovariennes développent différents mécanismes pour échapper à l'attaque du système immunitaire. En particulier, l'attraction intratumorale des Treg et des pDC induit une immunosuppression qui favorise la progression de la maladie. Le développement d'immunothérapies ciblées, qui bloque à la fois la migration des Treg en utilisant par exemple un anticorps anti-CTLA4 tel que l'ipilimumab [58] et stimule les pDC grâce aux TLR ligands, ouvrirait une nouvelle ère dans le traitement de cette maladie au pronostic redoutable.

Références

1. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G (2006) Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 6: 715-27
2. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ (2011) Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331: 1565-70
3. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, *et al.* (2003) Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348: 203-13
4. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, *et al.* (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10: 942-9
5. Sato E, Olson SH, Ahn J, *et al.* (2005) Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18538-43

6. Raspollini MR, Castiglione F, Rossi Degl'Innocenti D, *et al.* (2005) Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymphocytes are correlated with a brief disease-free interval in advanced ovarian serous carcinoma. *Ann Oncol* 16: 590-6
7. Tomsova M, Melichar B, Sedlakova I, Steiner I (2008) Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 108: 415-20
8. Barnett JC, Bean SM, Whitaker RS, *et al.* (2010) Ovarian cancer tumor infiltrating T-regulatory (T(reg)) cells are associated with a metastatic phenotype. *Gynecol Oncol* 116: 556-62
9. Clarke B, Tinker AV, Lee CH, *et al.* (2009) Intraepithelial T cells and prognosis in ovarian carcinoma: novel associations with stage, tumor type, and BRCA1 loss. *Mod Pathol* 22: 393-402
10. Giuntoli RL, 2nd, Webb TJ, Zoso A, *et al.* (2009) Ovarian cancer-associated ascites demonstrates altered immune environment: implications for antitumor immunity. *Anticancer Res* 29: 2875-84
11. Bamias A, Tsiatas ML, Kafantari E, *et al.* (2007) Significant differences of lymphocytes isolated from ascites of patients with ovarian cancer compared to blood and tumor lymphocytes. Association of CD3+CD56+ cells with platinum resistance. *Gynecol Oncol* 106: 75-81
12. Miyahara Y, Odunsi K, Chen W, *et al.* (2008) Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15505-10
13. Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, *et al.* (2009) Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 114: 1141-9
14. Sakaguchi S (2004) Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22: 531-62
15. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG (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: 1295-302
16. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, *et al.* (2009) Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res* 69: 2000-9
17. Wolf D, Wolf AM, Rumpold H, *et al.* (2005) The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 11: 8326-31
18. Leffers N, Gooden MJ, de Jong RA, *et al.* (2009) Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother* 58: 449-59
19. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, *et al.* (1999) The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284: 1835-7
20. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, *et al.* (1999) Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5: 919-23
21. Yoneyama H, Narumi S, Zhang Y, *et al.* (2002) Pivotal role of dendritic cell-derived CXCL10 in the retention of T helper cell 1 lymphocytes in secondary lymph nodes. *J Exp Med* 195: 1257-66
22. Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, *et al.* (2001) Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 7: 1339-46
23. Wei S, Kryczek I, Zou L, *et al.* (2005) Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 65: 5020-6
24. Curiel TJ, Cheng P, Mottram P, *et al.* (2004) Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Res* 64: 5535-8

25. Labidi-Galy SI, Sisirak V, Meeus P, *et al.* (2011) Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells in cancer contribute to immune tolerance. *Cancer Res* [Epub ahead of print]
26. Sisirak V, Faget J, Gobert M, *et al.* TGF- β from breast tumor impairs innate immune response of plasmacytoid dendritic cells establishing immune tolerance through Treg expansion (submitted)
27. Kryczek I, Wei S, Zhu G, *et al.* (2007) Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 67: 8900-5
28. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P (2006) Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 42: 717-27
29. Tempfer C, Zeisler H, Sliutz G, *et al.* (1997) Serum evaluation of interleukin 6 in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol* 66: 27-30
30. Scambia G, Testa U, Benedetti Panici P, *et al.* (1995) Prognostic significance of interleukin 6 serum levels in patients with ovarian cancer. *Br J Cancer* 71: 354-56
31. Gastl G, Plante M, Finstad CL, *et al.* (1993) High IL-6 levels in ascitic fluid correlate with reactive thrombocytosis in patients with epithelial ovarian cancer. *Br J Haematol* 83: 433-41
32. Li AJ, Madden AC, Cass I, *et al.* (2004) The prognostic significance of thrombocytosis in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 92: 211-214
33. Garg R, Wollan M, Galic V, *et al.* (2006) Common polymorphism in interleukin 6 influences survival of women with ovarian and peritoneal carcinoma. *Gynecol Oncol* 103: 793-6
34. Rodriguez GC, Haisley C, Hurteau J, *et al.* (2001) Regulation of invasion of epithelial ovarian cancer by transforming growth factor-beta. *Gynecol Oncol* 80: 245-53
35. Marth C, Fiegl H, Zeimet AG, *et al.* (2004) Interferon-gamma expression is an independent prognostic factor in ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 191: 1598-605
36. Kusuda T, Shigemasa K, Arihiro K, *et al.* (2005) Relative expression levels of Th1 and Th2 cytokine mRNA are independent prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Oncol Rep* 13: 1153-8
37. Akahiro J, Konno R, Ito K, *et al.* (2004) Impact of serum interleukin-18 level as a prognostic indicator in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Int J Clin Oncol* 9: 42-6
38. Epstein LB, Shen JT, Abele JS, Reese CC (1980) Sensitivity of human ovarian carcinoma cells to interferon and other antitumor agents as assessed by an in vitro semi-solid agar technique. *Ann N Y Acad Sci* 350: 228-44
39. Zeimet AG, Widschwendter M, Knabbe C, *et al.* (1998) Ascitic interleukin-12 is an independent prognostic factor in ovarian cancer. *J Clin Oncol* 16: 1861-8
40. Gorelik E, Landsittel DP, Marrangoni AM, *et al.* (2005) Multiplexed immunobead-based cytokine profiling for early detection of ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 981-7
41. Lambeck AJ, Crijns AP, Leffers N, *et al.* (2007) Serum cytokine profiling as a diagnostic and prognostic tool in ovarian cancer: a potential role for interleukin 7. *Clin Cancer Res* 13: 2385-91
42. Li B, Lalani AS, Harding TC, *et al.* (2006) Vascular endothelial growth factor blockade reduces intratumoral regulatory T cells and enhances the efficacy of a GM-CSF-secreting cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 12: 6808-16
43. Heffler LA, Zeillinger R, Grimm C, *et al.* (2006) Preoperative serum vascular endothelial growth factor as a prognostic parameter in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 103: 512-7
44. Bamiyas A, Koutsoukou V, Terpos E, *et al.* (2008) Correlation of NK T-like CD3+CD56+ cells and CD4+CD25+(hi) regulatory T cells with VEGF and TNF α in ascites from advanced ovarian cancer: Association with platinum resistance and prognosis in patients receiving first-line, platinum-based chemotherapy. *Gynecol Oncol* 108: 421-7
45. Xie X, Ye D, Chen H, *et al.* (2004) Interleukin-7 and suppression of local peritoneal immunity in ovarian carcinoma. *Int J Gynaecol Obstet* 85: 151-8

46. Borg C, Ray-Coquard I, Philip I, *et al.* (2004) CD4 lymphopenia as a risk factor for febrile neutropenia and early death after cytotoxic chemotherapy in adult patients with cancer. *Cancer* 101: 2675-80
47. Ray-Coquard I, Cropet C, Van Glabbeke M, *et al.* (2009) Lymphopenia as a prognostic factor for overall survival in advanced carcinomas, sarcomas, and lymphomas. *Cancer Res* 69: 5383-91
48. Bishara S, Griffin M, Cargill A, *et al.* (2008) Pre-treatment white blood cell subtypes as prognostic indicators in ovarian cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 138: 71-75
49. Cho H, Hur HW, Kim SW, *et al.* (2009) Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio is elevated in epithelial ovarian cancer and predicts survival after treatment. *Cancer Immunol Immunother* 58: 15-23
50. Liu B, Nash J, Runowicz C, *et al.* (2010) Ovarian cancer immunotherapy: opportunities, progresses and challenges. *J Hematol Oncol* 3: 7
51. Schmeler KM, Vadhan-Raj S, Ramirez PT, *et al.* (2009) A phase II study of GM-CSF and rIFN-gamma1b plus carboplatin for the treatment of recurrent, platinum-sensitive ovarian, fallopian tube and primary peritoneal cancer. *Gynecol Oncol* 113: 210-5
52. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00841191?term=CNTO+328&rank=1>
53. Brossart P, Wirths S, Stuhler G, *et al.* (2000) Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 96: 3102-8
54. Hodi FS, Butler M, Oble DA, *et al.* (2008) Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3005-10
55. Nesbeth Y, Scarlett U, Cubillos-Ruiz J, *et al.* (2009) CCL5-mediated endogenous anti-tumor immunity elicited by adoptively transferred lymphocytes and dendritic cell depletion. *Cancer Res* 69: 6331-8
56. Barnett B, Kryczek I, Cheng P, *et al.* (2005) Regulatory T cells in ovarian cancer: biology and therapeutic potential. *Am J Reprod Immunol* 54: 369-377
57. Hwu P (2010) Treating cancer by targeting the immune system. *N Engl J Med* 363: 779-81
58. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, *et al.* (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363: 711-23