

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année 2008 - Thèse n°

CELLULES DENDRITIQUES ET IMMUNOTHERAPIE ANTICANCEREUSE-ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 28 janvier 2008
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Camille FOGACCI-SCHEINER

Née le 21 janvier 1975
à BRIGNOLES (Var)



DEPARTEMENT ET CORPS ENSEIGNANT DE L'ENVL
Directeur : Stéphane MARTINOT

Mise à jour : 14/12/2007

	PR EX	PR 1	PR 2	MC	Contractuel, Associé, IPAC et ISPV	AERC	Chargés de consultations et d'enseignement
DEPARTEMENT SANTE PUBLIQUE VETERINAIRE							
Microbiologie, Immunologie, Pathologie Générale	Y. RICHARD		A. KODJO	V. GUERIN-FAUBLEE D. GREZEL			
Pathologie infectieuse			A. LACHERETZ M. ARTOIS	J. VIALARD			
Parasitologie et Maladies Parasitaires	MC. CHAUVE	G. BOURDOISEAU		MP. CALLAIT CARDINAL L. ZENNER			
Qualité et Sécurité des Aliments			P. DEMONT C. VERNOZY A. LACHERETZ	A. GONTHIER S. COLARDELLE D. SERGENTET (stagiaire)			
Législation et Jurisprudence				P. SABATIER ML. DELIGNETTE K. CHALVET-MONFRAY			
Bio-informatique - Bio-statistique							
DEPARTEMENT ANIMAUX DE COMPAGNIE							
Anatomie			T. ROGER D. FAU E. VIGUIER D. REMY	S. SAWAYA C. CAROZZO	C. BOULOCHER S. JUNOT (MCC) K. PORTIER (MCC)		
Chirurgie et Anesthésiologie		JP. GENEVOIS					
Anatomie-pathologique/Dermatologie-Cancérologie			C. FLEURY	T. MARCHAL	P. BELLI D. PIN		
Hématologie		C. FOURNEL			D. WATRELOT-VIRIEUX (MCC)		
Médecine interne		JL. CADORE	L. CHABANNE	F. PONCE M. HUGONNARD C. ESCRIOU	I. BUBLOT		
Imagerie Médicale					F. RIGOUT-PAULIK		
DEPARTEMENT PRODUCTIONS ANIMALES							
Zootéchnie, Ethologie et Economie Rurale		M. FRANCK		L. MOUNIER	L. COMMUN		
Nutrition et Alimentation				D. GRANCHER L. ALVES DE OLIVEIRA G. EGRON			
Biologie et Pathologie de Reproduction		F. BADINAND	M. RACHAIL-BRETIN P. GUERIN	S. BUFF	A. C. LEFRANC		
Pathologie Animaux de Production	P. BEZILLE		T. ALOGNINOIWA	R. FRIKHA M.A. ARCANGIOLI D. LE GRAND		G. LESOBRE P. DEBARNOT D. LAURENT P. OTZ	
DEPARTEMENT SCIENCES BIOLOGIQUES							
Physiologie/Thérapeutique			J.M. BONNET-GARIN	J.J. THIEBAULT			
Biophysique/Biochimie		E. BENOIT F. GARNIER		T. BURONFOSSE			
Génétique et Biologie moléculaire			F. GRAIN P. JAUSSAUD P. BERNY	V. LAMBERT C. PROUILLAC (stagiaire)			
Pharmacie/Toxicologie Législation du Médicament		G. KECK			T. AVISON		
Langues							
DEPARTEMENT HIPPIQUE							
Pathologie équine		JL. CADORE		A. BENAMOU-SMITH			
Clinique équine		O. LEPAGE		A. LEBLOND	M. GANGL		

A Monsieur le Professeur Jean-Yves SCOAZEC,
De l'Université Claude Bernard de Lyon,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la
présidence du jury de cette thèse,

Hommages respectueux.

A Monsieur le Professeur Thierry Marchal,
De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,

Qui est l'initiateur de ce travail.
Pour son aide précieuse, sa patience,
son soutien et ses photos,

Sincères remerciements.

A Madame le Professeur Frédérique Ponce,
De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,

Qui nous a fait l'honneur de participer à
notre jury de thèse,

Sincères remerciements.

A Thomas,

Qui ne doit toujours pas y croire,
Merci pour ton soutien, ta patience, ton amour
Je t'aime.

A Julien et Julie,

Mes enfants, mes amours,
Ma force,
Ma vie.

A mon Papa et ma Maman,

Que j'aime tant,
Merci pour tout ce que vous m'avez donné de si précieux,
Pour votre amour inconditionnel,
Je suis le reflet de vos vies.

A ma Sœur et mon Frère,

Qui sont toujours là pour moi,
Merci pour votre amour sincère, nos souvenirs d'enfants,
Nos disputes si rares, nos joies à venir,
La famille.

A Papiton,

Qui me manque tant,
Pour les parties de pêche à la palengrotte,
Pour le café et les mots croisés,
« Oh cocotte ! » est gravé dans mon cœur.

A Papi et Mami,

Que j'aime tendrement,
Pour ce que vous m'avez transmis
Qui a contribué à mon bonheur aujourd'hui,
Merci.

A Claudie,

Que j'admiraient tant,
Pour ton intelligence sans prétention,
Pour ta gentillesse, ton humour, tes fous rires,
Je pense à toi souvent.

A Perrine,

Que j'admire tant,
Pour ta force, ton courage,
Pour ton amour sincère,
Pour tes fous rires, ta gentillesse, ton humour,
Merci profondément.

A Jean-Pierre,

Pour ces moments inoubliables,
Partagés avec tant de générosité,
Un loup, une coquille, une barigoule, ...un vin !
La découverte simple et merveilleuse du plaisir du goût.

A Françoise et Adrien,

Pour leur soutien de tous les jours,
Pour leur gentillesse du premier jour,
Pour ces instants magiques à l'Hermet et ailleurs,
Merci.

A Laurent et Fédérica,

Pour leur aide si précieuse.

A Nénette,

Mon tromblon.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	5
INTRODUCTION	9
PREMIERE PARTIE : LES CELLULES DENDRITIQUES.....	13
I. DEFINITION	15
1. <i>Les cellules dendritiques, des cellules présentatrices d'antigène.....</i>	15
2. <i>Les cellules dendritiques, critères de définition</i>	16
II. DE L'ORIGINE A LA DISTRIBUTION TISSULAIRE.....	16
1. <i>Ontogénie</i>	16
1.1 <i>Mise en place d'un schéma ontogénique.....</i>	16
1.2 <i>Développement hématopoïétique des CD's et signaux de régulation</i>	21
2. <i>Renouvellement.....</i>	23
3. <i>Migration.....</i>	24
3.1 <i>De la moelle osseuse au sang et aux tissus périphériques</i>	25
3.2 <i>Recrutement puis positionnement dans les tissus périphériques non lymphoïdes</i>	26
3.3 <i>Migration vers les tissus lymphoïdes.....</i>	27
4. <i>Distribution tissulaire des CD's</i>	30
4.1 <i>CD's des tissus non lymphoïdes</i>	30
4.2 <i>CD's de la lymphe et du sang.....</i>	31
4.3 <i>CD's des tissus lymphoïdes</i>	31
5. <i>Marqueurs phénotypiques des CD's</i>	33
5.1 <i>Variations interspécifiques</i>	33
5.2 <i>Variations intraspécifiques</i>	34
III. PROPRIETES DES CELLULES DENDRITIQUES.....	40
1. <i>Captation et apprêtement de l'Ag.....</i>	40
1.1 <i>Captation de l'Ag</i>	40
1.2 <i>Apprêtement et présentation de l'Ag.....</i>	43
1.2.1 <i>Voie du CMH de classe II.....</i>	43
1.2.2 <i>Voie du CMH de classe I</i>	44
1.2.3 <i>Cas de la cross-présentation ou cross-priming</i>	46
1.2.4 <i>Rôle des enzymes.....</i>	46
2. <i>Maturation des cellules dendritiques.....</i>	47
3. <i>Rôle des cellules dendritiques dans les réactions immunes.....</i>	49
3.1 <i>Interactions entre les CD's et les cellules T : tolérance ou immunité.....</i>	49
3.1.1 <i>Interaction CD/lymphocyte T et tolérance</i>	49
3.1.2 <i>Interaction CD/lymphocyte T et immunité</i>	51
3.2 <i>Interactions entre les CD's et les autres cellules de l'immunité</i>	55
DEUXIEME PARTIE : LES CELLULES DENDRITIQUES EN IMMUNOTHERAPIE ANTICANCEREUSE	57
I. ROLE DES CELLULES DENDRITIQUES DANS L'IMMUNITE ANTICANCEREUSE - MISE EN PLACE D'UNE IMMUNOTHERAPIE	59
1. <i>Notions d'immunocancérologie.....</i>	59
2. <i>Cellule dendritique et immunité anticancéreuse.....</i>	60
II. TECHNIQUES DE L'IMMUNOTHERAPIE ANTICANCEREUSE UTILISANT LES CD'S.....	63
1. <i>Les différentes sources de CD's utilisées en immunothérapie anticancéreuse.....</i>	63
1.1 <i>Utilisation des CD's du sang périphérique et de leurs précurseurs</i>	64
1.2 <i>Utilisation des cellules CD34+ de la moelle osseuse</i>	65
1.3 <i>Utilisation des monocytes sanguins.....</i>	67
2. <i>Importance d'une maturation des CD's.....</i>	69
3. <i>Potentialisation des cellules dendritiques</i>	72
3.1 <i>Les différentes sources d'Ag tumoral.....</i>	72
3.1.1 <i>Les antigènes peptidiques associés à la tumeur (TAA).....</i>	72
3.1.2 <i>Les protéines tumorales totales purifiées ou recombinantes</i>	78
3.1.3 <i>Les lysats tumoraux et les corps apoptotiques issus des cellules tumorales.....</i>	79
3.1.4 <i>Les hybrides : fusion entre la cellule dendritique et la cellule tumorale</i>	81
3.1.5 <i>Transfert génique de l'Ag aux CD's</i>	84
3.1.6 <i>Les exosomes</i>	88
3.2 <i>Utilisation des molécules immuno-modulatrices et de celles de co-stimulation</i>	91
4. <i>Voies d'administration et doses vaccinales</i>	95
III. DISCUSSION	98
CONCLUSION	101

TABLE DES ILLUSTRATIONS 105
BIBLIOGRAPHIE 109

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'**immunité** chez un être vivant est un important système de défense qui, dans l'organisme, met en jeu différents moyens, qu'ils soient mécaniques, biochimiques ou cellulaires, afin de contrer l'action de tout corps étranger pouvant, à plus ou moins long terme, se révéler néfaste.

L'étude approfondie de cette immunité a abouti à la découverte en 1973 par **Ralph Steinman** et **Zanvil Cohn** d'une nouvelle population cellulaire dans les tissus lymphoïdes secondaires de la souris. Leur caractère morphologique le plus frappant étant la présence de nombreux prolongements cellulaires de taille variable, elles ont été dénommées **cellules dendritiques** (CDs). Plusieurs expériences *in vitro* leur ont permis de révéler leur capacité à adhérer au verre et au plastique mais aussi leurs propriétés fonctionnelles différentes de celles des lymphocytes, des macrophages et des cellules réticulées non phagocytaires (1).

Pendant plusieurs années, la majorité des travaux va être réalisée par cette même équipe. Ainsi, ils ont mis en évidence leur turn-over rapide et leur réponse à l'administration d'un antigène (Ag) (2). Par la suite, ils ont élaboré une technique de purification de ces cellules basée sur leur propriété d'adhérence transitoire au plastique (3). Plus tard, ils ont mis en évidence leur capacité à stimuler les lymphocytes T (LT) dans les réactions lymphocytaires mixtes (4) et les autres réponses immunes.

Parallèlement, l'évolution des connaissances concernant la physiopathologie des cellules cancéreuses et l'observation de régressions spontanées dans le cas de différents types de cancers humains ont abouti à l'hypothèse puis à la confirmation d'une interaction du système immunitaire avec des déterminants antigéniques tumoraux. Sur ces constatations s'est fondée **l'immunothérapie anticancéreuse**, c'est à dire l'utilisation des facteurs de l'immunité comme thérapeutique anticancéreuse.

Connaissant la place importante qu'occupent les CDs dans l'immunité cellulaire, il nous a paru opportun, à travers cette étude bibliographique, de faire le point sur leur utilisation en immunothérapie anticancéreuse. Dans ce but, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la cellule dendritique et à ses caractéristiques *in vivo*. Dans un deuxième temps, nous avons réalisé un bilan des techniques expérimentales utilisant les CDs comme thérapeutique anticancéreuse et ce afin d'en dégager, d'une part les avantages et les inconvénients, d'autre part les perspectives d'avenir d'une telle thérapeutique.

PREMIERE PARTIE : LES
CELLULES DENDRITIQUES

I. Définition

1. Les cellules dendritiques, des cellules présentatrices d'antigène

Lors d'une réponse immune à un antigène, deux systèmes se mettent en place et coopèrent, un système *cellulaire* mettant en jeu des cellules comme les lymphocytes et les monocytes/macrophages, et un système *humoral* dont l'agent effecteur est représenté par des immunoglobulines appelées anticorps (Ac).

Au cours de la réponse cellulaire, des lymphocytes T spécifiques vont reconnaître l'Ag, être alors stimulés et proliférer d'une part en cellules effectrices, d'autre part en cellules mémoires. Parmi les premières, les lymphocytes T4 (LT4) (exprimant la molécule CD4 sur leur membrane) participent à la stimulation des lymphocytes B (LB) permettant ainsi la production d'Ac spécifiques, mais aussi à la stimulation des lymphocytes T8 (LT8) (exprimant la molécule CD8 sur leur membrane) activés alors en cellules cytotoxiques, ou encore à l'activation des macrophages.

Contrairement aux LB, les LT ne reconnaissent pas l'Ag sous sa forme native. En effet, cette reconnaissance ne peut se faire et aboutir à l'activation du LT que si l'Ag est présenté par une autre cellule sous forme de fragment antigénique de nature polypeptidique, appelé épitope T, associé aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I pour les LT8 et de classe II pour les LT4. Alors que les molécules de classe I sont exprimées à la surface de la plupart des types de cellule, les molécules de classe II sont essentiellement exprimées à la surface des cellules présentatrices d'Ag (CPAgs).

Après les monocytes, les macrophages (5) et les LB (6), les CDs ont été définies comme le troisième type de CPAgs (7). Plus tard, de nombreuses expériences ont prouvé que les CDs ont une capacité de présentation de l'Ag aux LT naïfs bien supérieure à celle des autres CPAgs (8) (9). Elles seraient 1000 fois plus efficaces que les LB et 100 fois plus que les macrophages lors d'une activation primaire des LT4 *in vivo* (10). Ces constatations les ont fait définir comme CPAgs professionnelles ayant un rôle primordial dans l'initiation voire le maintien de toute réponse immune.

2. Les cellules dendritiques, critères de définition

Sous la dénomination de CD sont regroupées de nombreuses cellules possédant certaines caractéristiques communes que l'on peut retrouver dans :

-leur origine : le schéma ontogénique actuel leur confère une origine *myéloïde* ou *lymphoïde*.

-leur morphologie: comme l'indique leur appellation, elles possèdent de nombreux prolongements cytoplasmiques de taille variable. D'après ce critère et leur localisation, elles seront appelées cellules *interdigitées* dans les ganglions, cellules *réticulées* dans le thymus et cellules *voilées* dans le sang ou la lymphe.

-leur phénotype: elles expriment fortement sur leur membrane les molécules du CMH, certaines molécules d'adhérence et de costimulation que nous étudierons ultérieurement.

-leur fonction: ce sont des CPAgs très efficaces dans la stimulation des LT donc responsables de l'initiation des réponses immunes primaires.

II. De l'origine à la distribution tissulaire

1. Ontogénie

1.1 Mise en place d'un schéma ontogénique

C'est par irradiation de souris suivie d'une greffe de moelle osseuse que l'origine **HEMATOPOIETIQUE** des CDs de la rate a été démontrée (2). Plus précisément, Steinman a avancé que les précurseurs se trouvaient à la fois dans la moelle osseuse et dans la pulpe rouge de la rate mais que la première était une source bien plus riche.

Par la suite et de façon identique, cette origine a été confirmée pour les CDs de la peau (11), du thymus (12) et de l'intestin (13).

Plus tard, lors du 28ème forum en immunologie en 1989, grâce à des cultures *in vitro* de moelle osseuse de souris, le nombre des précurseurs parmi les cellules de la moelle fut estimé entre 1/10 000 et 1/20 000. Il a été établi aussi que ces précurseurs étaient dépourvus de molécules du CMH II et d'autres Ags des CD.

A l'origine, les CD ont été considérées comme d'origine **MYELOÏDE** et strictement liées aux monocytes, aux macrophages et aux granulocytes.

Cependant, au cours des années, des études plus précises concernant les CD de diverses localisations (comme le sang périphérique, la peau et les organes lymphoïdes), ont mis en évidence chez ces cellules hématopoïétiques une grande diversité phénotypique et fonctionnelle remettant en question cette origine myéloïde unique (14).

En effet, chez *la souris*, les CD du thymus semblaient provenir d'un progéniteur hématopoïétique à potentiel **LYMPHOÏDE** alors que celles de la rate provenaient de précurseurs myéloïdes.

Ainsi un schéma ontogénique plus précis a pu être établi à travers l'étude des CD du thymus et de la moelle osseuse. Une **cellule souche primitive hématopoïétique commune (HSC)** a été caractérisée par le marqueur cellulaire Lin. Elle est à l'origine :

- dans le *thymus*, de précurseurs **lymphoïdes** précoces caractérisés par une faible expression des marqueurs CD4 (low CD4) et Thy-1, et une forte expression de ceux c-kit et sca-1 (15). Ils sont à l'origine de la production de cellules T, de cellules B, de cellules NK (Natural Killer) et de CD8 (16), mais ne possèdent pas de potentiel de différenciation myéloïde et érythroïde. Plus précisément, l'étude des populations descendant de ce précurseur intra-thymique « low CD4 » a permis de distinguer une population TN (triple négative CD3-, CD4-, CD8-) précoce, appelée *population pro-cellules T*, capable de donner des CD8 et possédant encore le récepteur à cellules T (TCR) au stade germinale, et une population TN plus tardive appelée *population pré-cellules T* ne pouvant produire plus que des cellules T et ayant des gènes TCR réarrangés (17) (18).

- dans la *moelle osseuse* :

→ de progéniteurs **lymphoïdes** (CLPs) Lin- IL-7R α + exprimant faiblement c-kit et sca-1, à l'origine de la production de toutes les cellules lymphoïdes et de quelques CD8 (19) ;

→ de progéniteurs **myéloïdes** (CMPs) Lin- IL-7R α - c-kit+ CD34+ exprimant faiblement le récepteur I γ R et à l'origine des précurseurs donnant les érythrocytes et les mégacaryocytes, de ceux donnant les granulocytes et les macrophages (20) et enfin, de CD8 (21).

Enfin, la découverte du marqueur CD8 α sur certaines CD8 de souris a permis de renforcer le schéma ontogénique précédent.

En effet, les précurseurs intra-thymiques donnent seulement des CD8 CD8 α ⁺ alors que ceux de la moelle osseuse donnent dans la rate à la fois des CD8 CD8 α ⁺ et des CD8 CD8 α ⁻ (17). Il semble donc que le marqueur CD8 α trouvé chez les CD8 de souris révèle une lignée lymphoïde.

De plus, les souches CD8 α ⁺ et CD8 α ⁻ placées en culture courte *in vitro* n'ont pu se différencier respectivement ni en l'une ni en l'autre souche. Elles représentent donc deux souches de CD8 issues de deux lignées distinctes plutôt que deux stades de développement différents d'une même lignée.

Chez *l'Homme*, l'équivalent des CMPs n'a pas encore été décrit mais des progéniteurs similaires aux CLPs murins ont été identifiés.

Quoiqu'il en soit l'origine myéloïde des CD8 n'est pas remise en cause car elles peuvent croître à partir de progéniteurs hématopoïétiques à potentiel de différenciation myéloïde et qu'elles peuvent être produites à partir de monocytes, cellules myéloïdes typiques.

Il est aussi possible de produire en culture des colonies pures de CD8 à partir de la moelle osseuse en présence de GM-CSF (Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor), de TNF- α (Tumor Necrosis Factor) et de facteur de cellule souche (SCF). Ces CD8 sont distinctes de celles myéloïdes mixtes indiquant qu'avec les cellules myéloïdes elles peuvent avoir des précurseurs clonogéniques distincts à certains points de leur développement (22).

L'étude de la production des cellules de Langerhans (CLs), CD8 de la peau découvertes en 1868 par Paul Langerhans, indique aussi l'existence d'options développementales précoces dans la lignée des CD8. Grâce à l'analyse de la différenciation *in vitro* de progéniteurs CD34⁺ issus de la moelle osseuse et mis en culture, il est possible de reconnaître l'existence de précurseurs différents des CLs distinguables par leur phénotype et leur besoin en TGF- β (Tumor Growth Factor).

Parmi les cellules CD34⁺, l'expression de faible niveau de la chaîne IL-3R α ou l'expression de l'Ag cutané associé aux lymphocytes (CLA) définit les progéniteurs capables de donner naissance à des CLs après culture avec du GM-CSF et du TNF- α .

Deux voies de développement ont été identifiées pour la production de CLs (Cellules de Langerhans) et de CDd à partir des progéniteurs CD34+ (23):

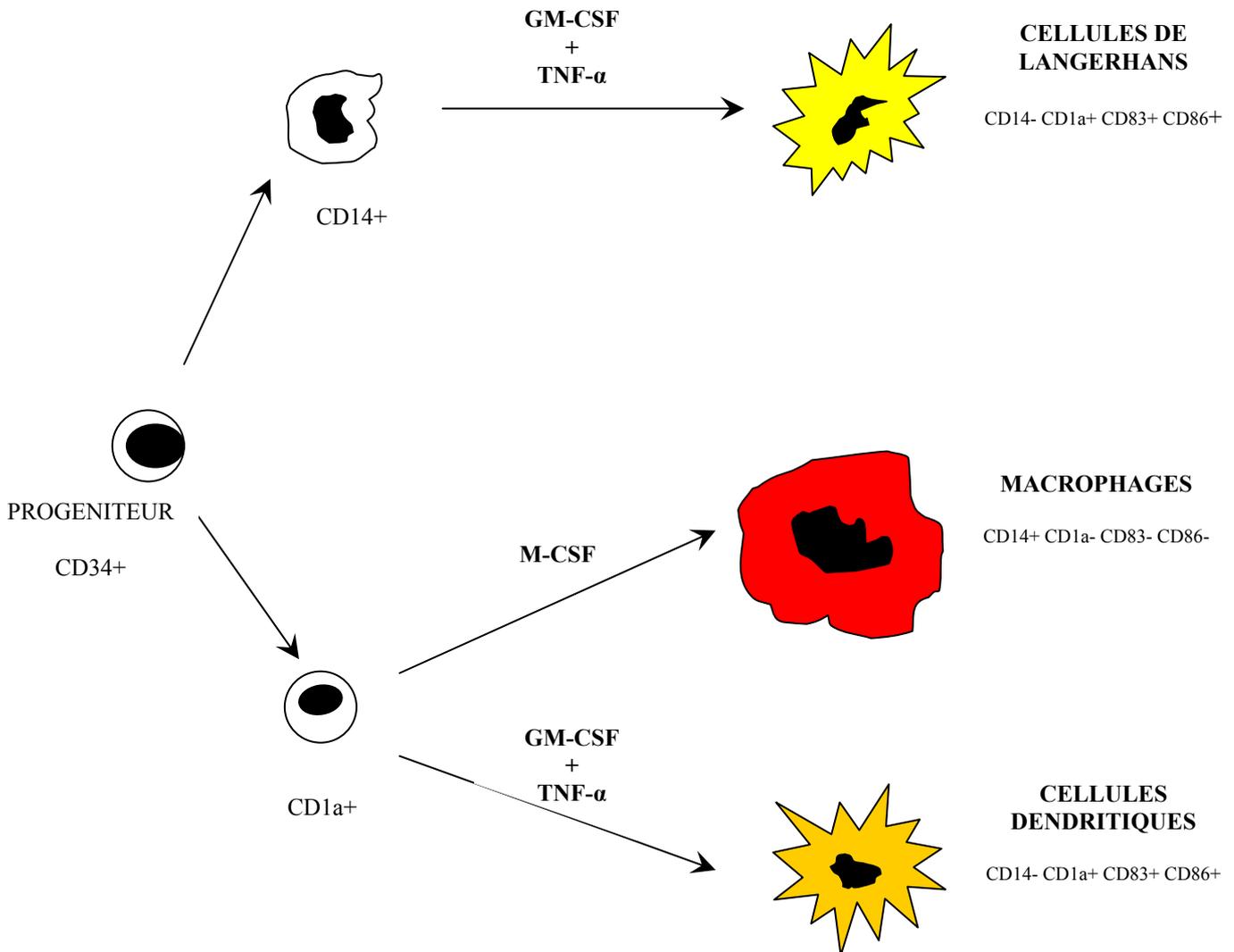


Schéma 1. Différentes voies de production de cellules dendritiques à partir des progéniteurs CD34+ de la moelle osseuse.

D'un autre côté, des relations entre les CD4 et des progéniteurs lymphoïdes ont été mises en évidence. Des progéniteurs hématopoïétiques exprimant CD45RA+ montrent une plus grande aptitude à se différencier en lymphocytes (LT, LB et cellules NK) que la population de cellules souches hématopoïétiques (HSCs) (24) (25). De plus, ils semblent être plus liés aux CLs que la plupart des autres progéniteurs car ils contiennent les cellules CLA+, précurseurs des CLs (26).

Plus précisément, dans la moelle osseuse, les progéniteurs CD34+ CD45RA+ sont distincts des cellules souches hématopoïétiques phénotypiquement et fonctionnellement car ils produisent des lymphocytes et des cellules myéloïdes (granulocytes et monocytes) mais sont dépourvus de progéniteurs érythroïdes indiquant la perte de certaines options développementales par rapport aux HSCs.

Cette population de cellules CD34+ CD45RA+ contient un progéniteur lymphoïde commun CD10+ (CLP) qui représente approximativement 5% des progéniteurs de la moelle osseuse adulte. Son potentiel de différenciation est limité à la production de lymphocytes et de CD4 puisqu'il ne peut pas produire de cellules myéloïdes, d'érythrocytes, de mastocytes et de plaquettes malgré une stimulation avec de multiples facteurs de croissance (27).

La capacité de ces CLPs à produire des cellules T rapidement et leur potentiel de différenciation en LT et CD4 suggèrent que de telles cellules pourraient partir de la moelle osseuse pour coloniser le thymus (16) (28).

En effet, des cellules CD34+ Lin – CD10+ ont été identifiées dans le thymus humain et peuvent être isolées du sang circulant pour produire des CD4 *in vitro*.

Il n'est pas encore clair si ces CLPs sont capables de donner naissance à tous les types de CD4 thymiques ce qui inclut les CD4 interdigitées et les CD4 plasmacytoïdes (29).

En résumé, à ce jour, la complexité à définir un schéma ontogénique précis chez les différentes espèces réside dans l'existence d'une grande diversité phénotypique et histologique de CD4.

Il semble pourtant que le schéma classique actuel assure l'existence d'**une cellule souche hématopoïétique unique** à l'origine de deux lignées distinctes de développement cellulaire, une **myéloïde** et une **lymphoïde**, durant lesquelles, sous certaines conditions, différentes cellules ont la capacité d'acquérir le phénotype et la fonction des CD4.

1.2 Développement hématopoïétique des CD_s et signaux de régulation

En cherchant à comprendre les mécanismes décisionnels à l'origine de l'orientation développementale des cellules hématopoïétiques, l'étude de souris mutantes a permis, dès 1994, de révéler le rôle essentiel de la famille des gènes **IKAROS** dans l'ontogénie des CD_s.

En effet, des souris homozygotes négatives pour un allèle IKAROS ont montré une absence de développement des cellules lymphoïdes B et NK, des altérations spécifiques dans le développement des cellules T et une forte réduction du nombre de CD_s dans les organes lymphoïdes et ce, malgré une abondance de monocytes et de CLs (30).

Ce premier résultat a permis de confirmer l'existence de plusieurs voies de développement des CD_s dans lesquelles la famille IKAROS serait impliquée différemment.

Chez *la souris*, cette famille génique est exprimée abondamment dans les tissus lymphoïdes et semble coder pour des protéines « Kruppel-like zinc finger DNA-binding ».

Des séquences se liant à IKAROS ont ensuite été identifiées dans de nombreux gènes, associés aux cellules T et B, tels les promoteurs et stimulateurs des gènes CD3 γ , δ et ϵ , les gènes TCR α et β , les sites NF κ B de IL-2R α , les gènes de l'interféron β et du CMH II. (31) (32) (33).

Chez *l'Homme*, une famille génique homologue a aussi été identifiée et étudiée (33) et l'ARNm (Acide RiboNucléique messenger) codant pour ces protéines a été détecté dans les cellules CD34⁺ humaines (34).

Pour mettre en évidence leur mode d'action, on a utilisé des protéines murines dominantes négatives pour interférer avec la fonction normale des protéines IKAROS dans les cellules humaines.

Ainsi, la présence de la protéine IK7, issue de la délétion génique des exons 3 et 4, provoque une forte réduction de la capacité à se lier à l'ADN (Acide DesoxyriboNucléique) des hétérocomplexes formés entre IK7 et les autres membres des protéines IKAROS (35).

Par contre, les effets d'IK7 diffèrent avec les conditions de développement. Lorsque des cellules hématopoïétiques humaines exprimant IK7 sont cultivées en milieu favorisant le développement des progéniteurs lymphoïdes en CD_s mais pas celui des monocytes en CD_s, la production de ces CD_s lymphoïdes est sévèrement bloquée alors que celle des macrophages/monocytes non. Au contraire, lorsque les progéniteurs exprimant IK7 sont cultivés dans un milieu favorisant le développement des monocytes en CD_s, des CD_s ont bien été produites (36).

Un des mécanismes moléculaires expliquant l'action des protéines IKAROS sur le développement de ces progéniteurs serait la régulation de la production de l'ARNm codant pour le récepteur Flt-3. La protéine IK7 serait donc à l'origine d'une baisse de production de ce récepteur tyrosine kinase qui, une fois activé par son ligand et en synergie avec d'autres cytokines, a un effet prolifératif primordial sur ces progéniteurs.

D'autres études expérimentales réalisées chez des souris mutantes ont permis de révéler le rôle essentiel de la famille des **facteurs de transcription NFκB/Rel** dans le développement des CD8.

Ainsi, la protéine RelB a été mise en évidence dans les tissus lymphoïdes et semble fortement exprimée dans le noyau des CD8 interdigitées. Une augmentation de l'expression de la protéine et de sa translocation du cytoplasme au noyau est liée à l'activation, la maturation et le fonctionnement des CD8 (37).

Les souris déficientes en protéine RelB sont dépourvues de CD8 thymiques et ont une immunité cellulaire déficiente. Plus précisément, chez ces souris, il semble que la classe des CD8 spléniques CD8α- dites myéloïdes soit sévèrement réduite alors que celle des CD8 CD8α+ dites lymphoïdes ne soit pas affectée (38).

Enfin, il est à signaler que les CLs de la peau sont présentes à la fois chez les souris déficientes en Relb et chez celles déficientes en IKAROS.

Concernant le **facteur de transcription PU.1** exprimé dans les cellules hématopoïétiques, il semble pouvoir réguler l'expression de plusieurs gènes myéloïdes et lymphoïdes et est indispensable au développement des cellules lymphoïdes B et des macrophages.

L'étude de souris mutantes pour ce facteur PU.1 a abouti à l'absence dans le thymus fœtal et néonatal de macrophages mais aussi de CD8. Plus précisément, les CD8 lymphoïdes CD8α+ DEC-205+ ont été détectées alors que celles myéloïdes CD8α- DEC-205- non (39).

En résumé, la production de chaque lignée sanguine implique la différenciation progressive de cellules souches hématopoïétiques en cellules intermédiaires de plus en plus spécialisées.

Un des stades intermédiaires du développement des CD8 à partir d'**une cellule souche hématopoïétique commune** (HSC) est représenté par **une spécification progressive** en progéniteurs **lymphoïdes**, dits plasmacytoïdes chez l'Homme, ou en progéniteurs **myéloïdes**.

Le rôle essentiel de certains facteurs de transcription, tels les protéines IKAROS, RelB et PU.1, est aujourd'hui évident mais il reste à en définir plus précisément les mécanismes moléculaires.

L'intérêt d'une telle hétérogénéité dans le développement des CD doit se trouver dans l'obtention de lignées distinctes aux fonctions spécifiques et non redondantes.

Il est possible au contraire qu'elles permettent une formation redondante de ces cellules immunes primordiales ou encore qu'elles représentent des mécanismes de régulation versatiles.

2. Renouveau

L'apparition de CD différenciées exprimant les molécules du CMH de classe II est tardive au cours du développement. En effet, la densité de CD différenciées trouvée chez l'adulte n'est atteinte chez la souris qu'à partir de l'âge de trois semaines dans les noeuds lymphatiques et quatre semaines dans la rate alors que les nouveaux-nés possèdent déjà des macrophages typiques (2). Ce phénomène pourrait en partie expliquer l'immaturité du système immunitaire des nouveau-nés.

Les premières expériences de culture de précurseurs dendritiques en présence de GM-CSF ont montré que les CD ont une importante capacité de prolifération.

Pour calculer le taux de renouvellement d'un type cellulaire, il faut connaître les flux d'entrée et de sortie des cellules dans l'organe, la multiplication cellulaire locale et enfin, la mort cellulaire ou la transformation en un autre type cellulaire.

La mesure de ce taux de renouvellement a été réalisée grâce à diverses techniques dont la plus employée est l'incorporation de thymidine tritiée à l'ADN en division permettant à la fois de connaître le pourcentage de cellules en division à un instant donné ainsi que la proportion de cellules renouvelées par unité de temps, à partir de cellules en division.

D'autres techniques, comme la mesure du chimérisme (cinétique de recolonisation d'un tissu par les cellules d'un donneur après irradiation létale et greffe de moelle osseuse allogénique ou congénique), ont abouti à des résultats contradictoires dus à l'existence d'artefacts importants (nécessité d'un temps de colonisation de la moelle osseuse par les cellules transplantées, influence négative des irradiations sur les processus de régulation du renouvellement cellulaire).

Quoi qu'il en soit, malgré quelques différences dues aux différentes espèces ou tissus étudiés, la majorité des études montre que **le taux de renouvellement des CD est rapide**. En effet, le temps de renouvellement du pool de CD spléniques est de 8 à 11 jours (2), des noeuds lymphatiques mésentériques de 3 jours (40), de la lymphe périphérique de 3 à 10 jours (41). Ceci les distingue des macrophages spléniques qui, chez les mêmes animaux ont un turn-over 4 fois plus lent que celui des CD (2).

D'autres observations, comme l'absence de figures mitotiques parmi les CDs de la lymphe ou l'absence de détection de CDs marquées dans la lymphe périphérique et la lamina propria après injection IV de thymidine tritiée, ont abouti à la conclusion que les CDs périphériques sont des cellules différenciées qui ne se divisent pas à l'exception des cellules de Langerhans (CLs) épidermiques qui se divisent dans l'épiderme et dont nous parlerons ultérieurement.

Cette dernière constatation expliquerait un renouvellement des CLs de plusieurs semaines avec 60 à 80% de CLs épidermiques remplacées par des précurseurs de la moelle osseuse en 2 semaines mais persistance de 20% après 5 à 8 mois (42).

Le mécanisme responsable du renouvellement des CDs a longtemps posé problème. Les premières hypothèses (2) envisageaient soit une durée de vie courte, soit une migration de la rate vers d'autres sites, ou encore une transformation en un autre type cellulaire et enfin, des propriétés acquises nouvellement empêchant leur reconnaissance. Enfin, l'explication la plus probable qui a été retenue est la formation d'agrégats entre les CDs et les lymphocytes de la rate diminuant ainsi leur capacité à adhérer au verre.

Plus tard, des études ont tenté de trouver la cause de la mort des CDs survenant après quelques jours dans le paracortex des noeuds lymphatiques. Malgré le large flux de CDs dans ces organes, 1.10^5 cellules par heure dans le noeud lymphatique mésentérique de rat (42) et 2.10^5 dans le noeud lymphatique poplité de lapin (43), il y a seulement quelques signes de leur mort cellulaire dans le paracortex.

Une *première théorie* avançait que les cellules interdigitées se transformaient petit à petit en macrophages et ensuite, migraient dans la medulla. Cette hypothèse a été appuyée par l'observation de cellules à apparence intermédiaire (cellules lipid-laden) dans le paracortex des noeuds lymphatiques de rat (44).

Une *deuxième théorie*, qui aujourd'hui est la seule retenue, avançait que les CDs ayant interagi avec des Ags étaient la cible des cellules NK, véritables nettoyeurs, agissant au niveau du paracortex des noeuds lymphatiques et signifiant ainsi **un véritable autocontrôle négatif** des réponses immunes à LT.

3. Migration

Concernant les CDs, trois étapes de développement ont été décrites : les précurseurs des CDs circulant dans le sang, les CDs immatures résidant dans les tissus périphériques et les CDs matures localisées dans les tissus lymphoïdes secondaires.

Lors de conditions normales, le nombre de CDs recrutées à partir du sang vers les tissus périphériques et des tissus vers les organes lymphoïdes secondaires est probablement faible. Lors d'un phénomène inflammatoire, ce nombre est considérablement augmenté. *In vivo*, le phénomène migratoire des CDs a d'abord été observé lors de phénomènes allergiques et de greffes de tissus (45) (46).

De récentes études sur les molécules et les facteurs chimiotactiques ont permis d'éclairer la complexité des mécanismes régissant la migration des CD45 à travers les tissus.

3.1 De la moelle osseuse au sang et aux tissus périphériques

A l'exception des CD45 folliculaires localisées exclusivement dans les follicules (voir ultérieurement) et qui ne semblent pas migrer, tous les types de CD45 connus dérivent de la moelle osseuse (45). Par contre, les mécanismes contrôlant la production des progéniteurs et leur libération dans le courant sanguin sont encore mal connus.

On ne sait pas non plus si ces contrôles sont autonomes, exclusifs à la moelle osseuse ou dépendants, sous l'influence de facteurs paracrines exogènes, ou encore, affectés par les stimuli de l'environnement externe.

Ce que l'on sait est que, même si les CD45 circulant dans le sang sont rares (moins de 1%) (8), permettant un trafic incessant entre le sang, la lymphe et les tissus, un approvisionnement constant est assuré par la moelle osseuse.

De plus, la plus abondante source potentielle de précurseurs sanguins de CD45 dérivés de la moelle osseuse est représentée *in vivo* par les monocytes sanguins. Ils sont regroupés dans le pool sanguin marginal constitué par les micro vaisseaux du foie et de la rate où le sang coule lentement.

L'autre source de précurseurs sanguins est constituée par les cellules plasmacytoïdes qui, après mise en culture avec le ligand CD40 et l'interleukine 3 (IL-3) (47), se transforment en CD45 lymphoïdes de type 2, c'est-à-dire dirigeant les réponses à cellules T vers un type 2 « T helper ».

D'un autre côté, de nombreuses expériences sur l'expression de **molécules d'adhérence**, gouvernant la liaison aux cellules endothéliales et à la matrice extracellulaire, par différents types de CD45 ont permis de mettre en évidence leur rôle primordial dans le positionnement et la migration des CD45.

Ainsi, les CD45 issues des monocytes et les CD45 CD34+ différenciées expriment *in vitro* les β 2 intégrines LFA-1, Mac-1, p150, 95, et les β 1 intégrines VLA-4 et VLA-5, deux familles inhibant la liaison des CD45 aux cellules endothéliales dans les expériences d'adhérence (48).

De même, les CLs expriment des β 1 intégrines et le E-cadherine qui joue un rôle dans la localisation épidermique des CLs et qui, sous-exprimée par divers stimuli (IL-1, TNF, LPS : LipoPolySaccharides), permet le départ des CLs de la peau (49).

Enfin, les CD45 migrent à travers une monocouche de cellules endothéliales cultivées sur des filtres poreux en polycarbonate grâce à l'expression de la molécule d'adhérence PECAM-1 alors que l'anticorps monoclonal anti-PECAM-1 inhibe cette migration (50).

De plus, il a été mis en évidence que le nombre de CD45 migrant à travers cette monocouche de cellules endothéliales est multiplié par 2 à 3 fois sous l'influence de différentes chimiokines telles MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES et SDF-1 (48) (50).

Enfin, d'autres expériences ont permis de mimer la migration baso-apicale des CD4 au niveau des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Elles ont révélé que 20% des cellules adhérentes pouvaient traverser la matrice extracellulaire et les cellules endothéliales.

3.2 Recrutement puis positionnement dans les tissus périphériques non lymphoïdes

Le recrutement puis le positionnement des CD4 dans les tissus périphériques non lymphoïdes est conditionné par l'interaction entre des récepteurs membranaires exprimés par les CD4 et la présence dans le milieu de chimiokines.

Dans un système physiologique normal, le recrutement des CD4 vers les tissus périphériques sains est encore mal expliqué mais une des hypothèses la plus probable est que les chimiokines attractives peuvent être produites à de faibles niveaux dans les tissus sains.

En effet, des expériences ont mis en évidence la production par les kératinocytes et les autres épithéliaux de la protéine inflammatoire MIP-3 α . Or, les précurseurs CD14⁻ CD1a⁺, issus des progéniteurs CD34⁺ et à l'origine des CLs, expriment de façon dominante le récepteur CCR6 spécifique de cette chimiokine (51).

Lors d'inflammation ou d'infection dans l'organisme, la production des chimiokines est fortement augmentée ainsi que l'expression des récepteurs membranaires correspondants sur les CD4 immatures.

Ainsi, des expériences *in vitro* utilisant des CD4 immatures, générées à partir de monocytes et mises en culture sous facteurs inflammatoires, ont révélé l'expression sur ces CD4 de récepteurs tels CCR6, CCR4, CCR5 et CXCR4, respectivement récepteurs des chimiokines MIP-3 α , MDC, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MCP-2 et SDF-1 (52).

De même, la purification puis l'étude par PCR (Polymerase Chain Reaction) de CD4 circulantes a mis en évidence l'expression par celles-ci des récepteurs CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 et CXCR4.

Enfin, il est intéressant de souligner que CCR5 et CXCR4, exprimés sur les CD4 immatures, sont des récepteurs pour R5 et X4, extensions du virus VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) (53) (54). On comprend alors que, par leur positionnement de sentinelles dans les tissus périphériques et leur capacité à migrer, les CD4 sont des facteurs influents de la dissémination du VIH dans l'organisme.

3.3 Migration vers les tissus lymphoïdes

Il est aujourd'hui acquis que les CD_s immatures sont mobilisées vers les sites périphériques en réponse à une inflammation ou une infection, puis qu'elles migrent via la lymphe ou le sang vers les tissus lymphoïdes secondaires. Or, c'est au cours de cet événement que va se dérouler la **maturation** de ces cellules.

Ce phénomène a d'abord surtout été étudié chez les CL_s de l'épiderme. Plusieurs observations ont été retenues :

- 1- la présence de CD_s avec des granules de Birbeck dans la lymphe afférente et les ganglions drainant la peau (55)
- 2- lors d'une greffe de peau, les CL_s migrent de l'épiderme vers le derme puis quittent la peau (56)
- 3- un allergène appliqué sur la peau est capté par les CL_s et se retrouve quelques heures plus tard dans les cellules interdigitées des ganglions drainants (57).

Le mécanisme moléculaire de cette migration a ensuite été expliqué progressivement à travers des expériences mettant en jeu diverses cytokines et chimiokines.

Ainsi, l'application d'allergènes sur la peau de rat ou sur des explants de peau humaine provoque la production locale de plusieurs cytokines pro-inflammatoires, surtout IL-1 β et TNF- α (58). Or, des expériences réalisées sur des animaux déficients en récepteur TNF-R révèlent une absence de migration des CD_s (59) alors qu'inversement, l'application cutanée de TNF induit une migration des CD_s des tissus périphériques vers les nœuds lymphatiques (60).

Ainsi, les cytokines TNF- α et IL-1 β (produites par les mastocytes) représentent des clefs indispensables pour la mobilisation des CD_s et leur maturation.

De même, l'utilisation de la cytokine IL-4, qui diminue l'expression du récepteur TNF-R II chez *l'Homme*, inhibe cette mobilisation (61). Chez *la souris*, c'est la cytokine IL-10 qui, en diminuant à la fois la production de TNF- α et de IL-1 β , a le même effet inhibitoire (62).

De plus, il a été observé *in vivo* une absence de migration des CD_s chez des souris déficientes en CD40, molécule membranaire indispensable à la maturation et à l'activation des CD_s (63).

Enfin, des productions bactériennes exogènes, les lipopolysaccharides (LPS), peuvent aussi mobiliser les CD_s de l'intestin vers la lymphe ainsi que celles interstitielles de tissus comme le cœur ou les reins (64).

En fait, lors d'exposition à ces facteurs inflammatoires, bactériens ou au ligand de CD40 (CD40L), il y a une baisse d'expression de certains récepteurs membranaires des CD4 (65) (66) (67) d'où une inhibition de la réponse aux chimiokines locales MIP-1 α , MIP-2 α , MIP-3 α , RANTES et MCP-3.

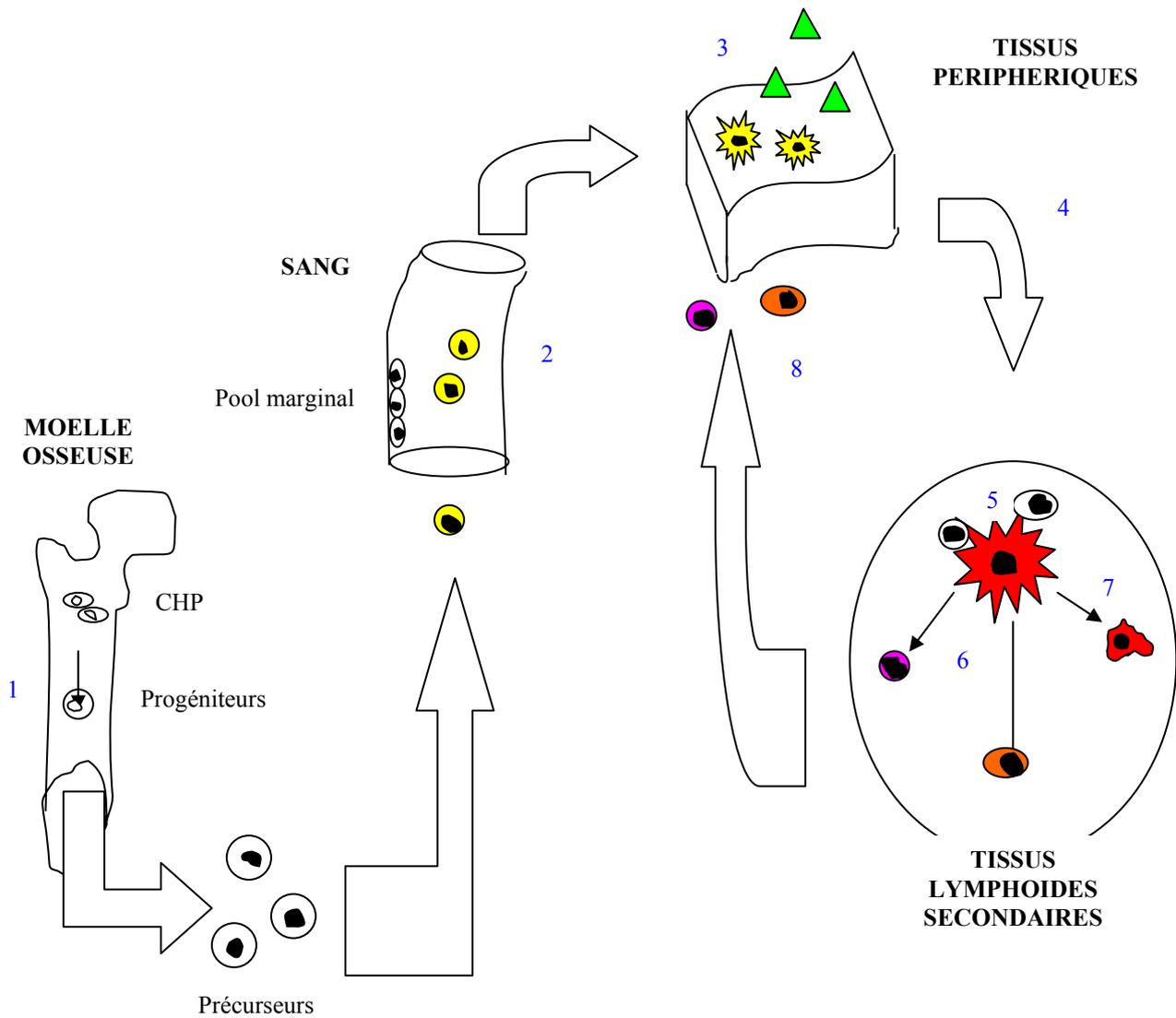
Parallèlement, l'expression du récepteur CCR7 des CD4 (68) est fortement augmentée. Or, son ligand spécifique, la chimiokine MIP-3 β , est spécialement exprimé dans les zones riches en cellules T de la rate et des nœuds lymphatiques où les CD4 matures demeurent et se transforment en CD4 interdigitées (69).

L'augmentation de l'expression du récepteur CCR7 chez les CD4 en migration vers les organes lymphoïdes secondaires est donc un moment crucial pour la bonne localisation de ces cellules dans les zones T.

Il en est de même pour la chimiokine SLC exprimée par les cellules du stroma et aussi dans les veinules endothéliales, véritables portes d'entrée des LT naïfs (70).

Dans ce sens, des études effectuées sur des souris déficientes en protéines SLC, MIP-3 β et CCR7 ont abouti à une déficience de migration des LT et des CD4 vers les organes lymphoïdes secondaires (71).

En résumé, la migration des CD4 des tissus périphériques aux organes lymphoïdes secondaires résulte de l'action conjointe de chimiokines et de molécules d'adhérence qui provoque **une sorte de trafic signalétique** guidant les CD4 à travers les tissus.



1. production des précurseurs des CD
2. migration sanguine
3. capture de l'antigène
4. migration dans la lymphe afférente
5. sélection des lymphocytes
6. activation des lymphocytes
7. apoptose des CD
8. action des lymphocytes activés

CHP cellule hématopoïétique pluripotente

Schéma 2. Activation du système des cellules dendritiques lors d'une agression de l'organisme (infectieuse, virale ou tumorale).

4. Distribution tissulaire des CDs

Les premières recherches sur la distribution tissulaire des CDs ont été réalisées chez la souris et le rat. Les CDs sont présentes dans tous les tissus à l'exception du cerveau. Elles y constituent des populations minoritaires difficiles à identifier et à purifier. Elles représentent 1% à quelques % des cellules de l'épiderme cutané, des muqueuses du poumon et de l'intestin, ainsi que de la plupart des tissus lymphoïdes (72) (73) (13).

4.1 CDs des tissus non lymphoïdes

On trouve des CDs dans tous les épithélia squameux stratifiés (malpighiens) de l'organisme (épithélia des muqueuses orale, œsophagienne, vaginale, recto-anale et cornéenne). Elles ont d'abord été observées en 1868 dans l'épiderme de la peau par **Paul Langerhans** d'où leur dénomination de **cellules de Langerhans** (CLs) (74). Elles se caractérisent d'un point de vue ultrastructural par la présence dans leur cytoplasme d'un organe spécifique trilaminaire, le **granule de Birbeck** (75).

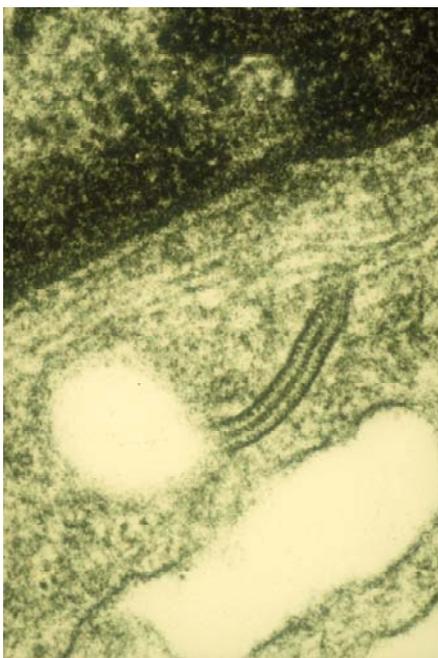


Photo 1. Granule de Birbeck

Suspension de cellules épidermiques de chat,

Microscopie électronique à transmission.

Quantitativement, elles représentent 2 à 4% des cellules épithéliales de l'épiderme où elles forment un véritable réseau, dans les couches basales et suprabasales (76) (11), particulièrement visible après coloration à l'ATPase (Adénosine TriPhosphatase) ou immunomarquage avec un Ac se fixant sur les molécules du CMH de classe II.

Chez l'**Homme**, la densité de ces CLs varie selon la région : de près de 200/mm² sur les paumes et les voutes plantaires à 970/mm² sur le visage et le cou.

Ainsi, elles jouent le rôle de "**filtre immunologique**" capable de capter tout corps étranger ou Ag ayant pénétré l'épiderme par exemple. Certains auteurs ont défini ces CLs comme des "**sentinelles**" du système immunitaire (77).

Dans la plupart des organes et tissus comme les poumons (78) (79), le cœur et les reins (80), et le derme (81), les **CDs interstitielles** (CDI) représentent comme les CLs un important réservoir de CDs immatures. Elles diffèrent de ces dernières par l'absence de granules de Birbeck et par l'expression non constante des antigènes CD1.

4.2 CDs de la lymphe et du sang

Des CDs, appelées **cellules voilées**, ont été identifiées dans *la lymphe afférente* aux ganglions (82) (43). Elles sont issues des CDs des tissus non lymphoïdes comme les épithélia et migrent vers les ganglions drainants.

Dans *le sang*, les CDs représentent moins de 1% des leucocytes circulants. Leur forme différenciée n'a été décrite que chez l'Homme, par contre, des précurseurs dendritiques y ont été identifiés à la fois chez la souris et chez l'Homme (83) (84). Elles représentent les précurseurs en transit entre la moelle osseuse, où se déroule leur production, et les tissus solides où elles vont, sous forme de CDs immatures, remplir leur rôle de sentinelles.

4.3 CDs des tissus lymphoïdes

Dans le *thymus*, les CDs sont localisées essentiellement dans la medulla et à la jonction cortico-médullaire. Elles y forment une trame de cellules d'où leur dénomination de **cellules réticulaires**. Elles y jouent un rôle dans la sélection du répertoire des LT et dans l'induction de la tolérance thymique que nous détaillerons ultérieurement.

Dans la *rate*, deux souches majeures ont été identifiées chez *la souris* (85) (86) :

- une souche CD11c⁺ CD8 α ⁻ DEC205⁻ dans la zone marginale entre la pulpe rouge et la pulpe blanche. Ce sont des CD immatures (MZDCs) qui sont entrées dans la rate par voie sanguine après mobilisation dans les tissus vascularisés.
- Une souche CD11c⁺ CD8 α ⁺ DEC205⁺ dans les zones centrales à cellules T. Ce sont des CD matures (MDCs) qui représentent en partie la souche lymphoïde de CD.

Il semble que les CD de la zone marginale puissent migrer dans les zones centrales à cellules T.

Dans les *nœuds lymphatiques*, trois populations distinctes ont été identifiées chez *la souris* (85) (86) :

- une souche majoritaire CD8 α ⁻ DEC205⁻ CD24⁻ CD11b⁺ représentée par les CD étant entrées récemment dans l'espace subscapulaire des nœuds lymphatiques à partir de tissus non lymphoïdes via la lymphe afférente ;
- une souche CD8 α ⁺ DEC205⁺ CD24⁺ CD11b⁻ dans les zones paracorticales à cellules T. On les dénomme **cellules interdigitées** (CDI) ;
- une souche minoritaire CD8 α ⁻ DEC205⁺ CD24⁺ CD11b⁻ et d'origine inconnue.

Dans les *plaques de Peyer*, chez *la souris*, on retrouve les mêmes souches de CD que celles décrites dans la rate et les nœuds lymphatiques (87) (86) :

- une souche correspondant aux CD de la zone marginal de la rate et située dans le dôme sub-endothélial ;
- une souche correspondant aux CD interdigitées situées dans les zones centrales à cellules T.

Chez *l'Homme*, une souche distincte CD4⁺ CD11c⁺ CD3⁻ a été identifiée dans les centres germinaux des follicules (47) à la fois dans les zones sombres et claires, et ce, dans les nœuds lymphatiques, la rate et les amygdales. Ces CD y sont associées aux cellules T et semblent induire et/ou soutenir la réponse immune à cellules T mémoires. Elles auraient aussi un rôle de maintien dans les réponses secondaires à cellules B T-dépendantes.

5. Marqueurs phénotypiques des CDs

L'importance du nombre des variations intra- et extracellulaires que subissent les CDs au cours de leur vie cellulaire, aussi bien au niveau de leur morphologie, de leur fonction, de leur localisation et de leur phénotype, n'a pas facilité la caractérisation de ces cellules.

A cette grande variabilité phénotypique des CDs chez une même espèce vient se rajouter la difficulté de la variabilité d'expression de certains marqueurs entre les espèces.

5.1 Variations interspécifiques

Même si l'identification de cellules similaires aux CLs de la peau humaine et aux CDs de la rate de souris a été réalisée très rapidement dans d'autres espèces comme les rats, les cochons, les lapins et les moutons, l'étude phénotypique plus approfondie de ces cellules a surtout concerné les espèces humaine et murine.

Chez *la souris*, trois anticorps monoclonaux ont permis d'identifier des épitopes spécifiques des CDs murines.

Le premier, l'Ac 33D1 de rat, se fixe sur une molécule membranaire non identifiée à ce jour (88).

Le deuxième, l'Ac NLDC-145, reconnaît l'Ag DEC-205, molécule membranaire de type récepteur à mannose exprimée par les CDs des zones à LT, par l'épithélium cortical splénique et par les macrophages activés (89) (90).

Le troisième, l'Ac N418, se fixe sur la molécule membranaire CD11c appartenant à la famille des β 2-intégrines (91) et exprimée fortement sur les CDs de souris. Par contre, il n'est pas spécifique de ces cellules car il se fixe aussi sur d'autres leucocytes tels les macrophages.

Enfin, on peut citer les Acs OX62 (92) et OX41 (93).

Chez *l'Homme*, le phénotype basique de la surface membranaire a identifié les CDs comme étant des leucocytes CD45+ exprimant fortement les molécules du CMH II et non les marqueurs associés aux autres lignées leucocytaires tels CD3, CD15, CD16, CD56, CD19, CD20 et CD14.

Cette population de leucocytes associée aux CDs a été appelée « **lignée négative** » (**Lin -**).

D'autres marqueurs ont ensuite permis d'analyser ces populations Lin -. C'est le cas des 5 molécules de la famille CD1. Ainsi, les CLs expriment CD1a (94) alors que celles dermiques et migrantes expriment plutôt CD1b (95). CD1a, CD1b et CD1c semblent aussi se situer sur les CDs interdigitées drainant la peau (96).

Si les CDs sanguines n'expriment pas CD1a, elles sont positives pour l'intégrine CD11c comme d'autres CDs tissulaires.

Les autres Acs monoclonaux de première génération les plus utilisés sont ceux reconnaissant des antigènes exprimés sur les CDs activées ou cultivées, CD83, CMRF-44 (97) et CMRF-56 (98).

L'Ac de CD83, HB 15a, marque les CDs cultivées de sang humain, les CLs et certaines CDs interdigitées dans les nœuds lymphatiques ainsi que les LB activés (99). La molécule membranaire a longtemps été étudiée car elle joue un rôle essentiel dans les interactions entre CDs et LT (voir ultérieurement).

Il est à noter que des marqueurs cytoplasmiques ont aussi été associés aux CDs tels CD68 (100) sur les granules lysosomiaux puis DC-LAMP (101), Ag associé aussi aux lysosomes matures des CDs.

5.2 Variations intraspécifiques

Dans la *moelle osseuse humaine*, une sous-population de cellules CD34+ ayant la capacité de se différencier à la fois suivant une lignée myéloïde ou une lymphoïde a été identifiée comme précurseur des CDs (102).

La population prédominante CD34+ CD33+ présente dans la moelle osseuse semble plutôt être précurseur pour les CDs myéloïdes.

Le précurseur le plus rapidement isolé est CD14-, mais au cours de la culture *in vitro* un autre, CD14+, apparaît.

Enfin, un précurseur CD34+ différent se différencie indépendamment en CLs CD1+ Lag+ (103).

Dans le *sang humain*, deux sous-classes de CD sanguines ont été d'abord identifiées : les CD $CD11c^+ CD123^{-/low}$ et celles $CD11c^- CD123^+$ (104).

Plus précisément, trois sous-populations sanguines ont été mises en évidence après analyse de la population cellulaire $Lin^- HLA DR^+$:

- la sous-population $CD11c^+ CD123^{-/low} HLA DR^{++}$
- la sous-population $CD11c^- CD123^- HLA DR^+$ qui est aussi $CD34^+$ et représente les cellules issues de la moelle osseuse
- la sous-population $CD11c^- CD123^{+++} HLA DR^{++}$.

Plus récemment, la découverte de deux anticorps monoclonaux, BDCA-2 et BDCA-4, marquant respectivement les sous-populations $CD11c^- CD123^+$ et $CD11c^+ CD123^-$, a permis de différencier ces 2 sous-classes de CD sanguines (105).

Dans les *tissus non lymphoïdes humains*, les CD dites interstitielles peuvent être séparées en deux populations distinctes phénotypiquement.

La première est représentée par les CD des épithélia tels la peau, les tractus respiratoire et uro-génital. Les plus étudiées ont été les CLs épidermiques marquées $CMH II^{+++} CD1a^{+++} CD14^-$. *In situ*, certaines expriment faiblement les marqueurs CMRF-44, CD83, CD40 et CD86 mais elles sont toutes $CD80^-$. Elles expriment aussi des molécules d'adhésion comme les $\beta 1$ -intégrines CD44 et CD54. Elles se caractérisent encore par l'expression de la E-cadherine qui joue un rôle dans leur adhésion avec les kératinocytes (106), et de la langerine (107), une lectine de type II responsable de la formation des granules de Birbeck.

La deuxième population correspond à toutes les CD des tissus non épithéliaux comme celles du derme, du cœur, des reins, du foie ou des poumons mais aussi à celles des structures glandulaires épithéliales profondes. Concernant les CD dermiques $CMH II^+ CD1a^+ CD36 Lag^-$ (108), l'absence de granules de Birbeck et donc du marqueur Langerine, a permis de les distinguer des CLs migrant à travers le derme.

Dans les *tissus lymphoïdes*, les populations de CD's dites interdigitées sont phénotypiquement complexes à définir avec des variations selon le stade d'activation, la localisation et bien sûr les espèces.

Par exemple, dans les amygdales humaines les CD's Lin- des zones lymphoïdes T sont en partie CD13- CD33- CMRF44- et CD83- mais une partie CMH II+ est activée et exprime les marqueurs CMRF44 et CD83.

Une troisième population a ensuite été découverte dans les centres germinaux exprimant CD4, CD11c, CD11b, CD13, CD33 et CD45 mais pas CD21 ce qui la distingue de celle représentée par les CD's folliculaires CD21+.

Enfin, plus récemment, une analyse plus poussée, réalisée à la fois sur des cellules isolées et des coupes a permis de distinguer 5 sous-populations (109):

- la sous-population HLA DR++ CD11c- CD123+
- la sous-population HLA DR+++ CD11c+ CMRF44+++
- la sous-population HLA DR++ CD11c+ CD13+ CMRF44low
- la sous-population HLA DR++ CD11c- CD123-
- la sous-population HLA DR++ CD11c+.

En résumé, la caractérisation phénotypique des CD's se présente donc comme la présence de nombreux **marqueurs antigéniques** au niveau cellulaire, s'exprimant ou non à un moment ou dans un lieu donné car liée au niveau de maturation de la cellule, à sa fonction et à sa localisation.

Malgré les difficultés provoquées par cette grande variabilité d'expression, la connaissance des marqueurs phénotypiques des CD's est très utile pour leur identification en histologie ainsi que pour leur purification.

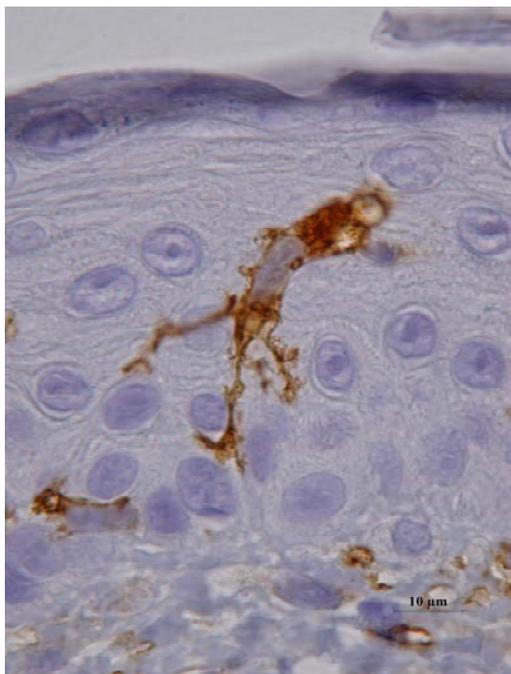


Photo 2. *Cellule dendritique épidermique*

Épiderme de chien,

Fixation formol, inclusion en paraffine,

Marquage Ac BLA 36.

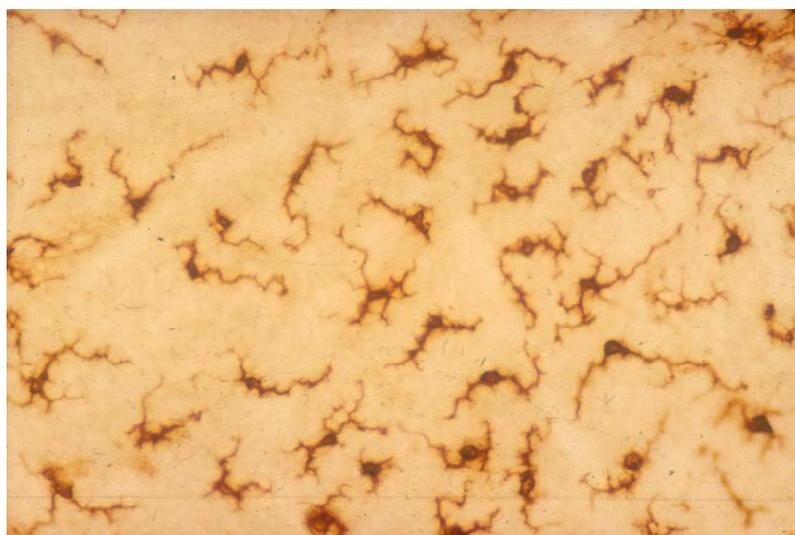


Photo 3. *Cellules dendritiques épidermiques*

Feuillet d'épiderme de chat,

Marquage CD1a.

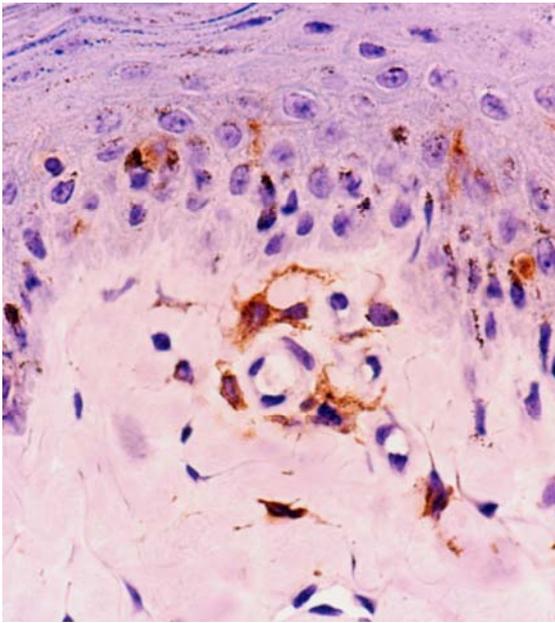


Photo 4. Cellules dendritiques péricellulaires

Peau de chien,
Coupe en congélation,
Marquage Ac anti-CMH II.

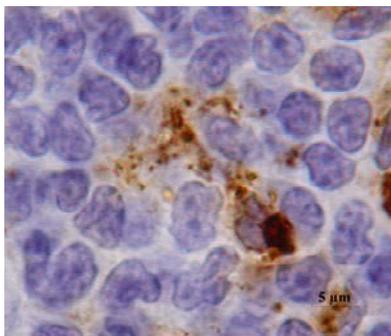
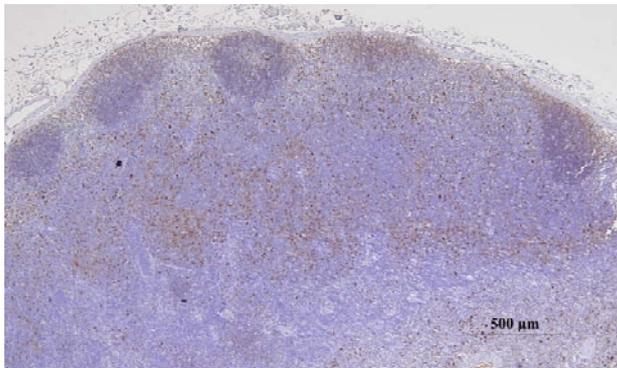


Photo 5. Cellules dendritiques

Nœud lymphatique de chat,
Fixation formol, inclusion en paraffine,
Zone paracorticale,
Marquage Ac anti-DC Lamp.

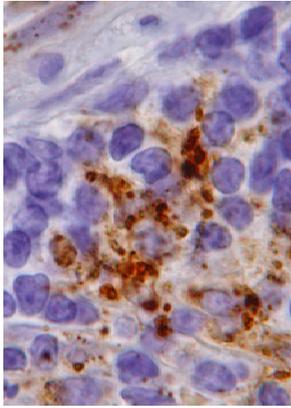
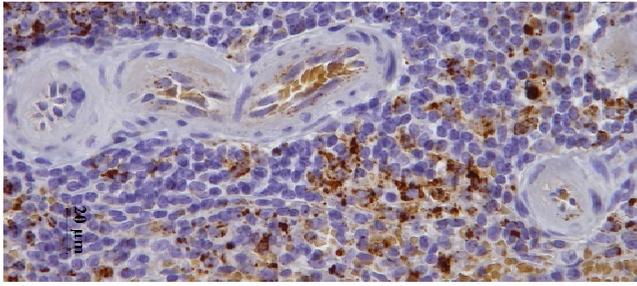


Photo 6. Cellules dendritiques spléniques

Rate de chien,

Fixation formol, inclusion en paraffine,

Manchon péri-artériolaire,

Marquage Ac anti-DC Lamp.

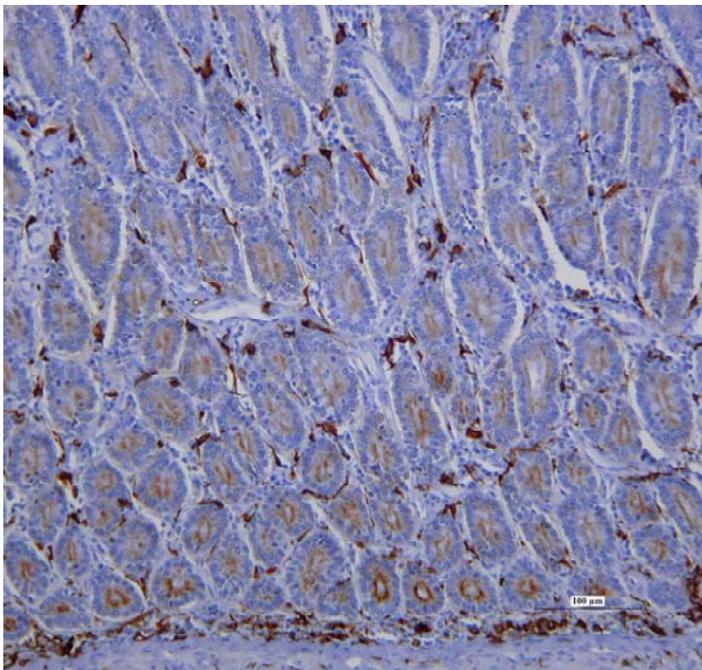


Photo 7. Cellules dendritiques

Intestin grêle de chien,

Fixation formol, inclusion en paraffine,

Marquage Ac anti-BLA 36.

III. Propriétés des cellules dendritiques

Peu de temps après la première description des CD des tissus lymphoïdes, ces cellules sont apparues comme étant particulièrement efficaces pour stimuler les LT. Ceci a d'abord été observé dans des réactions lymphocytaires mixtes (4), puis dans des réactions de stimulation lymphocytaire à un Ag spécifique.

Depuis, cette propriété des CD a été largement confirmée dans de multiples expériences et ces cellules sont progressivement apparues comme **les meilleures CPAgs**, surtout pour la stimulation des LT naïfs (110).

Pendant longtemps, les mécanismes moléculaires expliquant leur supériorité dans la capture et la présentation de l'Ag ont été ignorés. De plus, il existait une contradiction entre leur fonction et leur apparente mauvaise capacité à endocytoser des traceurs du milieu extracellulaire (111). Depuis presque une dizaine d'années, plusieurs expériences ont permis d'expliquer cette contradiction et de mieux comprendre ces mécanismes moléculaires.

1. Capture et apprêtement de l'Ag

Pour remplir son rôle, une CPAg doit être capable d'endocytoser puis de fragmenter par digestion enzymatique les corps étrangers ou les Ags.

1.1 Capture de l'Ag

Cette étape de capture se situe dans les tissus non lymphoïdes où les CD **IMMATURES** peuvent internaliser diverses formes d'Ag pour les transformer et les associer aux molécules du CMH.

Il existe divers procédés :

1- *par macropinocytose* : la macropinocytose est un processus endocytosique dirigé par l'actine et au cours duquel des renflements de la membrane cellulaire fusionnent formant de larges vésicules (de 0,5 à 3 μm de diamètre) contenant de grandes quantités de fluide extracellulaire avec des Ags solubles (112).

Ce volume considérable peut atteindre la moitié du volume cellulaire de la CD par heure. Ce phénomène est sous l'influence de diverses cytokines telles les GTPases (Guanosine TriPhosphatases Cdc42 et Rac1 (113).

2- par phagocytose grâce aux Fc-récepteurs *FcγR*, *FcεR* et *FcαR* : ces récepteurs sont spécialisés dans la phagocytose des complexes immuns car ils interagissent avec les immunoglobulines. On trouve :

→ le récepteur *FcγRI* (CD64) qui est exprimé sur les CD sanguines (114) et permet d'améliorer de 100 à 1000 fois la présentation de l'Ag aux cellules T. Il présente une forte affinité pour les IgG contrairement au récepteur *FcγRII* (CD32) à affinité modérée et exprimé aussi chez les CLs fraîchement isolées (115);

→ les récepteurs *FcεRI* et *FcεRII* (CD23) qui ont quant à eux respectivement une forte et une faible affinité pour les IgE.

FcεRII a été mis en évidence tout d'abord sur les CLs épidermiques (116) puis sur les CD sanguines humaines après action de l'interleukine IL-4 (117). Il jouerait un rôle majeur dans la pathogénicité de l'eczéma atopique (118).

FcεRI est exprimé aussi sur les CLs épidermiques et sur les CD sanguines mais sous sa forme trimérique (2 chaînes γ et 1 chaîne α) et sous celle tétramérique rencontrée chez les mastocytes et les basophiles. Il joue un rôle essentiel dans les réponses allergiques en activant les LT (119). Il serait aussi à l'origine de signaux de costimulation favorisant les réponses à cellules T de type Th2 ;

→ les récepteurs *FcαR*s qui sont des récepteurs des IgA et qui jouent donc un rôle important dans les réponses immunes locales. *FcαRI* (CD89) a été mis en évidence *in situ* et *in vitro* sur les CD interstitielles mais pas sur les CLs (120). Il est capable de capturer des complexes immuns formés avec des IgA à la fois sur des CD immatures et des CD matures (121).

3- par phagocytose grâce aux récepteurs du complément : le récepteur CR1 (CD35) est un récepteur multifonctionnel ayant la capacité de se lier, entre autre, à la sous-unité hexamérique C1q de la protéine du complément C1 (122), favorisant ainsi la phagocytose des complexes immuns. Il semble que les CD expriment deux types de récepteurs C1q, g C1qR et c C1qR (calréticuline), avec une plus forte expression chez les CD immatures (123).

Enfin, l'opsonisation des cellules apoptotiques avec C1q permettrait d'en faire la cible des CD.

Les récepteurs hétérodimères CR3 (CD11b/CD18) et CR4 (CD11c/CD18) sont aussi exprimés par les CD humaines (124). Ils sont responsables de la capture des cellules apoptotiques opsonisées par l'immunoglobuline c3b (125). Il est à signaler que l'expression des chaînes α (CD11b et CD11c) et de la chaîne β (CD18) varie selon les sous-classes de CD. Ainsi, on peut distinguer les CD myéloïdes CD11c⁺ et les CD plasmacytoïdes CD11c⁻. Les CLs épidermiques ainsi que les CD issues des monocytes sont CD11b⁺ CD11c⁺ et CD18⁺ (126) (127). Enfin, il semble que l'activation de ces récepteurs par l'Ig c3b baisse l'expression du CMH II et de CD86 et augmente celle du récepteur CCR7 (128).

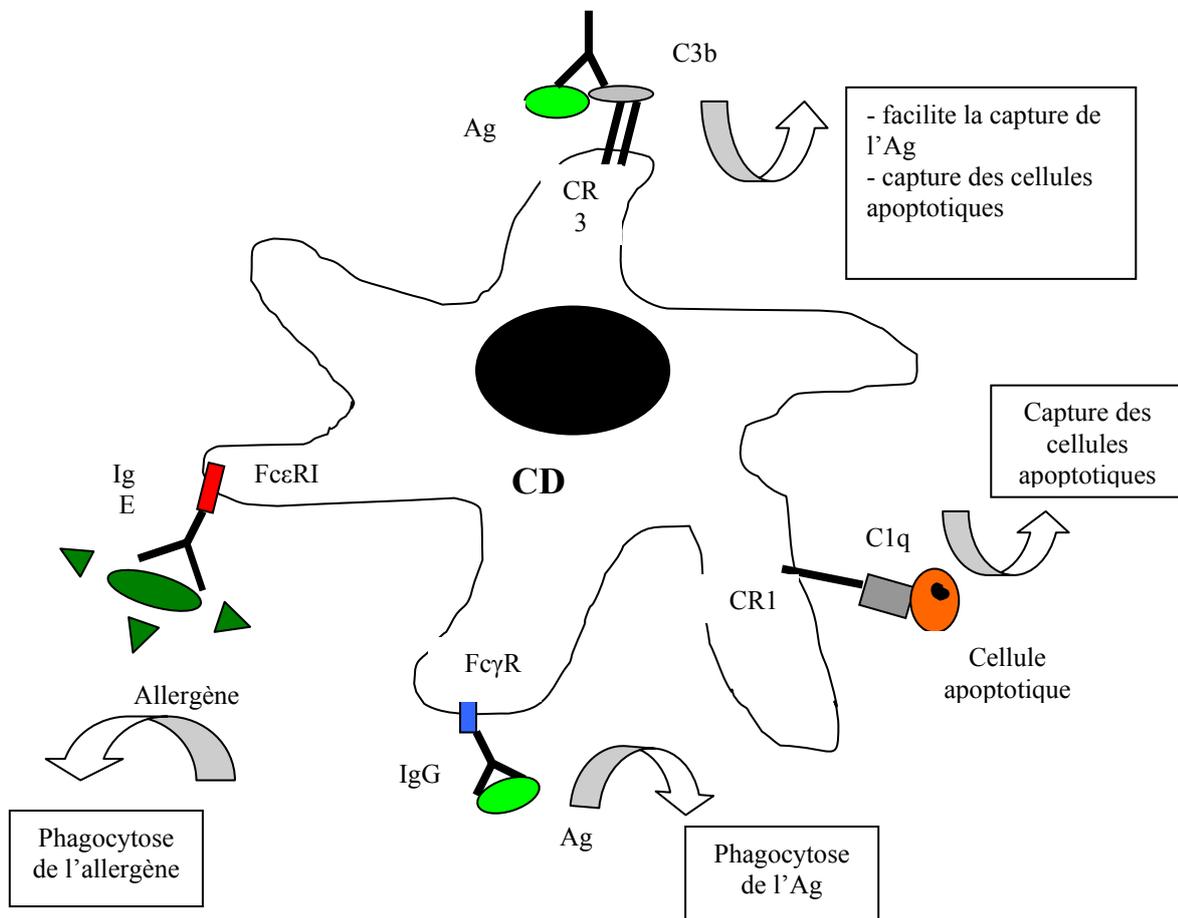


Schéma 3. Expression et rôle de différents récepteurs Fc et du complément sur les cellules dendritiques humaines.

4- par endocytose grâce aux récepteurs à lectine type C : ce sont des récepteurs qui se lient à une famille de lectines dépendantes du calcium.

Le **récepteur mannose** est exprimé sur les CD humaines immatures dérivées des monocytes mais pas sur les CLs (129) (130). Il se lie à des ligands contenant du mannose, du fucose ou de la N-acétylglucosamine, moins bien s'il y a du glucose (131). Ce sont surtout des glycoprotéines ou des glycolipides.

Le complexe récepteur/ligand est rapidement internalisé dans des endosomes où le ligand se dissocie, le récepteur étant alors rapidement recyclé vers la surface cellulaire. Ainsi, en une heure, moins de 10^6 récepteurs mannose sur la surface des CD est capable d'internaliser plus de $2 \cdot 10^7$ molécules ligand (112).

Ce récepteur mannose permet une capture des Ags hautement efficace. Il joue un rôle important dans la phagocytose de nombreuses bactéries (mycobactéries, gram+ et gram-) et d'autres parasites (*trypanosoma cruzi*) (132)

Le **récepteur DEC-205** est un homologue du récepteur mannose, exprimé à la fois sur les CD_s humaines et celles de souris (89). Son expression sur la surface membranaire des CD_s est diminuée durant la maturation mais pas aussi sévèrement que pour le récepteur mannose.

5- par endocytose grâce aux récepteurs Scavenger : ces récepteurs forment une famille de protéines pouvant se lier à des lipoprotéines modifiées (oxydées ou acétylées), des protéines dénaturées ou chimiquement modifiées, et à des bactéries gram⁺ non opsonisées (133). Il en existe trois groupes différents, A, B et C. La plus remarquable dans le groupe B est la protéine CD36 qui, avec l'intégrine $\alpha\beta 5$, facilite la capture des corps apoptotiques par les CD_s humaines immatures (134) (135).

Il est à noter que, si les macrophages peuvent aussi capturer les corps apoptotiques, ils sont incapables de stimuler spécifiquement les LT.

1.2 Apprêtement et présentation de l'Ag

Comme nous venons de le voir, les CD_s sont capables de capturer des bactéries, des virus, des corps apoptotiques ou des cellules nécrosées, des protéines et des complexes immuns, suivant divers procédés (phagocytose, endocytose, macropinocytose) utilisant de nombreux récepteurs de leur membrane cellulaire.

Deux voies de préparation de l'Ag puis de présentation aux cellules T sont alors possibles. Les Ags exogènes sont transformés puis présentés aux cellules T CD₄⁺ associés aux molécules du CMH II tandis que ceux endogènes (issus du cytosol des CD_s comme par exemple les protéines virales) sont présentés aux cellules T CD₈⁺ associés aux molécules du CMH I (136) (137).

1.2.1 Voie du CMH de classe II

Lors de la capture de l'Ag exogène, les CD_s synthétisent de grandes quantités de molécules du CMH de classe II qui correspondent chez l'Homme aux molécules HLA-D et qui sont exprimées exclusivement sur les CPAg_s (cellules B, macrophages, CD_s).

En fait, ce sont des dimères de classe II qui vont s'associer avec la chaîne invariante DM dans le réticulum endoplasmique dit tardif et possédant de nombreuses vésicules membranaires appelées compartiments du CMH de classe II (MIICs) (138) (139) (140). La chaîne DM chaperonne le complexe classe II vers ces MIICs dans lesquels elle est clivée donnant un fragment nommé CLIP (141). Suit alors l'association avec le peptide (de 15 à 34 acides aminés) et les trimères de classe II ainsi formés sont transportés vers la membrane plasmique.

Le recyclage de ces molécules du CMH II à partir de la membrane cellulaire est très important, surtout chez les CD_s immatures (142) (143).

Ces molécules dites " matures" font ainsi de nombreux passages dans les MIICs et permettent ainsi rapidement et efficacement la formation de nouveaux complexes peptide/CMH II.

Suite à la maturation des CD_s, le recyclage s'arrête soudainement et les molécules du CMH II sont transportées à la surface cellulaire dans des vésicules spécialisées CIIVs contenant des molécules de co-stimulation (144). Elles y ont une demi-vie longue de 100 heures permettant ainsi de maintenir l'expression de l'épitope durant toute la durée de la migration des CD_s de la périphérie vers les organes lymphoïdes secondaires.

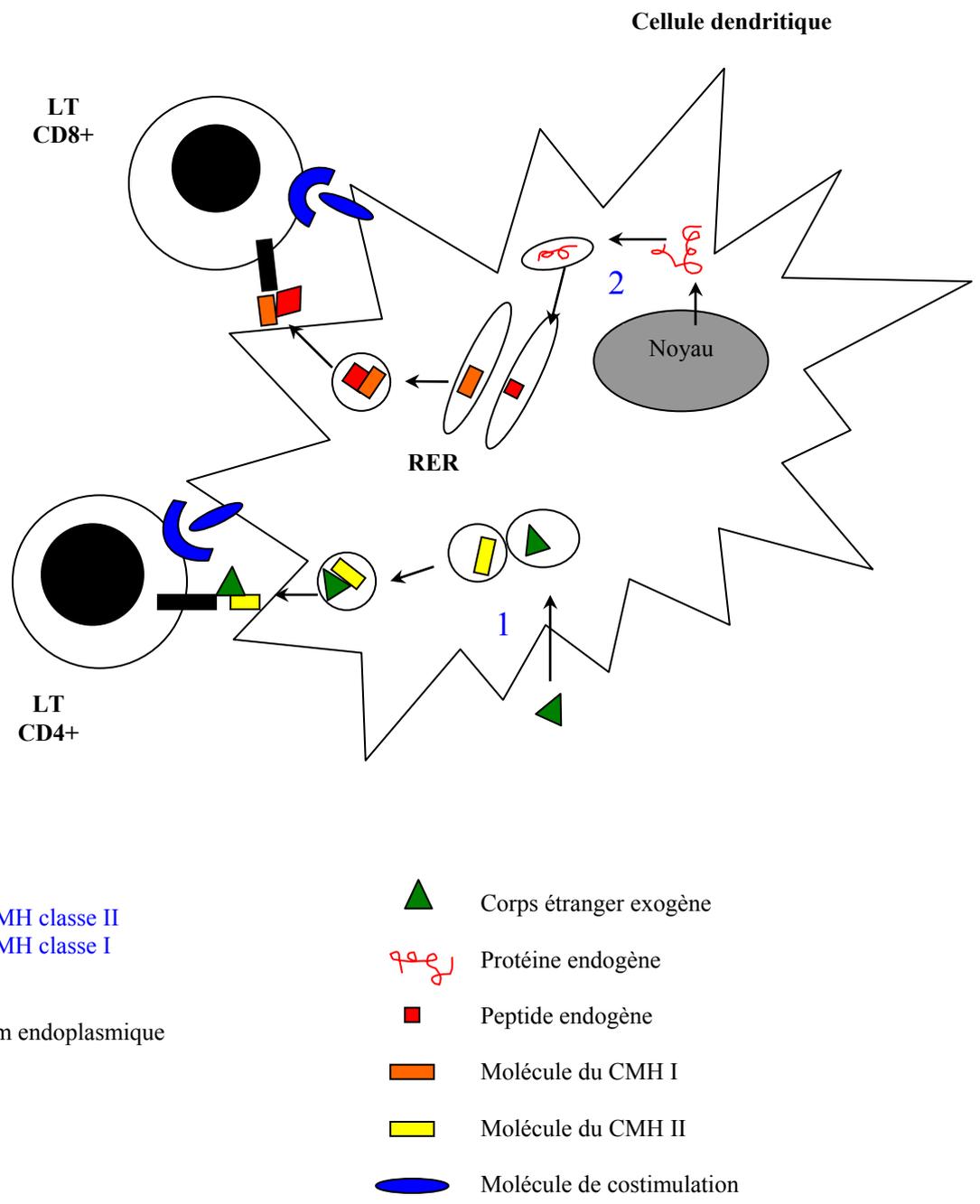
1.2.2 Voie du CMH de classe I

Les molécules du CMH de classe I sont des protéines de classe Ia (145) exprimées sur la grande majorité des cellules de l'organisme, formées d'une chaîne lourde polymorphique (codée par les loci HLA-A, B ou C chez l'Homme et H-2K, D ou L chez la souris) et d'une sous-unité invariable, la β 2-microglobuline.

Suite à l'association avec la calnexine dans le réticulum endoplasmique (146), la chaîne lourde et la β 2-microglobuline s'assemblent puis se lient avec un second chaperon, la calréticuline, responsable de l'association avec la taposine. Cette dernière protéine a pour fonction de faciliter l'association entre le complexe de classe I ainsi formé et le TAP (transporteur des peptides antigéniques) (147) (148). Les peptides (composés seulement de 8 à 10 acides aminés), transloqués du cytosol à travers la membrane du réticulum endoplasmique, se lient stablement à ces complexes de classe I grâce au TAP et sont ainsi transportés à travers l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique.

Contrairement aux molécules du CMH II, celles du CMH I ne peuvent pas se recycler à partir de la membrane cellulaire et ont donc une durée de vie similaire chez les CD_s matures et immatures avec une demi-vie de 16 heures. Elles doivent donc être synthétisées continuellement afin d'exposer les épitopes aux cellules T efficacement.

On peut signaler aussi que des expériences utilisant une lignée cellulaire dendritique CMH I⁺/CMH II⁻/CD80⁺ issue de la peau d'un fœtus de rat ont abouti à la conclusion qu'une immunité directe allogénique de CMH I peut survenir en l'absence d'expression du CMH II (149). Ce mécanisme intervient biologiquement lors de l'immunité requise dans le cas d'une transplantation ou dans le cas d'infections opportunistes survenant lors d'immunodéficiences congénitales, iatrogènes ou acquises.



- 1. voie du CMH classe II
- 2. voie du CMH classe I

RER réticulum endoplasmique rugueux

-  Corps étranger exogène
-  Protéine endogène
-  Peptide endogène
-  Molécule du CMH I
-  Molécule du CMH II
-  Molécule de costimulation

Schéma 4. Différentes voies de présentation de l'Ag aux cellules effectrices par les cellules dendritiques

1.2.3 Cas de la cross-présentation ou cross-priming

In vitro, une voie alternative semble permettre la présentation d'antigènes exogènes par le CMH de classe I (150) (151). Elle permet ainsi aux CD8 de stimuler aussi bien des réponses T CD8+ que CD4+ contre des Ags exogènes tels les cellules apoptotiques, les cellules nécrotiques, les cellules infectées par un virus ou les complexes immuns.

Quoiqu'il en soit, cette voie alternative n'est possible qu'avec de fortes doses d'Ag, semble plus efficace dans le cas de cellules apoptotiques et reste exceptionnelle *in vivo*.

1.2.4 Rôle des enzymes

Quand on parle d'Ag, on ne parle pas seulement de protéines mais aussi de larges particules comme des virus, des bactéries, des mycobactéries, des parasites ou des corps apoptotiques. Il est évident que leur apprêtement en peptide lié aux molécules du CMH nécessite l'action d'un nombre important d'enzymes.

Les publications à ce sujet sont encore rares mais plus précises en ce qui concerne la voie du CMH II.

En effet, le rôle d'une asparagyl-protéase, la cathepsine S, dans le clivage de la chaîne invariante DM en fraction CLIP (152) a été mis en évidence grâce à l'utilisation de souris knockout. L'étude de l'activité de cette enzyme a révélé une variation de celle-ci au cours de la maturation des CD8. Faible dans les CD8 immatures, son expression augmente lors de la maturation permettant l'acheminement des complexes peptide/CMH II vers la surface cellulaire (140).

On a longtemps cherché à expliquer cette différence d'expression au niveau transcriptionnel jusqu'à la découverte d'un inhibiteur spécifique de la cathepsine S, la cystatine C.

Ainsi, suite à la maturation des CD8, l'expression de la cystatine C diminue ce qui permet de révéler l'activité de la cathepsine S c'est-à-dire le clivage de la chaîne invariante DM indispensable pour le transport vers la surface cellulaire (140) (153).

D'autres cathepsines (B ou D) co-agissent avec la cathepsine S dans le clivage de cette chaîne invariante (154).

Dans le cas de la voie du CMH I, on sait que la plupart des peptides qui se lient aux molécules du CMH I sont générés par des protéasomes. Durant la maturation des CDs, des sous-unités de ces protéasomes LMP-2, LMP-7 et MELL-1 sont surexprimées donnant exclusivement des immuno-protéasomes (155) favorables à la production de peptides ayant des motifs permettant leur lien avec des molécules du CMH I.

Or, d'un autre côté, il a été montré que ces immuno-protéasomes sont incapables de produire un épitope à partir d'un Ag tumoral comme le peuvent les protéasomes standard (156).

En résumé, l'apprêtement puis la présentation de l'Ag par les CDs aux cellules T dépendent de **deux principales voies métaboliques intracellulaires**, celle du CMH II et celle du CMH I, qui permettent de transformer cet Ag, quelque soit sa forme initiale, en peptide et de le lier aux molécules du CMH, indispensables à la reconnaissance entre les deux types de cellules.

De nombreuses découvertes restent encore à venir pour éclaircir l'importance du rôle que jouent les enzymes lors de ces deux étapes, et peut-être aussi, pour expliquer les différences rencontrées entre les différentes CDs dans leur capacité à transformer cet Ag.

2. Maturation des cellules dendritiques

La maturation des CDs est l'ensemble des variations morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles qui, durant leur migration entre les tissus périphériques et les organes lymphoïdes secondaires, les transforme de cellules spécialisées dans la capture de l'Ag en cellules spécialisées dans sa présentation aux cellules T qui sont alors activées.

Cette maturation est induite dans les tissus périphériques par des composants des agents pathogènes tels les lipopolysaccharides bactériens ou par des cellules associées aux phénomènes inflammatoires, telles les mastocytes ou les macrophages, qui sécrètent des molécules inflammatoires telles IL-4, TNF- α , et CD40L (157).

D'autres signaux de maturation peuvent être apportés aux CD8 par des molécules issues des tissus endommagés ou par des produits microbiens à travers des récepteurs transmembranaires nommés récepteurs « Toll-like » situés soit sur la surface cellulaire soit dans les endosomes(158).

En ce qui concerne les stimuli inflammatoires, il semble qu'ils soient directement responsables d'une augmentation rapide de l'expression et de la durée de vie membranaires des molécules du CMH II (143) (159). En fait, cette augmentation est liée à la fois à une diminution de la dégradation et de l'endocytose de ces molécules, et surtout, à un effet inhibitoire sur le blocage du transport intracellulaire de l'Ag existant chez les CD8 immatures (160).

Parallèlement, lors de leur maturation, les CD8 perdent leur capacité à exprimer les récepteurs endocytosiques et phagocytosiques tels les récepteurs Fc.

De même, lors de la maturation, la migration des CD8 vers les organes lymphoïdes secondaires est facilitée par une baisse d'expression des récepteurs aux chimiokines inflammatoires locales (telles CCR, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1) (65) (161) (162) et par une expression fortement augmentée du récepteur CCR7, ligand pour les chimiokines chimio-attractives MIP-3 β et SLC des tissus lymphoïdes secondaires (163) (164).

Il en est de même pour l'expression de certaines molécules d'adhésion et de co-stimulation qui, augmentée lors de la maturation, permet d'optimiser les interactions entre les CD8 et les LT possédant leurs ligands spécifiques. C'est le cas par exemple des molécules d'adhésion CD58 et CD54 se liant respectivement à LFA-3 et ICAM-1 (157) ; des molécules de co-stimulation CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2), se liant à CD28 et formant un des signaux indispensables à l'activation des LT (165) (166) ; et des molécules accessoires CD83 et CD40.

Enfin, les CD8 matures sont capables de sécréter différentes chimiokines suivant leur localisation dans les tissus lymphoïdes secondaires. Ainsi, les CD8 des nœuds lymphatiques drainants sécrètent la chimiokine MDC (Macrophage-Derived Chimiokine) attractive seulement pour les cellules T activées (167), alors que celles du paracortex et du centre germinale sécrètent la chimiokine DC-CK1 attractive pour les cellules T naïves (168) (169).

Chez les CD8 matures, la sécrétion de la cytokine IL-12 est aussi fortement augmentée. Elle a un rôle primordial dans l'activation à la fois des réponses immunes innées (sur les cellules NK) et acquises (sur les cellules B et T) (170) (171).

Enfin, la maturation morphologique des CD8 se caractérise par le développement d'extensions cytoplasmiques d'où leur nom de cellules voilées adopté dans les vaisseaux lymphatiques afférents.

En résumé, ainsi transformées et équipées, situées dans les organes lymphoïdes secondaires, les CD8 **matures** sont des cellules spécialisées dans la stimulation du système immunitaire.

3. Rôle des cellules dendritiques dans les réactions immunes

3.1 Interactions entre les CD8 et les cellules T : tolérance ou immunité

Longtemps, le type de réponse immune activée par les CD8 face à un Ag donné a été strictement lié à leur classe.

Aujourd'hui, il est communément reconnu que la fonction des CD8 est plutôt régulée par leur environnement et leur stade de maturation.

Quoiqu'il en soit, l'interaction des CD8 avec les lymphocytes T aboutit à deux types de réponse : **la tolérance** ou **l'immunité**.

3.1.1 Interaction CD8/lymphocyte T et tolérance

Dans le phénomène de tolérance, les CD8 IMMATURES semblent impliquées sur deux niveaux :

1- dans la sélection précoce des lymphocytes T au niveau du thymus où elles auraient un rôle important dans la **sélection négative** des thymocytes avec une délétion clonale de ceux autoréactifs ou une anergie (172) ;

2- dans le phénomène de **tolérance périphérique** sous dépendance ou non de différents facteurs environnementaux (173) (174) (175) (176). En effet, les CD8 immatures peuvent être rendues tolérogéniques par des cellules T régulatrices CD8⁺ CD28⁻ (177), CD28 étant, comme nous l'avons vu précédemment, le ligand des molécules de co-stimulation B7-1 et B7-2 exprimées sur les CD8 et indispensables à l'activation des cellules T lors de l'interaction CD8/LT. Ce contact « incomplet » entraîne chez les CD8 une diminution de l'expression de CD40, B7-1 et B7-2 (178).

De plus, la diminution du facteur de transcription RelB ou de la molécule CD40 par les CD8 les rend aussi tolérogéniques et est alors à l'origine de la formation de cellules T régulatrices sécrétant IL-10 (179).

D'ailleurs l'interleukine IL-10, tout comme TGF- β , deux facteurs produits entre autres par les cellules tumorales, bloquent l'expression des molécules B7 (180).

Enfin, chez *l'Homme*, une classe de CD dérivées des monocytes et exprimant la 2,3-dioxygénase indoléamine (IDO) a été décrite. Cette molécule est produite lors de l'interaction des molécules B7 avec le récepteur CTLA-4. Elle est responsable de l'inhibition de la prolifération des cellules T et de leur mort cellulaire (181) (182).

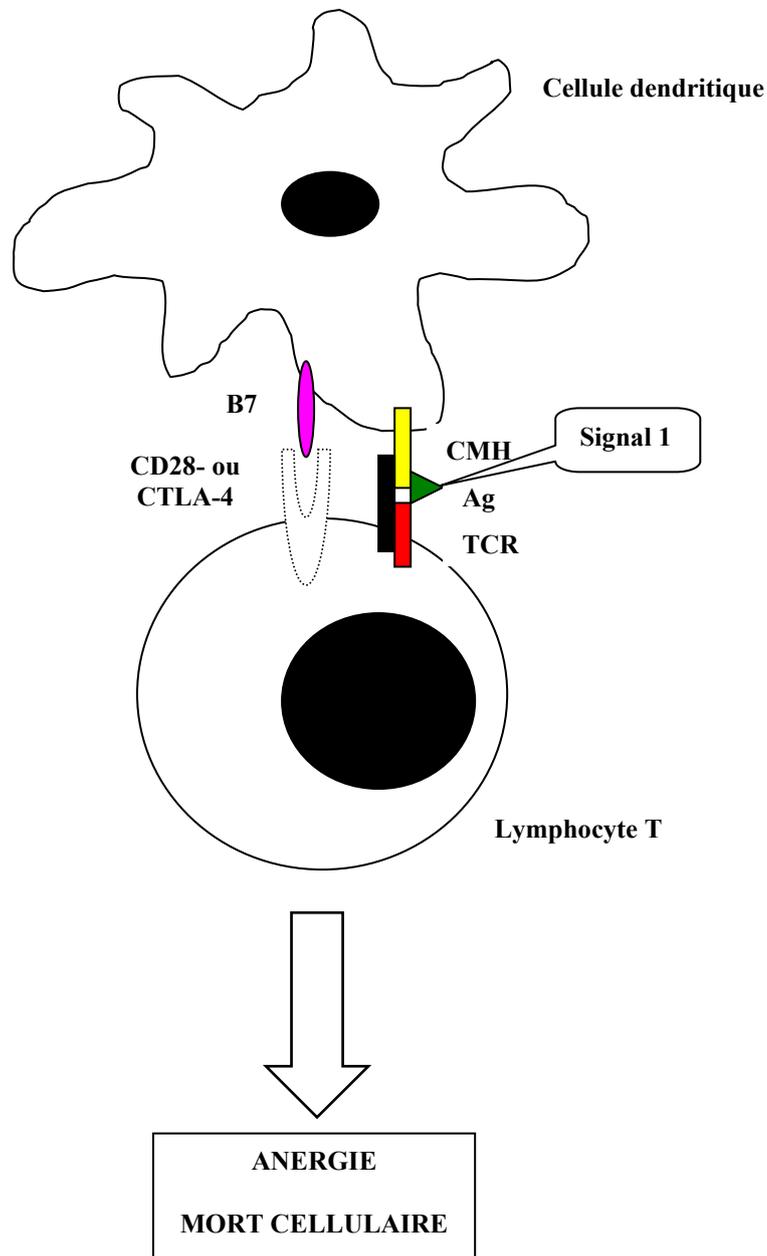


Schéma 5. Interaction cellule dendritique/lymphocyte T : absence du second signal.

3.1.2 Interaction CD/lymphocyte T et immunité

3.1.2.1 Principes généraux

Nous avons vu précédemment que, grâce à leur grande efficacité dans la capture, la transformation puis la présentation de l'Ag, les CDs sont reconnues comme **les meilleures CPAgs**.

Grâce à cette supériorité, mais aussi à leur position stratégique dans les organes lymphoïdes secondaires après migration des tissus périphériques, elles sont les plus aptes à initier les réponses immunes à cellules T.

L'interaction étroite entre les LT et les CDs dans ces tissus lymphoïdes secondaires a été mise en évidence grâce à l'utilisation de CDs cultivées avec un Ag protéique marqué au fluorochrome, l'ovabulmine, et des cellules T possédant son récepteur spécifique (183).

L'initiation d'une réponse immune lors de cette interaction a été démontrée par l'activation d'une expansion clonale des cellules T spécifiques avec un pic à 96 heures malgré l'absence de CDs après 48 heures.

La capacité des CDs à stimuler les LT a été observée, dans un premier temps, dans les réactions lymphocytaires mixtes (MLR) (184).

De plus, des expériences comparatives avec les lymphocytes B ont montré qu'elles sont les plus performantes dans ce domaine surtout en ce qui concerne la stimulation des LT naïfs (110).

Enfin, il a été observé que le type et la force de réponse immune obtenue après interaction entre CDs et LT varient suivant de nombreux facteurs comme le ratio entre ces deux cellules, leur environnement immédiat (action de cytokines et de chimiokines) et le stade de maturation des CDs impliquées. Dans ce sens, si les CDs ont la capacité d'initier les réponses immunes primaires, elles ont aussi celle de **moduler le type de réponse immune**.

3.1.2.2 Mécanismes moléculaires responsables de la modulation de la réponse immune

L'activation des cellules T par les CD nécessite deux signaux distincts :

- un *premier signal* délivré par l'interaction entre le complexe CMH/peptide et le récepteur des cellules T (TCR)
 - un *second signal* délivré par l'interaction entre les molécules de co-stimulation B7-1 et B7-2 des CD et leur récepteur CD28 sur les cellules T (185).
- Il est à signaler à nouveau, qu'en l'absence de ce second signal, les cellules T naïves sont anergisées.

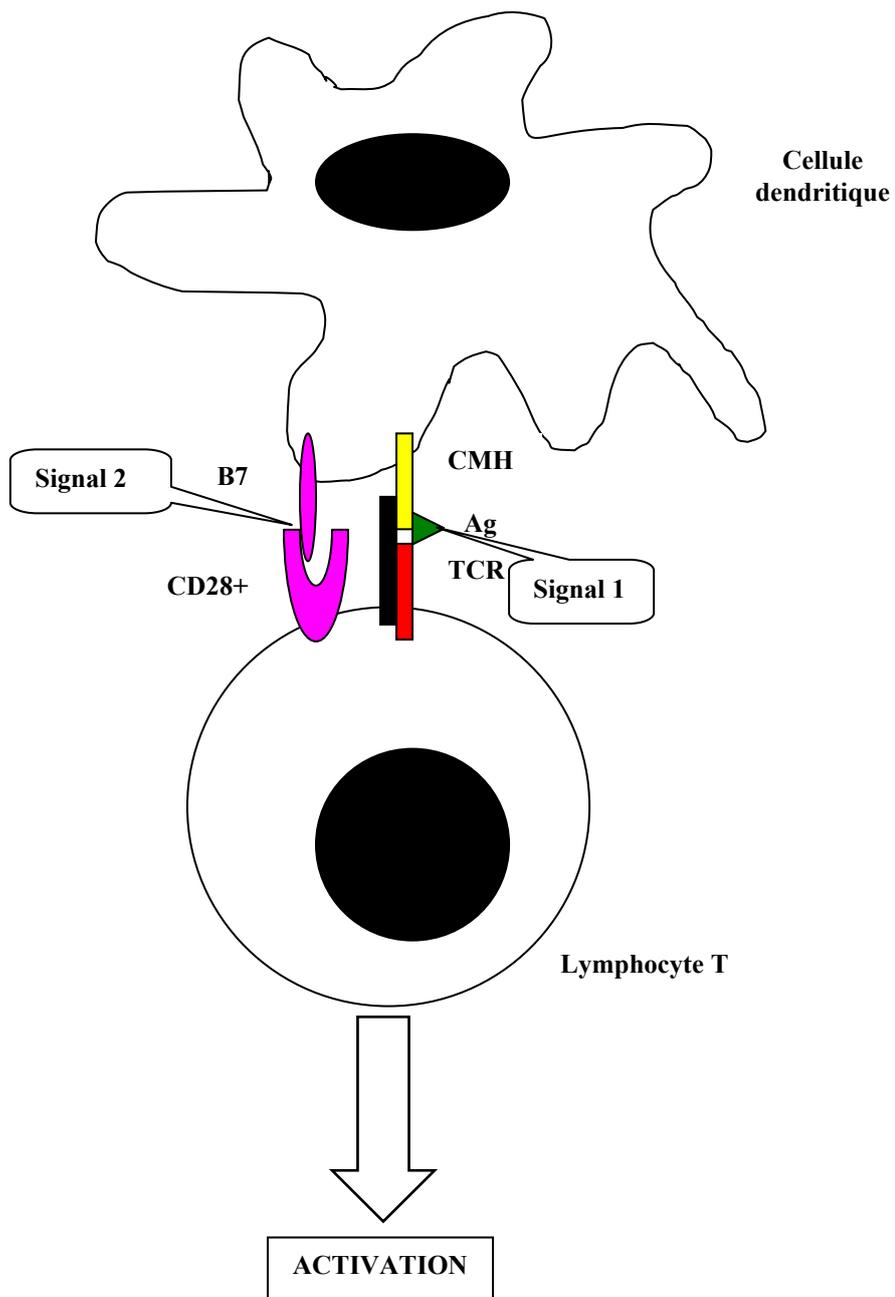


Schéma 6. Interaction cellule dendritique/lymphocyte T : présence du second signal.

Pour les cellules T CD4+, l'activation se fait grâce à la reconnaissance entre de longs peptides présentés par les molécules du CMH II et le récepteur TCR spécifique des LT, l'existence du second signal mais aussi la présence de molécules d'adhésion telles ICAM-1.

Une fois les LT CD4+ naïves activées, elles vont à leur tour activer les CD8 grâce à l'interaction entre leur ligand CD40L et le récepteur CD40 sur les CD8 (même effet entre TRANCE et son récepteur RANK) (186) (187) (188) et vont sécréter de nombreuses cytokines. Les CD8 ainsi activées vont surexprimer les molécules du CMH et celles de co-stimulation et augmenter aussi leur production de cytokines (189) (190) (191).

Les cytokines sécrétées par ces cellules sont soit *stimulatrices de type Th1* telles IFN- γ , IL-2, TNF- α (et IL-12 pour les CD8) (192) soit *inhibitrices de type Th2* telles IL-4, IL-5, IL-10 et TGF- β .

Les premières créent un environnement favorable à l'activation des cellules T CD8+ naïves et donc à la génération d'une réponse immune cytotoxique.

Les secondes, avec un effet inhibitoire, vont favoriser la formation d'une immunotolérance. Elles sont aussi responsables de l'activation des réponses humorales (193).

Il semble que l'interactivation existant entre les deux types de cellule soit sous le contrôle d'un double mécanisme de rétrocontrôle négatif.

En effet, une fois les cellules T activées, elles surexpriment sur leur surface cellulaire l'Ag 4 lymphocyte T cytotoxique (CTLA-4) qui joue le rôle de compétiteur inhibiteur du récepteur CD28 pour les molécules B7 (194).

De plus, elles vont aussi alors surexprimer le ligand Fas pro-apoptotique les rendant capables d'induire la mort des cellules portant le récepteur Fas spécifique et avec lesquelles elles vont se lier. Ces deux mécanismes permettent avant tout d'éviter une sur-stimulation de l'immunité (195).

En ce qui concerne les cellules T CD8+, appelées cellules T cytotoxiques (CTLs), elles sont capables de reconnaître de petits peptides associés aux molécules du CMH I sur la membrane cellulaire des CD8.

Si l'activation des LT CD8+ naïfs nécessite forcément la présence des 2 signaux précédents, les cellules T CD8+ activées reconnaissant seulement le premier signal peuvent mettre en route leur mécanisme de mort cellulaire.

Il repose sur la mise en activité par les CTLs d'un côté de la perforine capable de s'insérer dans la membrane de la cellule cible et d'y former un pore, et de l'autre, de la granzyme B qui, après avoir pénétré dans la cellule cible à travers la perforine, va activer la cascade caspase (série de protéases sérine intracellulaires) responsable de la mort par apoptose de cette cellule.

Comme pour les LT CD4+, l'activité des LT cytotoxiques est régulée par deux mécanismes.

Le premier est lié à l'absence de cytokines stimulatrices qui entraîne la mort des cellules T CD8+ activées (196).

Le second est lié à l'intensité de l'interaction avec l'Ag spécifique. En effet, si une trop grande quantité d'Ag est reconnue répétitivement, les cellules T CD8+ activées vont surexprimer à la fois le récepteur Fas et son ligand provoquant une mort cellulaire soit par fratricide soit par apoptose (195).

En résumé, grâce à l'expression à leur surface cellulaire des molécules du CMH, de diverses molécules d'adhésion et de co-stimulation ainsi qu'à leur capacité à sécréter de nombreuses cytokines, les CD sont à l'origine à la fois de l'induction des réponses immunes primaires à cellules T et de leur modulation.

3.2 Interactions entre les CD et les autres cellules de l'immunité

Même si cette interaction semble ne pas nécessiter de contact étroit entre les cellules, il est certain aujourd'hui que les CD ont une influence sur l'activation des cellules B et des cellules NK.

En ce qui concerne les **cellules B**, à l'origine des réponses immunes humorales, les CD myéloïdes sont capables d'induire directement leur prolifération, le choix de l'immunoglobuline, et leur différenciation en plasmocytes (197) (198).

Ceci est possible grâce à la production par les CD de molécules d'activation et de survie des cellules B, le BAFF (B-cell Activating Factor) (199) (200) et le APRIL (ligand induisant leur prolifération) (201).

De même, les CD plasmacytoïdes activées peuvent induire la différenciation des cellules B CD40-activées en plasmocytes grâce à la sécrétion de IFN α/β et de IL-6 (202).

Les **cellules NK** (NK et NKT), quant à elles, appartiennent au système immunitaire inné et peuvent être activées par les CD et produire alors des cytokines de type Th1 ou Th2 (203) (204).

En résumé, les connaissances acquises sur les CD4, depuis leur découverte en 1868 et concernant leur origine, leur phénotype et leur physiologie, ont permis de comprendre **leur rôle essentiel dans le système de défense du corps humain**, mais plus encore, d'en faire des outils thérapeutiques de l'immunothérapie anticancéreuse.

DEUXIEME PARTIE : LES
CELLULES DENDRITIQUES EN
IMMUNOTHERAPIE
ANTICANCEREUSE

I. Rôle des cellules dendritiques dans l'immunité anticancéreuse - Mise en place d'une immunothérapie

1. Notions d'immunocancérologie

Une cellule normale lors de son altération en cellule cancéreuse acquiert des capacités prolifératives et une membrane plasmique modifiée. En effet, la cellule cancéreuse se caractérise par la présence de motifs antigéniques nouveaux, les **néoantigènes**, faisant d'elle une cellule du non-soi.

Chez le sujet normal, le système immunitaire, en particulier le système thymo-dépendant, reconnaît et détruit les cellules cancéreuses au fur et à mesure de leur apparition (concept de l'**immunosurveillance** datant des années 1950s) (205) (206). Ainsi, le développement d'une tumeur cancéreuse serait la conséquence d'une défaillance de ce système (phénomène d'**échappement**).

La preuve du rôle du système immunitaire dans l'éradication des cellules cancéreuses a été établie lors, entre autres, du traitement de **souris** porteuses d'un sarcome, par le sérum anti-lymphocytaire à l'origine d'une augmentation de la fréquence des métastases de 3 à 98%. Chez l'**Homme**, des arguments cliniques sont venus appuyer les expériences animales avec la constatation d'un nombre plus important de cancers spontanés chez les malades souffrant d'un déficit congénital de l'immunité à médiation cellulaire que chez les sujets normaux. De même, l'observation de quelques rémissions spontanées lors de mélanomes et de carcinomes rénaux (207) (208) a mis en évidence la capacité du système immunitaire à combattre les tumeurs.

Le résultat de l'affrontement du système immunitaire avec une cellule cancéreuse résulte en fait d'un phénomène de balance entre des réactions défavorables au cancer appelées **cytotoxiques** et d'autres favorables dites **cytopromouvantes**.

Dans les réactions *cytotoxiques*, on distingue celles à **médiation cellulaire** de celles à **médiation humorale**.

Dans le premier cas, on trouve des cellules comme le LT cytotoxique qui, après stimulation par une CPAg, est capable d'un contact direct avec une cellule cible spécifique qui sera tuée par cytolysse (phénomène actif faisant intervenir le glucose et le Ca_2^+). On trouve aussi les cellules NK (Natural Killer), mononucléées, appartenant au système immunitaire inné, spontanément cytotoxiques, et dont l'action est indépendante de la présence d'Ac. Enfin, les macrophages jouent aussi un rôle dans la cytotoxicité anticancéreuse soit indirectement par phagocytose des néoantigènes puis stimulation des autres populations cellulaires (telles les cellules T CD4+ helpers sécrétant alors les cytokines IL-2 et IFN- α) soit directement par phagocytose des cellules cancéreuses reconnues spécifiquement après stimulation par des lymphokines.

Dans le deuxième cas, ce sont les immunoglobulines (Igs) sécrétées par un LB transformé après stimulation en plasmocyte. Elles tiennent le rôle d'Acs facilitants (permettant par exemple d'améliorer le contact entre la cellule cancéreuse et la cellule T), d'Acs armants ou cytophiles et d'Acs cytotoxiques en présence du complément.

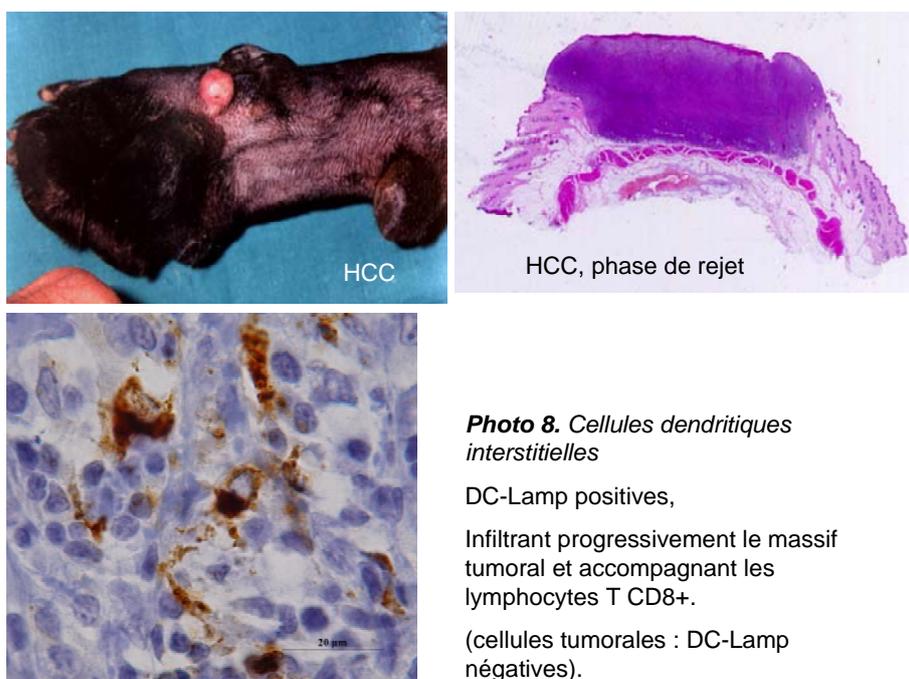
Dans les réactions *cytopromouvantes*, on trouve l'ensemble des variations cellulaires, moléculaires et biochimiques survenant lors du développement de cellules tumorales dans l'organisme, et qui affecte, plus ou moins directement, l'immunité cellulaire cytotoxique innée (cellules NK et NKT) et acquise (cellules T CD8+ cytotoxiques).

La découverte de l'existence d'un véritable système de défense anticancéreux dans l'organisme puis son étude détaillée a permis d'envisager depuis peu l'utilisation du système immunitaire et de ses protagonistes en thérapie anticancéreuse. Etant particulièrement intéressés par le rôle des CD dans cette thérapeutique, il semble intéressant maintenant de détailler leur place et leur fonction dans l'immunité anticancéreuse.

2. Cellule dendritique et immunité anticancéreuse

On a vu précédemment que les cellules T cytotoxiques sont capables de reconnaître les complexes CMH de classe I/néoantigène sur la membrane de la cellule tumorale et ainsi, de la cytolysse. Pour cela, il a fallu que cette cellule T soit stimulée par une CPAg qui, en premier lieu sur le site tumoral, a capturé un néoantigène, l'a apprêté puis a migré vers les organes lymphoïdes secondaires pour le présenter aux LT.

Or, de nombreuses analyses immunohistologiques réalisées entre les années 80 et 90 ont démontré le lien entre un nombre plus important de CD localisées au niveau des tumeurs et un meilleur pronostic. Cela a été décrit pour l'adénocarcinome colorectal (209), celui des poumons (210), les carcinomes papillaires de la thyroïde (211), de l'estomac (212) entre autres.



En fait, les CD, comme les macrophages et les LB, expriment à leur surface à la fois les molécules du CMH I et du CMH II et la reconnaissance des Ags tumoraux se fait soit par le lien avec le CMH I soit par celui avec le CMH II.

Dans le premier cas, ce sont les LT CD8+ cytotoxiques qui vont être activés et entraîner une lyse de la cellule tumorale soit par apoptose soit par activation du système perforine.

Dans le deuxième cas, ce sont les LT CD4+ « helpers » qui vont être activés et entraîner surtout une augmentation des propriétés tumoricides des macrophages et des LT CD8+ grâce à la sécrétion de cytokines telles IL-2 et IFN- γ .

Ainsi, comme dans un cas classique d'immunité antibactérienne avec présence dans l'organisme d'un élément du non-soi, les CD vont au sein d'une immunité anticancéreuse jouer le rôle de CPAg permettant l'initiation d'une réponse immune à médiation cellulaire cytotoxique.

Pourtant, ce système de défense montre souvent **des défaillances** entraînant une croissance des tumeurs cancéreuses. On parle alors de la capacité des tumeurs à échapper au système immunitaire.

Les **mécanismes d'échappement** sont multiples, et nombreux sont ceux qui affectent directement les CD4 à différents niveaux de leur fonctionnement (213) (214).

Dans *un premier temps*, les cellules tumorales peuvent tout simplement être **ignorées** par le système immunitaire soit à cause d'un problème d'acheminement des CD4 vers le site tumoral, soit à cause d'un problème de reconnaissance antigénique de ces cellules par les CD4.

Dans le premier cas, certaines tumeurs peuvent être strictement inaccessibles par les CD4 (cas des tumeurs du système nerveux central par exemple), ou elles peuvent être responsables de l'absence locale de substances chimio-attractives (215).

Dans le deuxième cas, l'incapacité des CPAgs à reconnaître une cellule tumorale peut survenir lorsque celle-ci semble dépourvue de néoantigènes, soit parce qu'ils sont présents en très faible quantité, soit parce que leur position endogène les rend inaccessibles.

De plus, de nombreuses tumeurs, surtout celles d'origine épithéliale, expriment peu ou pas les molécules du CMH I (216) (217) (218) (219).

Dans *un deuxième temps*, les cellules tumorales sont à l'origine de la sécrétion de protéines inhibitoires telles IL-10 (220) (221) (222) (223) (224), VEGF (Vascular Endothelial cell growth Factor) (225), et TGF- β (226) (227), qui affectent directement la production des cytokines pro-inflammatoires responsables de la maturation des CD4.

En effet, lors de carcinomes des cellules basales, il apparaît que seulement 1 à 2% des CPAgs intra-tumorales et 5 à 10% de celles péri-tumorales expriment les marqueurs de maturité CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) (228), et en plus, toutes présentent aussi une faible expression du marqueur CD40 (229).

Or, comme nous l'avons vu précédemment, les molécules de la famille B7 représentent les molécules de co-stimulation du second signal indispensable à l'activation et la prolifération des cellules T naïves et dont l'absence entraîne une anergie du système cellulaire T ainsi qu'une cascade de mécanismes de rétrocontrôle négatif touchant tout le système immunitaire (production des cellules T régulatrices sécrétant IL-10 et TGF- β et capables de supprimer les cellules T CD4+ et CD8+) (230).

Il y a donc au final, non pas un phénomène d'ignorance des cellules tumorales, mais un phénomène de **tolérance** du système immunitaire vis-à-vis de ces cellules.

En résumé, il semble clair que, comme dans l'immunité anti-infectieuse, les CD4 jouent un **rôle primordial** dans l'immunité anticancéreuse.

Elles sont donc vite apparues comme des **outils potentiels** de la thérapeutique anticancéreuse malgré la capacité de nombreuses tumeurs à échapper à leur contrôle par altération de leur fonctionnement.

L'objectif de l'immunothérapie anticancéreuse est donc, dans ce contexte, d'**optimiser l'action** de ces CD afin qu'elles soient aptes à surmonter ces effets inhibitoires et à promouvoir une immunité anticancéreuse spécifique efficace avec pour effet clinique une stabilisation ou une régression de la croissance tumorale, voire même, pourquoi pas, une rémission totale.

II. Techniques de l'immunothérapie anticancéreuse utilisant les CD

Les premières expériences d'immunothérapie anticancéreuse utilisant les CD sont nées de la volonté de certaines équipes d'améliorer les défenses immunes de patients souffrant de cancers ou de maladies infectieuses.

Connaissant le rôle clé de ces CD dans l'initiation des réponses immunes anticancéreuses en tant que meilleures CPAgs, mais aussi leurs faiblesses fonctionnelles face à un processus tumoral prolifératif, les chercheurs ont essayé d'optimiser leur fonctionnement.

Les techniques utilisées dans ce sens sont nombreuses et concernent aussi bien des manipulations *in vitro* suivies d'une ré-injection de ces cellules que des stimulations *in vivo* grâce à l'utilisation de substances telles les cytokines.

Dans le premier cas, il a d'abord fallu résoudre le problème de **la source** des CD utilisées puis élaborer des protocoles à la fois les plus efficaces, les plus stables et les moins toxiques possibles, afin de **potentialiser** ces cellules.

1. Les différentes sources de CD utilisées en immunothérapie anticancéreuse

Du fait de la **restriction allogénique** entre les CPAgs et les cellules T, la ré-injection de CD chez l'Homme nécessite l'utilisation de cellules **autologues**.

Trois sources de CD^s ont été utilisées au cours de ces 20 dernières années :

- les CD^s issus du sang périphérique et leurs précurseurs
- les monocytes sanguins CD14⁺
- les cellules CD34⁺ de la moelle osseuse.

1.1 Utilisation des CD^s du sang périphérique et de leurs précurseurs

Dans le cas du sang périphérique, la purification des précurseurs des CD^s a été réalisée grâce à des techniques basées **sur la densité des cellules**.

En effet, après une période de culture et de maturation *in vitro*, les précurseurs des CD^s deviennent plus larges et moins denses. Ainsi, des gradients de solution ont été utilisés pour isoler ces cellules dès 1996, lors des premières immunisations contre le cancer de la prostate, avec le PERCOLL. On peut aussi citer le NYCODENZ et le métrizamide.

Malgré l'existence aujourd'hui de préparations commerciales simplifiées, la faible fréquence des précurseurs de CD^s dans le sang (environ 1% des cellules mononuclées du sang périphérique) limite l'utilisation de ce procédé.

En effet, on sait que 10^5 CD^s sont nécessaires par inoculation pour immuniser et que, chez des individus normaux, les CD^s sanguines se comptent à $10 \cdot 10^6$ /L.

Il a donc fallu trouver des techniques complémentaires afin d'obtenir ce nombre de CD^s minimum mais efficace.

Une *première* consiste en une concentration des CD^s par **leucophorèse** (231). Les essais cliniques utilisant cette technique ont été nombreux dans les années 90s dans le cas de lymphomes malins à cellules B (232), de myélomes multiples (233) ou de cancers de la prostate (234) avec des résultats encourageants.

Une *deuxième* consiste à favoriser en premier une prolifération *in vivo* de ces CD^s sanguines en utilisant un facteur de croissance hématopoïétique, le **ligand Flt3** (Flt3-L) (235). C'est le ligand pour le récepteur de la tyrosine kinase flt3 présent surtout sur les cellules souches hématopoïétiques et les progéniteurs (236). Il a pour effet l'expansion des populations de CD^s lymphoïdes et myéloïdes dans les tissus.

Ainsi, l'utilisation du Flt3-L chez **un modèle murin** atteint d'un fibrosarcome permet une prolifération des CD^s *in vivo* et une éradication de la tumeur (237). Des résultats similaires ont été obtenus aussi dans le cas de mélanome et de lymphome murins (238).

Plus récemment, l'administration de ce ligand, produit par une technique d'ADN recombinant, pendant 14 jours consécutifs à **des volontaires humains** en bonne santé, provoque une augmentation des CD^s CD11c⁺ d'environ 44 à 48 fois et des CD^s CD11c⁻ d'environ 12 fois (239).

Grâce à ces techniques de concentration et de prolifération des CD_s circulantes sanguines, le sang périphérique apparaît comme une source très intéressante de CD_s car :

- il permet d'obtenir des préparations assez homogènes (240),
- avec des CD_s sanguines obtenues à un stade de différenciation défini
- et capables de capturer et transformer l'Ag après seulement une courte période de culture dont le temps optimal a été établi (241).
- Enfin, ces CD_s ont aussi la capacité de répondre à un stimulus physiologique, telle une exposition au ligand CD40 (CD40L) par exemple, leur procurant ainsi un phénotype optimal de cellules stimulatrices (242).

En résumé, malgré les techniques de prolifération et les avantages phénotypiques et fonctionnels de ces CD_s sanguines issues du sang périphérique, l'obstacle que représente leur faible nombre a poussé les équipes de chercheurs à trouver de nouvelles sources de CD_s plus accessibles et plus rentables, les cellules CD34⁺ de la moelle osseuse et les monocytes sanguins CD14⁺.

1.2 Utilisation des cellules CD34⁺ de la moelle osseuse

Les cellules souches CD34⁺ ont été isolées de la moelle osseuse dès 1992 (243). Puis, on les a aussi mises en évidence dans le sang périphérique en 1995 (244).

L'obtention de CD_s se fait grâce à la mise en culture de ces cellules CD34⁺ avec du GM-CSF et du TNF- α soit seuls sur une courte période, soit avec une combinaison de facteurs de croissance (SCF/Flt3-L, IL-3, GM-CSF et IL-4) sur une longue période (245).

Le problème d'une telle méthode de génération est que la population cellulaire obtenue est **hétérogène** avec un pourcentage d'environ 10% de CDs au phénotype incertain.

De plus, il n'est pas encore clairement établi si les cellules dites « contaminantes » de ces préparations ont un effet négatif ou positif sur l'efficacité de la vaccination.

Cette source de CDs a été aussi utilisée récemment chez d'autres espèces que l'Homme.

Chez *la souris*, de nombreuses expériences d'immunothérapie concernant des sarcomes, des fibrosarcomes, des mélanomes ou des carcinomes ont mis en évidence la possibilité d'obtenir en grande quantité des CDs fonctionnellement efficaces à partir de cellules de la moelle osseuse (246) (247) mises en culture avec, soit du GM-CSF et de l'IL-4, soit avec d'autres cytokines telles TNF- α et le ligand Flt3 (248).

Chez *des porcs* âgés de 3 à 6 mois, des CDs ont été obtenues à partir de cellules hématopoïétiques souches isolées de moelle osseuse de sternum et mises en culture avec du GM-CSF et du TNF- α pendant 10 jours. Ces CDs dérivées présentaient une capacité stimulatrice des cellules T importante (249).

Chez *le hamster*, dans le cadre d'une immunothérapie contre le cancer du pancréas, une activité cytotoxique à cellules T spécifique a été obtenue *in vivo* grâce à l'utilisation de CDs issues de la mise en culture pendant 7 jours de cellules souches de la moelle osseuse avec du GM-CSF et de l'IL-4 (250).

Enfin, chez *le chien*, la génération d'un nombre suffisant de CDs à partir de précurseurs sanguins (251) a vite été limitée par la faible quantité de sang circulant par rapport aux humains.

Encouragée aussi par le succès des expériences d'immunothérapie anticancéreuse réalisées chez les souris par de nombreuses équipes et utilisant les cellules souches CD34+ de la moelle osseuse, une équipe de chercheurs a très récemment réussi cette expérience chez le chien.

Ils ont utilisé pour cela un prélèvement de 0.5 ml de moelle osseuse issue du fémur et de l'ilium qu'ils ont ensuite centrifugée pour isoler les cellules mononuclées par gradient de densité.

Les cellules ainsi obtenues ont été mises en culture pendant 10 jours avec du GM-CSF recombinant félin et de l'IL-4 canin avec l'obtention au final d'environ $1,6 \text{ à } 9,2 \cdot 10^6$ cellules dendritiques (morphologie, expression des marqueurs de surface CMH II, CD11c, B7-1 et B7-2, phagocytose, activation des cellules T allogéniques) (252).

La nouveauté est l'utilisation de cytokines animales au lieu de cytokines humaines.

En effet, une première expérience d'expansion des CDs canines à partir des cellules CD34+ de la moelle osseuse, réalisée par l'équipe de HAGGLUND en 2000 (253), a montré que l'utilisation de GM-CSF, TNF- α et IL-4 humains dans le milieu de culture ne permettait pas l'obtention de CDs fonctionnelles, c'est-à-dire matures.

Plus tard, une autre équipe a réussi une immunisation chez des chiens porteurs de mélanomes malins grâce à l'utilisation de CDs canines obtenues après culture de ces cellules souches CD34+ avec des cytokines humaines recombinantes (GM-CSF, TNF- α , SCF, et Flt3-L) (254).

Il semble donc que seule la cytokine humaine IL-4 ne soit pas réactive avec les cellules canines.

En résumé, malgré la richesse quantitative de cette source de CD8, la majeure partie des essais cliniques utilise aujourd'hui les monocytes sanguins.

1.3 Utilisation des monocytes sanguins

Les monocytes sanguins ont été utilisés comme source de CD8 dès 1992 chez *la souris* (255). Ils sont isolés et purifiés à partir de sang périphérique puis mis en culture avec du GM-CSF et de l'IL-4 pendant 7 jours.

Mais la distinction entre les CD8 matures et immatures reste difficile du fait du faible nombre d'anticorps anti-marqueurs de maturité existant pour l'instant.

Il semble tout de même que les CD8 murines obtenues par culture de monocytes CD14+ murins avec du GM-CSF et de l'IL-4 soient plus matures que celles obtenues avec du GM-CSF seul (256).

Cette même technique a été utilisée en même temps chez *l'Homme* (257) puis confirmée avec succès au niveau clinique en 1996 par l'équipe de ROMANI (258).

L'étude morphologique et phénotypique des CD8 obtenues a montré des cellules voilées caractéristiques mais avec un phénotype immature (absence par exemple des marqueurs CD83 et B7-1 et présence de CD1a et DC-SIGN).

De plus, les CD8 issues des monocytes sanguins après culture avec du GM-CSF et IL-4 ont tendance à redonner des monocytes en l'absence de facteurs de maturation (259), ce qui représente un inconvénient majeur pour leur utilisation dans les essais cliniques d'immunisation nécessitant des CD8 au phénotype stable et mature, capables d'initier des réactions immunes à cellules T.

Plus récemment, plusieurs équipes ont adopté cette technique de génération de CD8 à *l'espèce porcine*.

L'étude morphologique et phénotypique des cellules obtenues ainsi a montré la présence de dendrites caractéristiques ainsi que de marqueurs comme CD14+ compatibles avec un phénotype immature.

L'expression constante du marqueur CD14+ (même après addition de facteur de maturation) est la seule différence notable avec ce qui se passe chez l'Homme (249) (260).

Chez *le chien*, certaines équipes considèrent que la faible quantité de sang pouvant être prélevée est suffisante pour réaliser des analyses fonctionnelles sur les CD canines mais est encore trop faible pour des applications thérapeutiques.

Malgré cela, dès 2002, l'équipe de CATCHPOLE a réussi à générer avec succès des CD canines à partir de monocytes isolés de 20 ml de sang et mis en culture pendant 7 jours avec du GM-CSF et de l'IL-4 canins recombinants (251).

De même, cette technique a été confirmée tout récemment en 2005 par l'équipe de IBISCH (261).

Si la génération de ces CD canines à partir de monocytes sanguins semble aujourd'hui possible, des études à venir seront nécessaires pour savoir si les préparations cellulaires obtenues sont suffisantes pour des tests d'immunisation et capables de stimuler efficacement une immunité anticancéreuse spécifique.

Chez *le chat*, les études effectuées à ce jour sont très peu nombreuses et l'intérêt porté aux CD félines est d'abord né de l'étude du FIV (Feline Immunodeficiency Virus) comme modèle pour le HIV (Human Immunodeficiency Virus).

Une méthode précise de production de CD félines à partir de monocytes sanguins CD14+ a été établie par l'équipe de FREER G. en 2005 (262). Les cellules CD14+ ont été isolées à partir de prélèvements de 35 ml de sang veineux, puis ont été mises en culture avec du GM-CSF et de l'IL-4 félines recombinants pendant 5 jours au minimum.

Malgré la difficulté à caractériser phénotypiquement les cellules obtenues (pas de détection possible des marqueurs félines avec les anticorps humains anti-CD83 et anti-DC-SIGN), leur morphologie est typique de celle des CD.

Enfin, la maturation de ces CD félines a été réalisée le plus efficacement avec des LPS.

Les facteurs TNF- α et IFN- γ humains semblent n'avoir aucun effet sur les CD félines.

En résumé, malgré la diversité des sources potentielles de CD et l'existence de protocoles de génération parfaitement établis chez l'Homme et la souris, les monocytes sanguins CD14+ représentent **la source de CD la plus utilisée** dans les essais cliniques d'immunothérapie anticancéreuse.

Chez *les espèces féline et canine*, le large volume sanguin nécessaire pour utiliser efficacement cette source reste encore un obstacle sérieux. De plus, même si des protocoles précis ont été décrits chez ces espèces, l'efficacité en tant que cellules immuno-stimulatrices des CD obtenues n'a pas encore été réellement testée.

Enfin, on a vu précédemment que, chez *l'Homme*, la simple culture des monocytes sanguins dans un milieu contenant du GM-CSF et de l'IL-4 ne permet pas d'obtenir des CD capables d'initier des réponses immunes à cellules T car ce sont des CD **immatures** au phénotype instable.

2. Importance d'une maturation des CD8

Dans les essais cliniques d'immunothérapie, l'utilisation de CD8 **MATURES** est indispensable pour l'obtention d'une réponse immune à cellules T spécifique et efficace.

En effet, l'étude physiologique des CD8 *in vivo* a permis de nous faire comprendre que leur maturation, survenant au cours de leur migration entre les tissus périphériques et les organes lymphoïdes secondaires, leur permet de passer de cellules spécialisées dans la capture de l'Ag en cellules présentatrices de l'Ag et activatrices des lymphocytes T.

Cette transformation se fait surtout grâce à la surexpression :

- de récepteurs tissulaires augmentant leur capacité migratoire vers les organes lymphoïdes secondaires,
- des molécules du CMH de classe I et de classe II augmentant leur capacité de présentation de l'Ag,
- de molécules de co-stimulation indispensables à l'activation des lymphocytes T.

Il est aussi à noter que les CD8 matures montrent une certaine résistance aux effets inhibiteurs de l'interleukine IL-10.

Chez *l'Homme*, les facteurs de maturation les plus fréquemment utilisés sont le TNF- α et le MCM (Monocyte Conditioned Medium). Ils ont pour effet sur les CD8 immatures, mises en culture en leur présence, d'augmenter l'expression des molécules du CMH et de celles de co-stimulation telles CD80 et CD86.

De même, l'utilisation du ligand CD40L comme facteur de maturation des CD s'est révélée efficace tout en prolongeant la survie des CD (242) (263) (264).

Ainsi, des CD^{CD11c+} ont été exposées à un cocktail de IL-3 et de CD40L pendant plusieurs jours. Elles ont alors surexprimé les molécules du CMH II et des marqueurs de maturation tels DC-LAMP, et ont présenté une capacité à stimuler efficacement les cellules T CD4⁺ naïves (239).

De même, lors de l'étude d'un lymphome B murin, les CD issues de la moelle osseuse et pulsées avec le résultat de la fusion entre le CD40L et un idiotype tumoral surexpriment les marqueurs de maturation CD80, CD86, et le CMH II et sont, après injection, à l'origine d'un ralentissement important de la croissance tumorale (265).

Enfin, des CD ayant subi un transfert génique avec le gène CD40L ont montré un bon niveau de maturation (266).

Il est à noter que le facteur TRANCE ajouté au milieu de culture des CD immatures permet leur maturation (267).

Cela s'explique par le fait que le TNF- α , le ligand CD40L et le TRANCE sont tous membres de la famille des molécules TNF.

Chez les espèces porcine, canine et féline, les équipes de chercheurs ont préféré utiliser les lipopolysaccharides (LPS) qui agissent sur les CD grâce à leurs récepteurs toll-like (TLRs).

Chez *le porc*, l'ajout de LPS au milieu de culture des CD immatures pendant 24 heures induit la surexpression du CMH II et des molécules de co-stimulation CD80 et CD86, mais aussi du marqueur CD14, contrairement à ce qui se produit chez l'Homme. La mesure de la production de IFN- γ et IL-4 par les CD ainsi obtenues permet de mesurer leur degré de maturation (249).

Chez *l'espèce canine*, la génération de CD canines, issues de monocytes sanguins mis en culture avec du GM-CSF et de l'IL-4 canins recombinants et maturées avec du LPS au 6^{ème} jour a été réalisée à partir de chiens atteints d'un mélanome oral malin (251).

Chez *l'espèce féline*, l'étude comparative de différents stimuli dans la maturation des CD a montré que le LPS semble être l'agent de maturation le plus puissant dans sa capacité à sur-réguler l'expression des molécules du CMH II et de B7-1 (262).

Ainsi, la mise en place de protocoles de maturation *in vitro* a permis l'utilisation, dans les essais cliniques d'immunothérapie, de CD8 au phénotype stable et capables d'induire de fortes réponses à cellules T.

Un problème s'est pourtant posé car les CD8 matures possèdent une faible capacité à capturer les Ags exogènes. Pour maximiser l'induction des réponses immunes spécifiques, il semble alors que les CD8 immatures doivent plutôt être maturées après incubation avec ces Ags (268).

De plus, malgré le manque d'essais comparatifs concluants sur leur capacité migratoire, il semble qu'une maturation des CD8 *in vitro* à l'aide des facteurs vus précédemment soit préférable à une maturation « naturelle » *in vivo*.

Enfin, la maturation des CD8 générées *in vitro* a aussi été réalisée *in vivo* grâce à l'association de GM-CSF et IFN- γ au site d'injection. Plus récemment d'ailleurs, la même association utilisée *in vitro* comme milieu de culture de monocytes a permis d'obtenir en 3 jours des CD8 partiellement matures surexprimant les molécules de co-stimulation CD80 et CD86 ainsi que CD40 et ICAM-1 (269) (270).

En résumé, aujourd'hui, les protocoles de maturation *in vitro* des CD8 sont bien acquis chez l'Homme et la souris mais restent à confirmer chez les autres espèces.

Dans tous les cas, ils permettent l'obtention d'un pool de CPAg8 capables d'initier des réponses immunes à cellules T grâce à l'expression sur leur membrane de molécules indispensables à la reconnaissance et à l'activation des lymphocytes T.

3. Potentialisation des cellules dendritiques

Les mécanismes moléculaires responsables de l'incapacité des CD8 à reconnaître puis à présenter efficacement un Ag tumoral aux cellules T sont aujourd'hui bien connus.

Le but des expériences menées ces dix dernières années en immunothérapie anticancéreuse a donc été en particulier de mettre en place des techniques fiables et reproductibles permettant d'obtenir des vaccins à base de CD8 capables d'initier des réponses immunes thérapeutiques ou protectives, spécifiques des tumeurs, efficaces et inoffensives.

Potentialiser les CD8 consiste à les préparer *in vitro* à présenter le ou les Ags tumoraux aux cellules T tout en améliorant l'activation de celles-ci.

3.1 Les différentes sources d'Ag tumoral

Face à l'incapacité des CD8 à présenter efficacement l'Ag tumoral aux cellules T, entraînant une **tolérance** ou une **non reconnaissance** des cellules tumorales par le système immunitaire, les chercheurs ont vite compris l'importance du choix de la source d'Ag tumoral dans leurs essais cliniques.

Or, au cours des premières années, les vaccins cellulaires globaux et les lysats de cellules tumorales étaient les seules sources utilisées avec des protocoles mal définis.

3.1.1 Les antigènes peptidiques associés à la tumeur (TAA)

Les premières hypothèses concernant leur existence ont été posées lors de l'étude comparative réalisée entre des LT cytotoxiques isolés de patients atteints de mélanome et ceux isolés de patients sains. En effet, seuls les premiers étaient capables *in vitro* de lyser des cellules tumorales issues d'un mélanome (271).

Le premier TAA a été isolé à partir d'un patient cancéreux atteint d'un mélanome malin par l'équipe de BOON T. Nommé MAGE-1, il a été ensuite parfaitement caractérisé comme de type HLA-A1 (272) (273).

Ces dix dernières années, de nombreux autres Ags tumoraux ont été mis en évidence grâce à des techniques précises :

- la *première méthode* consiste à utiliser les lymphocytes T spécifiques isolés d'un patient cancéreux pour passer au crible une librairie génique de l'ADNc recombinant des cellules tumorales. Elle nécessite l'isolation et la culture avec des cellules tumorales de cellules T spécifiques de la tumeur et issues du même patient cancéreux. Elle a surtout été employée pour identifier les Ags associés au mélanome (272). Elle reste cependant, en pratique, difficile à réaliser pour les autres types de tumeur, mais aussi à cause de la nécessité de conserver des lignées de cellules T stables sur un long terme (**A**).

- La *seconde méthode*, appelée SEREX (Serological identification of antigens by recombinant expression cloning), utilise les Acs issus du sérum d'un patient cancéreux pour identifier les Ags tumoraux (274) (275). Elle a permis d'identifier de nombreux Ags parmi lesquels le NY-ESO-1, protéine spécifique de la méiose exprimée par de nombreux types de cancer (**B**).

- La *troisième méthode* consiste à utiliser les gènes exprimés différemment par la cellule tumorale par rapport à celle normale. Les peptides issus de ces gènes « candidats » sont mis en culture avec des CPAgs possédant la molécule du CMH I correspondante. Les lymphocytes T isolés des patients cancéreux permettent de sélectionner les Ags à l'origine d'une réponse immune (276). Elle reste la méthode la plus prometteuse et la plus avantageuse à ce jour (**C**).

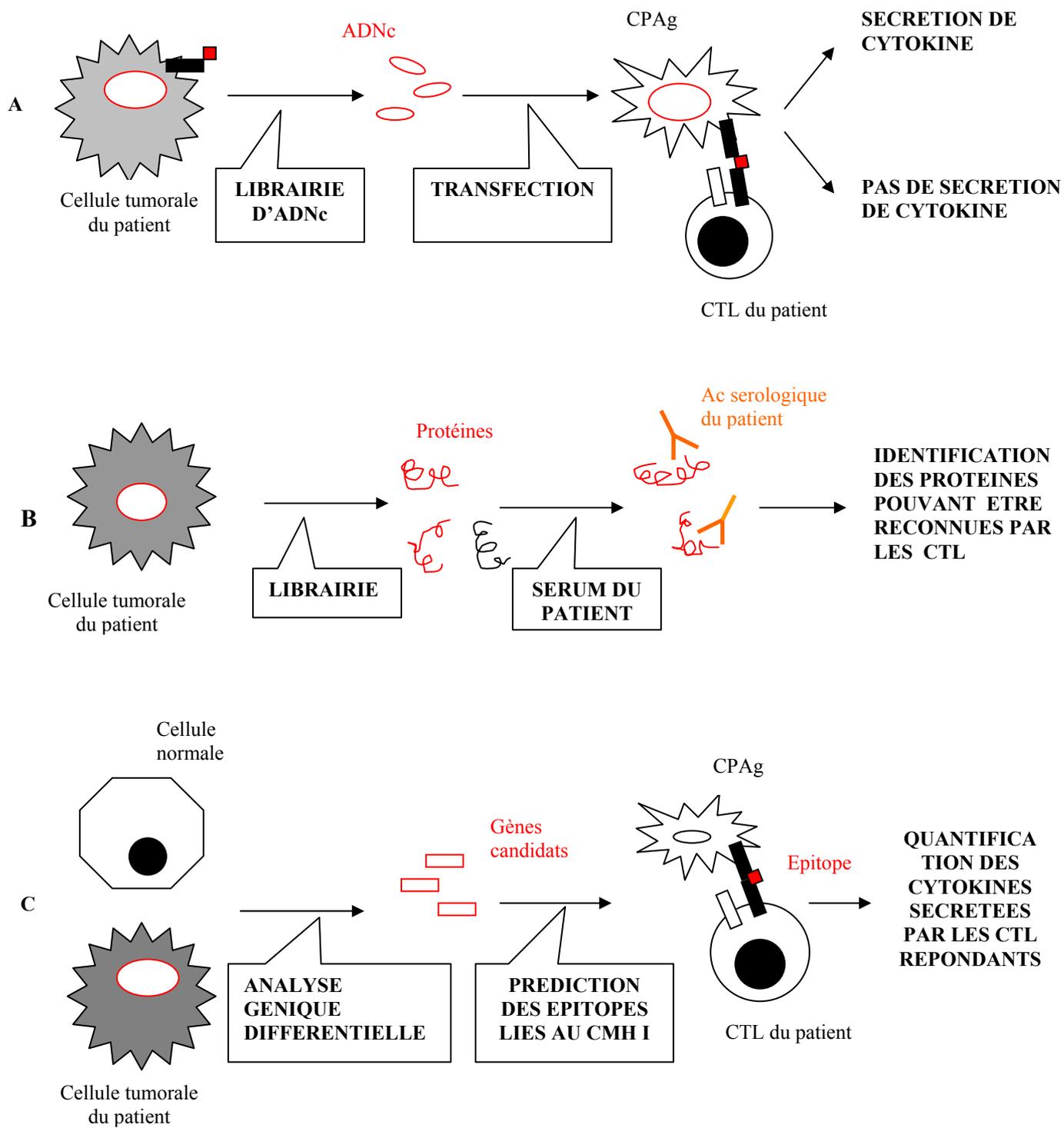


Schéma 7. Différentes méthodes d'identification des antigènes associés à la tumeur.

Ils sont aujourd'hui regroupés dans différentes classes selon leur spécificité et leurs caractéristiques :

- la famille MAGE (MAGE 1, 2 et 3, BAGE, GAGE, RAGE) (277) (278) comprend des **Ags vraiment spécifiques des cellules tumorales**. Ils sont exprimés dans les mélanomes (279) et de nombreuses autres tumeurs mais pas dans les tissus normaux, excepté les cellules germinales des testicules. Or, ces dernières n'expriment pas les molécules du CMH, elles ne peuvent donc pas présenter ces Ags au système immunitaire d'où leur réelle spécificité tumorale. Le dernier Ag, NY-ESO-1, de cette classe a été mis en évidence chez un patient atteint d'un cancer de l'œsophage. Ses peptides se lient fortement aux HLA-A2 (molécule HLA de classe I la plus commune chez les Caucasiens) pour initier de fortes réponses CTLs *in vitro* (280).

- la famille des **Ags issus des mélanocytes différenciés** regroupe en fait des protéines nouvellement exprimées par les mélanocytes, seulement au cours de leur différenciation. Elles sont donc présentes dans les tissus normaux mais leur position « cryptique » leur permet de ne pas être présentées au système immunitaire ou seulement de façon tolérogénique. Par contre, elles sont surexprimées lors de mélanome. On peut citer entre autres MART-1/Melan-A (281), gp100 (282), tyrosinase (283) et TRP-1 et 2. Des Ags similaires, spécifiques d'une lignée cellulaire, ont pu être identifiés lors de cancers de la prostate, parmi lesquels l'Ag membranaire spécifique de la prostate (PSA) et la phosphatase alcaline prostatique (PAP).

- la famille des **Ags issus de gènes mutés** comprend de nombreuses protéines cellulaires constitutives des tissus normaux mais ayant subi une mutation de leur gène lors du processus tumoral. Ces mutations ponctuelles entraînent de fortes réactions CTLs contre les cellules tumorales chez les patients cancéreux (284). Ces protéines sont donc inhérentes au phénotype malin de plusieurs types de cancer. On peut citer :
 - 1- la protéine mutée p53, mise en évidence dans le cancer du sein mais aussi dans celui du poumon et celui gastro-intestinal où elle est surexprimée intracytoplasmiquement (285);
 - 2- la protéine mutée Ras, issue de simples substitutions d'un amino-acide en position 12 et 61 (286).

- La famille des **Ags issus de protéines normales surexprimées dans certains types de tumeurs**. Ont été identifiées, la protéine Melan A dans les mélanomes et la protéine HER-2/neu dans les cancers des ovaires, du sein et d'autres adénocarcinomes (287).

Grâce à une connaissance plus large de ces Ags spécifiques, deux stratégies ont été envisagées lors des essais cliniques d'immunisation :

- la *première*, quasi délaissée de nos jours, consiste à injecter directement ces peptides antigéniques aux patients malades (288), soit par voie intradermique, soit par voie intraveineuse, ou soit par voie intra-nodale, pour qu'ils puissent aller directement se lier aux molécules du CMH des CDs. Or, cette technique rencontre deux inconvénients majeurs représentés par le risque potentiel de tolérance engendré par les peptides libres et leur demi-vie courte ;
- la *deuxième*, aujourd'hui retenue dans la majorité des essais cliniques, consiste en une potentialisation des CDs *in vitro* puis à leur réinjection *in vivo*.

Ainsi, dès 1985 chez *la souris*, l'injection de CDs, issues de la rate et pulsées *in vitro* avec un Ag dérivé des cellules de sarcome, a entraîné une protection antitumorale dose-dépendante et un prolongement de la survie des animaux (289).

De même, une immunité antitumorale spécifique et protectrice a été obtenue chez des souris inoculées avec des cellules tumorales, grâce à leur vaccination à l'aide de CDs issues de la moelle osseuse et pulsées *in vitro* avec des peptides antigéniques spécifiques issus, soit d'un sarcome (peptide E7 papillomavirus), soit d'un carcinome pulmonaire (peptide MUT1) (290).

Chez *l'Homme*, des réponses immunes CTLs, spécifiques du peptide utilisé pour la potentialisation des CDs *in vitro*, ont été obtenues dans des essais thérapeutiques sur des mélanomes malins (291) (292) (293) (294) (295).

Les essais cliniques ont aussi été nombreux dans le cadre du traitement du cancer de la prostate. Ils ont utilisé comme peptide antigénique soit la phosphatase alcaline prostatique recombinée humaine (297) ou murine (234), soit la protéine membranaire spécifique de la prostate (297) (298) (299). Dans les deux cas, tous les patients vaccinés ont développé une réponse immune à cellules T spécifique de l'Ag, aboutissant parfois cliniquement à des rémissions complètes (300) (301).

En ce qui concerne le traitement des myélomes, de bons résultats ont aussi été obtenus (302) (303) (304) (305).

Enfin, de nouvelles expériences s'intéressent aussi aujourd'hui avec succès au cancer ovarien et à celui du sein (306), mais les effets thérapeutiques restent à valider lors d'essais cliniques.

L'avantage majeur de leur utilisation réside dans **leur grande spécificité** qui permet de réduire au maximum les risques de réponse auto-immune.

Pourtant, cette même spécificité représente aussi un des inconvénients majeurs de leur utilisation car ils sont soumis à la **restriction haplotypique** de chaque patient. Donc, pour un peptide antigénique donné, le nombre de patients vaccinés va forcément être limité puisqu'il faut définir l'haplotype correspondant au peptide pour chacun d'eux.

De plus, les expériences ont montré que la majorité des antigènes peptidiques identifiés se lient aux molécules HLA classe I favorisant les réponses à cellules T CD8+ cytotoxiques mais délaissant celles à cellules T CD4+ helpers responsables du maintien de l'immunité.

Enfin, l'utilisation d'un seul peptide peut être responsable **d'un phénomène d'échappement** de la tumeur par clonage sélectif si l'Ag utilisé n'est pas immuno-dominant.

Face à chaque problème rencontré, des solutions ont pu être élaborées :

- l'utilisation de mélanges de peptides antigéniques permettant d'obtenir des réponses CTLs fortes grâce à la présence d'Aggs immuno-dominants (307) ;
- l'utilisation de peptides modifiés par simple substitution d'un amino-acide au niveau de leur site d'ancrage améliorant leur liaison avec les molécules du CMH (308) ;
- l'utilisation de différents peptides antigéniques, se liant aux molécules du CMH I pour certains et à celles du CMH II pour d'autres, afin d'obtenir à la fois une réponse immunitaire cytotoxique et helper.

Ce problème peut aussi être résolu en utilisant des peptides non spécifiques de la tumeur dits « helpers » tels le KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) (291).

En résumé, l'utilisation de **ces antigènes associés aux tumeurs** est aujourd'hui largement étendue aux essais cliniques thérapeutiques avec des résultats encourageants.

Mais, malgré cela, d'autres stratégies ont été développées parallèlement afin de contourner **le problème de la restriction haplotypique**. Elles représentent les autres sources possibles d'antigène tumoral.

3.1.2 Les protéines tumorales totales purifiées ou recombinantes

L'utilisation des protéines tumorales totales purifiées ou recombinantes comme source d'Ag permet de **contourner le problème de la restriction haplotypique**.

Mises en contact avec les CD *ex vivo*, elles sont capturées et transformées pour être ensuite présentées par les molécules du CMH sous forme de peptides différents les plus immunogéniques (surtout pour les protéines tumorales purifiées).

Ainsi, *des CD murines* cultivées *in vitro*, pulsées avec une protéine tumorale soluble, puis réinjectées à des souris, ont initié une réponse CTL (309) (310).

Chez *l'Homme*, les premiers essais cliniques ont été réalisés sur des patients atteints d'un lymphome B non-Hodgkinien de bas grade. Leur vaccination à l'aide de CD autologues pulsées avec des protéines idiotypiques conjuguées et du GM-CSF a donné des résultats très encourageants chez certains patients (311) (312).

De même, de nombreux essais thérapeutiques ont été réalisés dans le cadre de traitements de myélomes multiples (313).

Un des autres avantages des protéines recombinantes est la possibilité de leur associer des épitopes définis qui permettent d'améliorer la liaison molécules du CMH/Ag ou la stimulation des LT comme par exemple le KLH (voir précédemment), des cytokines (IL-12 et IL-15), ou des molécules de co-stimulation.

En résumé, cette source d'Ag tumoral reste malgré cela peu intéressante car l'obtention des protéines tumorales purifiées nécessite une quantité très importante de tissu tumoral et celle des protéines recombinantes est difficile et très coûteuse.

Enfin, si l'apport par ces protéines de nombreux épitopes indéfinis permet de surmonter le problème de la restriction haplotypique, il est à l'origine aussi d'**un risque potentiel de réaction auto-immune** contre des Ags du soi.

3.1.3 Les lysats tumoraux et les corps apoptotiques issus des cellules tumorales

L'utilisation de lysats de cellules tumorales ou de leurs corps apoptotiques comme source d'Ag permet, tout comme avec les protéines, de contourner le problème de la restriction haplotypique puisque ces préparations apportent de très nombreux Ags tumoraux.

En ce qui concerne *les lysats tumoraux*, les premiers essais cliniques *humains* ont été réalisés dès 1998 chez des patients souffrant d'un mélanome malin (291). Ainsi, des réponses immunes ont été obtenues chez la plupart des patients avec des cas de régression partielle ou totale et des effets secondaires mineurs.

Par la suite, des résultats encore plus encourageants ont été obtenus parmi 19 patients atteints d'un mélanome et vaccinés à l'aide de CDs pulsées avec des lysats de cellules tumorales autologues (314). En effet, une rémission complète durable est survenue chez 3 patients, trois autres ont montré des réponses partielles.

D'autres équipes de chercheurs ont utilisé ces lysats pour le traitement d'autres types de cancer.

C'est le cas pour le carcinome cellulaire rénal avec les premiers essais thérapeutiques réalisés dès 1998 (315). Par la suite, la même équipe a réussi à obtenir deux cas de rémission complète, un cas de rémission partielle et sept cas de stabilisation clinique parmi 27 patients cancéreux évalués et vaccinés à l'aide de CDs pulsées avec des lysats de cellules tumorales autologues (316).

De bons résultats ont aussi été obtenus dans le cas du traitement du carcinome parathyroïdien (317) et de celui du lymphome cutané à cellules T (318).

Enfin, il semble que l'utilisation des lysats tumoraux comme source d'Ag pour la préparation des CDs permette d'obtenir des réponses immunes efficaces dans le cas de nombreuses autres tumeurs solides (319) et de certains cancers à un stade avancé (320).

Chez *la souris* aussi, les CDs pulsées avec des lysats tumoraux puis réinjectées *in vivo* sont à l'origine de l'initiation de réponses immunes anti-tumorales (321), avec des essais thérapeutiques dans le cas du mélanome B16 et du fibrosarcome MCA-106 induits (322).

Plus récemment, une équipe de chercheurs a réussi à inhiber à 82% la croissance tumorale chez des hamsters atteints d'un cancer pancréatique induit, et ce grâce à leur vaccination à l'aide de CDs pulsées avec un lysat de cellules tumorales (323).

L'utilisation *des corps apoptotiques* comme source d'Ag tumoral est née d'expériences mettant en évidence la capacité des CDs à les phagocyter grâce à des récepteurs spécifiques tels la **vitronectine** et la **phosphatidylsérine** (324) (325) (326).

Par la suite, d'autres études expérimentales réalisées chez *la souris* (327) puis chez *l'Homme* (328) (329) (330) ont permis de mettre en évidence la capacité des CD8 à transformer ces corps apoptotiques en peptides antigéniques, puis à les coupler aux molécules du CMH I et II par le phénomène de **CROSS-PRESENTATION**.

Les essais cliniques thérapeutiques les utilisant sont encore rares. Ainsi, chez *l'Homme*, ces préparations ont permis chez des patients atteints d'un cancer rénal d'activer les lymphocytes infiltrant la tumeur (331).

Des résultats similaires ont été obtenus dans le cadre d'essais sur le mélanome (332) et de recherche thérapeutique pour le cancer gastro-intestinal (333).

Enfin, quelques équipes ont réalisé des études comparatives entre les différentes sources d'Ag utilisées pour potentialiser les CD8. Ainsi, il en a résulté que celles pulsées avec des corps apoptotiques sont plus efficaces à stimuler des réponses CTLs que celles pulsées avec des lysats tumoraux (334).

De plus, malgré la facilité de leur préparation et l'intérêt majeur de l'apport de multiples peptides antigéniques, leur comparaison avec d'autres sources comme les hybrides (voir ultérieurement) met en avant leur moindre efficacité liée à de nombreux inconvénients (335).

En effet, certaines études ont mis en évidence la possibilité que ces CD8 pulsées avec des corps apoptotiques engendrent **un phénomène de tolérance** au lieu d'initier une réponse immune CTL (336), phénomène pouvant être expliqué par un processus de « saturation » des CD8 qui échouent à présenter correctement les Ags tumoraux.

De plus, il semblerait qu'une partie des fragments issus des corps apoptotiques phagocytés soient protéolysés au lieu d'être transformés puis couplés aux molécules du CMH.

Enfin, certains auteurs expliquent la faible capacité des lysats tumoraux par rapport aux autres sources par la présence possible dans ces préparations de **cytokines inhibitoires** pour les CD8 (337).

Une des solutions à ce problème d'efficacité a été résolu grâce à la découverte **du rôle essentiel des protéines « heat shock »** (HSPs) dans le rejet des tumeurs chez la souris et à l'existence de récepteurs spécifiques sur les CD8 humaines (338) (339) (340).

Ainsi, le traitement par la chaleur de cellules tumorales augmente le nombre de HSPs (HSp70, HSp90, et gp96). Les lysats tumoraux contenant ces HSPs induisent la surexpression de la molécule de co-stimulation CD86 des CD8.

En résumé, si les préparations à base de lysats de cellules tumorales ou de corps apoptotiques ont des avantages certains représentés par l'apport de nombreux peptides antigéniques et par leur facilité d'obtention, elles restent parmi les moins efficaces en tant que source d'Ag pour la potentialisation des CD8.

3.1.4 Les hybrides : fusion entre la cellule dendritique et la cellule tumorale

L'intérêt porté aux cellules tumorales comme sources directes d'Ag est né de la difficulté rencontrée à identifier et produire des Ags tumoraux spécifiques et immunogéniques dans d'autres stratégies d'immunisation.

Or, dès 1994, la réalisation d'une fusion entre des cellules B activées et des cellules tumorales d'hépatome a abouti à la formation de cellules hybrides, capables d'induire une immunité tumorale spécifique (341).

Un tel résultat a alors ouvert la voie d'une nouvelle et prometteuse approche d'immunisation anti-tumorale basée sur l'utilisation de cellules hybrides fortement immunogènes et issues de la fusion entre une cellule tumorale et une CD (342).

Par la suite, de nombreuses expériences *in vitro* ont permis de confirmer la capacité de ces hybrides à engendrer des réponses immunes anti-tumorales (343).

Ainsi, dès 1997, des hybrides, formés entre *des CDs murines* dérivées de la moelle osseuse et des cellules tumorales d'adénocarcinome MC38, puis injectés à des souris malades, ont été à l'origine d'une immunité thérapeutique et protectrice spécifique (344). La même équipe a même mis en évidence la capacité de ces hybrides à réverser un phénomène de tolérance survenant ordinairement vis-à-vis d'un Ag (345).

Parallèlement, des études sur un modèle murin utilisant, soit des cellules B16 de mélanome soit des cellules 3LL de carcinome pulmonaire, ont mis en avant le fait qu'une fusion totale entre les cellules tumorales et les CDs n'était pas forcément nécessaire pour obtenir une immunogénicité des premières. Une **simple co-culture** entre les deux types de cellule, avant leur ré-injection *in vivo*, suffit à engendrer une immunité anti-tumorale persistante. Par contre, l'utilisation d'une membrane perméable lors d'essais de co-culture a mis en évidence **l'obligation d'un contact physique** entre les cellules (346).

Les premières études vaccinales ont été développées chez *la souris* grâce à une technique de fusion cellulaire chimique utilisant **le polyéthylène glycol (PEG)**.

Ainsi, la fusion par le PEG entre des CDs issues de la moelle de souris et des cellules tumorales normalement peu immunogènes, telles celles du mélanome B16 et du lymphome RMA-S, a abouti à la formation d'hybrides exprimant les molécules du CMH I et II, les molécules de co-stimulation, ainsi que les marqueurs de surface spécifiques des deux types cellulaires. De plus, la vaccination de souris avec ces hybrides a permis d'obtenir une immunité protectrice contre une progression tumorale (347).

De très nombreuses autres vaccinations ont donné des résultats satisfaisants chez la souris. C'est le cas lors d'une vaccination thérapeutique contre un mastocytome, utilisant des hybrides CD/cellule P815 de mastocytome, qui a permis d'induire une résistance anti-tumorale sur un long terme (348).

Il en est de même lors de vaccinations contre un neuroblastome à l'aide d'hybrides CD/cellule Neuro-2a de neuroblastome murin (349), contre un fibrosarcome, un mélanome ou un gliome (350) (351).

Enfin, plus récemment, l'immunisation de souris saines ou atteintes d'un carcinome hépatocellulaire avec des hybrides CD/cellule H22 tumorale, formés par méthode chimique (PEG), a abouti à une immunité protectrice chez les souris saines et une augmentation de la survie des souris cancéreuses (352).

Des résultats similaires ont été obtenus aussi chez des rats atteints d'ostéosarcome et vaccinés avec des hybrides CD/cellule UMR106 tumorale formés par électrofusion (353).

Chez *l'Homme*, les premiers essais cliniques ont été réalisés dans le courant de l'année 2000, dans le cadre de la recherche d'une thérapeutique contre le carcinome cellulaire métastatique rénal. L'étude s'est portée sur 17 patients cancéreux et la fusion entre les cellules tumorales autologues et les CD allogéniques a été réalisée par électrofusion. Le suivi sur 13 mois a montré un rejet total de toutes les lésions tumorales chez 4 patients et une réduction de la masse tumorale de presque 50% chez 2 autres (354) (355).

Plus tard, des résultats aussi encourageants ont été obtenus après vaccination de 13 patients atteints d'un carcinome rénal sans effet toxique majeur (356).

D'autres essais thérapeutiques plus récents ont aussi été réalisés avec succès chez des patients atteints de mélanome malin (357) (358) ou de gliome (359).

Enfin des expériences, limitées pour l'instant aux tests *in vitro* d'immunogénicité, ont mis en avant l'intérêt des hybrides dans le traitement des carcinomes ovarien et mammaire (360) (361).

Comme nous l'indique l'évolution des essais thérapeutiques, les techniques chimiques de fusion basées sur l'utilisation du PEG ont rapidement été remplacées par l'**électrofusion**, technique utilisant deux réactions indépendantes consécutives, une électrophorèse et une rupture réversible de la membrane cellulaire (362) (363).

Les causes avancées sont la toxicité du PEG, son efficacité fusionnelle médiocre (nécessité d'une purification), la faible reproductibilité des techniques et l'existence de variations spécifiques parmi les cellules tumorales.

Par contre, l'électrofusion est applicable à toutes les cellules mammifères et facilement reproductible, son efficacité fusionnelle dépasse de loin celle du PEG et donc ne nécessite pas de sélection ou de purification, et enfin, c'est une technologie adaptée aux grands nombres de préparations pour les essais cliniques (plus de $200 \cdot 10^6$ cellules utilisées en une fois sans compromettre la fusion).

L'électrofusion *in vitro* par électroporateur entre les cellules tumorales de mélanome humain et les CD issues des monocytes sanguins a été réalisée avec une efficacité située entre 3 et 18% (342).

De même, Hayashi T. a obtenu 20 à 30% de cellules hybrides CD/cellules tumorales de gliome GL261 chez la souris après électrofusion et 23% d'hybrides entre des CDs dérivées des monocytes humains et différentes lignées cellulaires de mélanome avec la même technique (350).

Enfin, une étude comparative menée sur le modèle *murin* et le neuroblastome a mis en évidence la supériorité de l'efficacité de fusion de l'électrofusion par rapport au PEG, mais aussi, la supériorité des hétérocaryons formés à exprimer plus intensément les cellules de co-stimulation et donc à engendrer des réponses T efficaces aussi bien *in vitro* que *in vivo* (349).

D'autres études expérimentales ont permis de mettre en évidence l'importance de l'utilisation de CD matures lors d'hybridation. En effet, chez le modèle *murin*, les hybrides cellules de myélome J558/CDs matures sont à l'origine d'une immunité protectrice chez 3 souris parmi les 10 alors qu'elle est nulle avec des hybrides J558/CDs immatures (364).

<p>En résumé, l'utilisation d'hybrides cellulaires dans la thérapeutique vaccinale anticancéreuse semble très prometteuse et bien supérieure pour potentialiser les CDs (). En effet, elle a l'avantage d'éviter l'identification des Ags tumoraux, de contourner la restriction haplotypique et d'augmenter les signaux de co-stimulation indispensables à l'activation des cellules T.</p>

3.1.5 Transfert génique de l'Ag aux CD8

Malgré les nombreux avantages rencontrés dans l'utilisation des lysats tumoraux, des corps apoptotiques et des hybrides, quelques inconvénients communs restent à résoudre comme **la nécessité d'une grande quantité de tissu tumoral** pour leur préparation ou celle d'**une étape de purification** pour diminuer au maximum les risques de réaction auto-immune.

C'est avec cet objectif que des équipes de chercheurs se sont très vite intéressées au matériel génétique comme source d'Ag tumoral représenté, soit par **un ADN ou un ARN antigénique spécifique**, soit par **l'ARN tumoral total**.

Ainsi, dès 1995, la possibilité de modifier génétiquement les CD8 afin d'exprimer un antigène associé à une tumeur a été prouvée en transfectant directement le gène codant pour la tyrosinase humaine, Ag associé au mélanome, à des CD8 capables alors d'activer à long terme la prolifération de cellules T spécifiques (365).

Parallèlement, de nombreuses études ont étudié la possibilité de transférer un antigène spécifique en utilisant **une technique de transduction par des vecteurs viraux**. Ainsi, à partir de 1996, plusieurs équipes ont mis en évidence la possibilité de transférer le gène MART-1 à des CD8 par transduction avec un rétrovirus (366), un poxvirus (367) ou un adénovirus (368) (369) (370) (371).

Des études comparatives ont montré la grande supériorité de cette technique de transfert génique par rapport aux méthodes physiques ou chimiques telles l'électroporation, les liposomes ou le CaPO_4 (372).

En fait, il semble que la plupart de ces méthodes de transfection soit toxique pour les CD8 avec une modification de leur phénotype voire une mort cellulaire.

Ainsi, sous des conditions optimales, quand l'électroporation atteint 15% d'efficacité la viabilité des CD8 est inférieure à 60% (373).

Par contre, la transduction par des vecteurs viraux peut atteindre les 90 à 100% d'efficacité et ne provoque, en général, aucune altération dans le phénotype des CD8, avec même une augmentation importante des molécules de co-stimulation dans le cas des adénovirus (374).

De plus, il semble aussi que l'expression du transgène dans les CD8 humaines transduites avec un adénovirus puisse persister bien au-delà du temps d'expression après transfection physique (1 semaine contre 72 heures) (372).

METHODES DE TRANSFECTION	RESULTATS
VIRALES	
Adénovirus	transduction supérieure à 90%
Poxvirus	immunité antivirale n'affectant pas l'efficacité <i>in vivo</i>
Retrovirus	nécessité d'une maturation post-infectieuse des CD
Herpesvirus	transduction de multiples gènes
PHYSIQUES	
CaPO ₄	transduction supérieure à 10%
Electroporation	transduction d'environ 15% avec une faible viabilité des CD

Tableau 1. Différentes méthodes de transfection génique de l'antigène dans les cellules dendritiques.

L'utilisation des vecteurs viraux n'est rendue possible que par **la modification par délétion** d'un ou plusieurs de leurs gènes responsables de leur réplication.

Ainsi, le vecteur adénoviral, considéré aujourd'hui comme le plus efficace, est issu de l'adénovirus humain de sérotype 5 ayant subi une délétion de son gène E1.

Il est à noter aussi que l'utilisation de certains vecteurs viraux rencontre des limites. Ainsi, par exemple, les vecteurs viraux issus du virus de la leucémie murine ne sont utilisables que pour la transduction de CD₃ immatures c'est-à-dire de cellules se divisant, dans lesquelles seulement ils pourront s'intégrer de façon stable au génome.

Si les vecteurs adénoviraux sont capables eux d'infecter une grande variété de cellules immatures ou non, ils transfèrent le gène tumoral efficacement que lors de hauts titrages viraux. Ceci s'expliquerait par le faible nombre de récepteurs adénoviraux sur les CD₃.

Des modèles tumoraux murins ont d'abord été utilisés pour tester *in vivo* l'efficacité des CD₃ modifiées génétiquement. Ainsi, celles modifiées avec le gène OVA par transduction adénovirale ont induit *in vivo* une réponse CTL spécifique plus forte que celle obtenue avec les CD₃ pulsées avec le peptide OVA, et ont aussi engendré une immunité anti-tumorale protectrice contre les tumeurs EG.7 exprimant OVA (375).

Concernant l'utilisation de l'ARN tumoral total, des souris vaccinées avec des CD₃ pulsées avec l'ARN issu de cellules tumorales exprimant OVA ont été protégées de l'évolution de ces cellules une fois implantées.

Des résultats similaires ont été obtenus par la même équipe lors de la vaccination de souris à l'aide de CD₃ pulsées avec l'ARN tumoral des cellules de mélanome métastatique B16. Une réduction très importante des métastases pulmonaires a été aussi observée chez ces souris (376).

L'utilisation de l'ARN tumoral total a été aussi rendu possible dans le cas de petites voire microscopiques tumeurs grâce à **la possibilité d'amplification du matériel génique par PCR** (Polymerase Chain Reaction) (377).

Ainsi les essais thérapeutiques l'utilisant ont permis d'ouvrir des perspectives nouvelles dans les traitements des tumeurs du SNC (378), du cancer colorectal (379), du myélome (380), et du cancer de la prostate (381) avec des premiers résultats encourageants chez ***l'Homme***.

Il est à noter d'ailleurs, que ces techniques de potentialisation ont mis en évidence récemment l'intérêt de l'utilisation de **la télomérase transcriptase réverse** comme **Ag tumoral universel**.

En effet, elle est le composant catalytique d'un complexe fonctionnel, capital dans le maintien de l'immortalité cellulaire. Faiblement exprimée dans les cellules humaines adultes normales, elle est mise en évidence dans 90% des tumeurs avec de hauts niveaux d'expression.

Ainsi, son utilisation, soit sous forme de plasmide d'ADN, soit associée à un vecteur viral (adénovirus), permet de produire des CD exprimant cette télomérase (et ce, plus fortement après transduction) et capables de générer des réponses CTLs à l'origine de la lyse des cellules tumorales télomérase +, comme celles du cancer de la prostate (382) (383).

En résumé, *le principal intérêt* d'une potentialisation antigénique des CD par **transfection ou transduction génique** est de contourner le problème de la restriction haplotypique.

De plus, l'utilisation de l'ARN tumoral total permet d'obtenir un panel important d'épitopes sans avoir à les définir, et d'appliquer cette technique à de très petites tumeurs.

Enfin, la transduction des CD par des vecteurs viraux permet d'obtenir, *in vitro* et *in vivo*, des CD induisant des réponses immunes CTLs spécifiques bien plus fortes qu'avec les autres techniques de transfert génique, et ce, grâce à une expression plus durable des Ags tumoraux couplés aux molécules du CMH sur la surface cellulaire s'expliquant par la stabilité du génome des CD ainsi modifiées.

Le seul inconvénient de l'utilisation des vecteurs viraux est le manque encore de contrôle absolu sur la capacité des CD génétiquement modifiées à transcrire d'autres protéines virales, non impliquées dans la réplication virale, mais pouvant faire de ces CD **des cellules cibles** pour l'immunité des patients vaccinés.

3.1.6 Les exosomes

Comme nous l'avons vu précédemment, malgré la connaissance à ce jour de nombreux Ags associés aux tumeurs, la majorité des Ags tumoraux immuno-dominants reste inconnue.

Les techniques de potentialisation des CDs utilisant les hybrides ou le transfert génique ont permis de résoudre ce problème, et de nombreux essais cliniques thérapeutiques ont déjà prouvé leur efficacité.

Plus récemment encore, la découverte dans de nombreuses cellules hématopoïétiques (réticulocytes, lymphocytes B et T, plaquettes, mastocytes et CDs) de l'existence de vésicules internes aux endosomes, formant des corps multivésiculaires (MBV) et capables de fusionner avec la membrane cellulaire, a ouvert une nouvelle voie en immunothérapie anticancéreuse (384) (385).

Ces vésicules, appelées **exosomes**, permettent en fait l'élimination des protéines ne suivant pas la voie de dégradation intracellulaire. Sécrétées par les cellules vivantes, et différentes des microvésicules des corps apoptotiques, la plupart contiennent des molécules du CMH I, des enzymes, des molécules d'adhésion (intégrines, ICAM-1, lactadhérine), de nombreuses autres protéines (rab, annexines, tétraspanines ...) et des glycolipides (386).

Leurs propriétés biophysiques (taille et densité) ont permis leur purification à partir de milieux de culture supernatants ou de fluides physiologiques comme le sang, les ascites ou les effusions malignes (387) (388) (389).

Elle se fait **par diafiltration** et/ou **par centrifugation différentielle sur un gradient de sucrose**. De plus, les exosomes peuvent être conservés pendant au moins deux ans à - 80°C.

La première expérience mettant en évidence les propriétés immuno-stimulatrices de ces vésicules a été réalisée dès 1996 avec des exosomes sécrétés par des cellules B porteuses du virus EBV (Einpstein-Barr Virus).

La première vaccination à l'aide d'exosomes issus de CDs murines pulsées avec des peptides tumoraux a été réalisée deux ans plus tard chez *la souris* et a abouti à une réponse immune à cellules T spécifiques et à un prolongement de la survie des rongeurs (390).

Des expériences plus poussées sur l'immunogénicité de ces exosomes ont ensuite montré qu'ils étaient capables de stimuler à la fois des cellules T CD4+ et des cellules T CD8+, seulement en transférant leurs complexes peptide/CMH I et II dans des CDs hôtes **matures** (391) (392).

En effet, il a été démontré que les exosomes « matures » (sécrétés par exemple par des CDs traitées avec des LPS) avaient une meilleure capacité à initier les réponses immunes T que ceux dits « immatures » (393). Cette différence s'expliquerait par une quantité plus importante de molécules du CMH II, de CD86 et ICAM-1 dans les premiers (394).

Grâce à ces découvertes, les essais cliniques utilisant les exosomes sur **des patients cancéreux humains** ont récemment été autorisés.

La première vaccination a été réalisée sur des patients souffrant d'un mélanome de stade III ou IV et a abouti à des réponses immunes significatives avec des effets secondaires minimes et quelques améliorations cliniques sur le plan lésionnel (395).

Des résultats similaires ont aussi été obtenus chez des patients atteints de cancers pulmonaires avancés (396).

On peut aussi remarquer que l'utilisation d'exosomes issus de cellules tumorales comme source d'Ag est encore sous investigation. En effet, leur utilisation directe lors de vaccinations expérimentales a montré leur plus faible capacité à stimuler les réponses immunes CTLs que les exosomes dérivés des CDs. Ceci pourrait s'expliquer par leur potentiel inhibiteur sur le système immunitaire dû à la présence de molécules inhibitrices des cellules T tel le ligand Fas (394).

Il semble aujourd'hui que leur utilisation lors de vaccinations ne soit envisageable qu'après leur pulsation *ex vivo* avec des CDs matures ou qu'après traitement par la chaleur des cellules tumorales (dites « stressées ») dont ils sont issus. Ceci reste à confirmer.

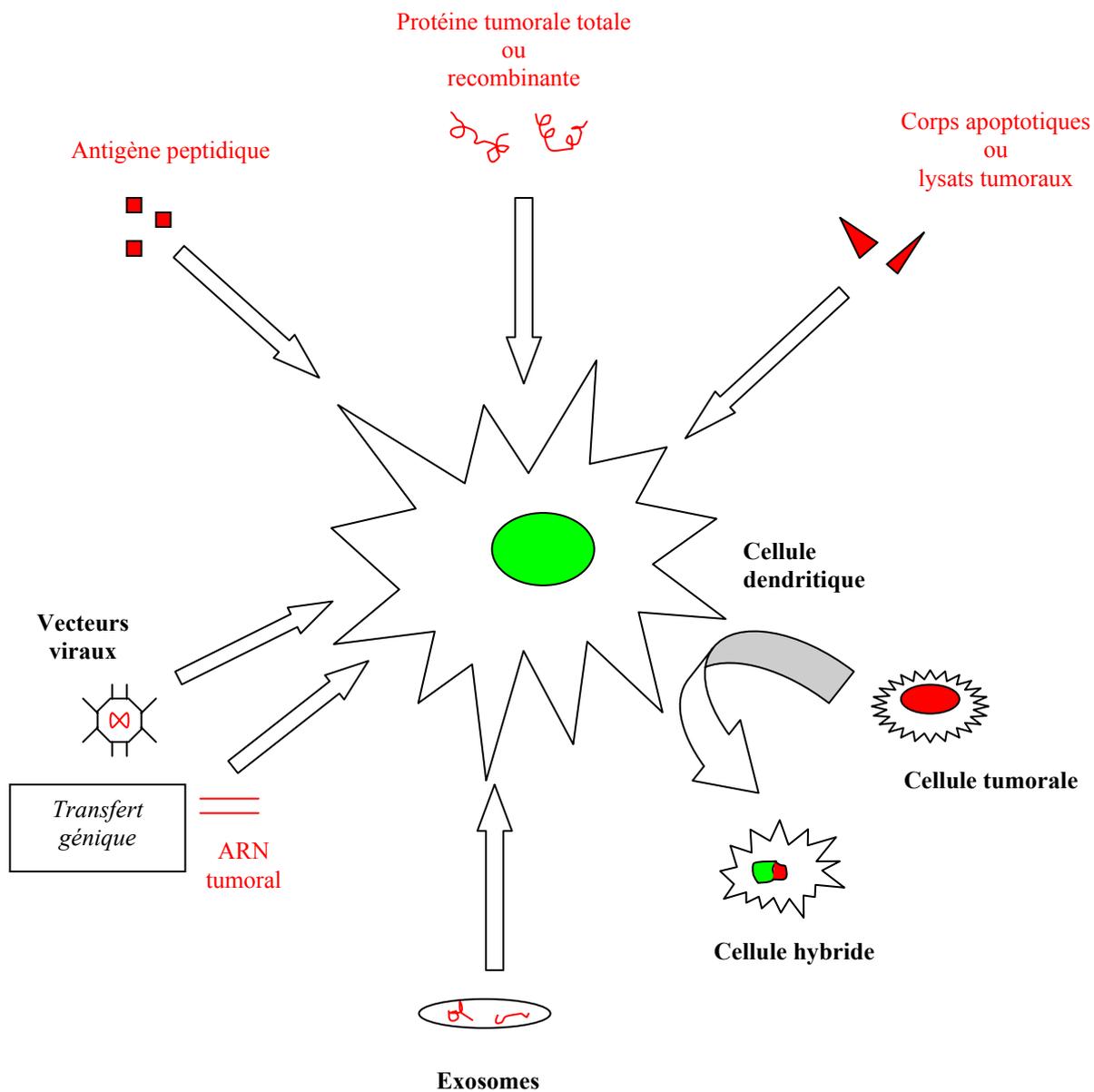


Schéma 8. Différentes sources d'antigène tumoral pour la potentialisation des cellules dendritiques.

3.2 Utilisation des molécules immuno-modulatrices et de celles de co-stimulation

Connaissant l'**effet immuno-inhibiteur** des cellules tumorales en prolifération sur le fonctionnement des CD8, de nombreuses équipes de chercheurs ont étudié puis testé l'effet de diverses molécules dites **immuno-stimulatrices** sur l'efficacité de ces CD8 lors d'un processus tumoral.

Indispensables dans les milieux de culture des progéniteurs afin d'obtenir des CD8 en grande quantité et au phénotype stable, ces molécules ont d'abord été utilisées *in vivo* lors de protocoles vaccinaux acellulaires avec de bons résultats (surtout pour les cytokines IFN- α , IL-2 et GM-CSF) (398) (399) (400) chez *les modèles animaux*.

Chez *l'Homme* leur utilisation directe a été limitée du fait d'un important risque de toxicité (utilisation controversée de IL-12) (401).

Durant ces dix dernières années, **les techniques du génie génétique** ont été utilisées par de nombreuses équipes dans le but de potentialiser les CD8 grâce à l'introduction dans leur génome d'un ou plusieurs gènes codant pour ces molécules.

Ainsi, dès 1996, la vaccination à base de CD8 modifiées génétiquement avec 2 sous-unités du gène **IL-12** (p40 et p35) a abouti à une activation maximale des LT cytotoxiques.

De même, chez un modèle murin, des CD8, dérivées de la moelle osseuse et transduites rétroviralement avec le gène IL-12 murin, ont exprimé, de façon stable et à de hauts niveaux, la protéine bioactive IL-12. Ensuite, l'injection de ces CD8 modifiées a permis la régression de tumeurs faiblement immunogéniques (tel le mélanome B16) (402).

Enfin, de fortes réponses CTLs, spécifiques d'un Ag associé à une tumeur, ont été initiées *in vitro* par des CD8 modifiées génétiquement afin d'exprimer en même temps un Ag spécifique du mélanome et IL-12 (403).

En fait, l'IL-12 est une cytokine pro-inflammatoire produite par les CD8 en réponse au signal CD40/CD40L. En retour, elle stimule l'expression du CD40L sur les cellules T et la production de IFN- γ par les cellules NK. Enfin, elle augmente la résistance des CD8 face à la mort cellulaire induite lors de cancer de la prostate, et a la capacité de bloquer la néo-angiogénèse tumorale *in vivo* dans un modèle murin (404).

Plus rapidement, d'autres interleukines comme **IL-7** et **IL-4** ont intéressé les chercheurs.

Concernant *la première*, des CD8 issues des monocytes sanguins humains transduites rétroviralement avec le gène IL-7 ont montré *in vitro* une capacité stimulatrice plus importante par rapport aux CD8 non transfectées (405). Cette potentialisation est due en fait à la capacité de IL-7 à augmenter la prolifération des cellules T.

Ainsi, un essai thérapeutique a montré que l'injection intra-tumorale de CD8 modifiées avec le gène IL-7 provoquait une régression tumorale (406).

Concernant *la seconde*, dans le cadre d'une étude comparative effectuée entre différents hybrides formés entre des cellules tumorales de myélome murin et des CD8 à différents stade de maturité, le gène de l'interleukine IL-4 a été introduit dans certains cas. Il en a résulté, en plus de la mise en évidence de l'importance du choix de CD8 matures dans la formation des hybrides, une plus grande efficacité de ceux contenant le gène IL-4 avec une immunité protectrice efficace chez l'ensemble des 10 souris vaccinées (407).

L'intérêt s'est aussi vivement porté sur une autre cytokine, le **GM-CSF**, indispensable à l'activation des CD8. Son rôle essentiel a amené les chercheurs à penser que l'introduction d'un ADNc codant pour ce facteur dans les CD8 permettrait une stimulation autocrine, et ainsi, augmenterait leur capacité de présentation de l'Ag.

Ainsi, sa transfection grâce à un adénovirus dans des lignées de CD8 XS chez *la souris* a abouti à la sécrétion d'une quantité importante de ce facteur, à la formation de prolongements dendritiques beaucoup plus longs et à une meilleure expression des molécules du CMH II et de CD86. Que ce soit pour les CD8 XS, celles dérivées de la moelle osseuse ou les CL8, l'effet produit par l'introduction du gène GM-CSF est donc une meilleure capacité de présentation de l'allo-antigène (408).

De même, lors d'essais d'immunisation protectrice contre un carcinome, grâce à des CD8 modifiées avec le gène GM-CSF et pulsées avec un lysat tumoral, 20% seulement des souris immunisées ont développé une tumeur contre 100% lors de l'utilisation de CD8 non modifiées (409).

Enfin, une autre étude expérimentale chez la souris concernant le mélanome B16 a rapporté que la différence d'efficacité entre les hybrides CD8-GM-CSF/cellules B16 et ceux CD8/cellules B16 était non significative (410). Il est à noter que, dans cette expérience, les CD8 utilisées sont des CD8 spléniques connues pour être des CPAgs beaucoup moins efficaces.

En ce qui concerne **les molécules de co-stimulation**, de nombreux travaux ont été effectués avec le gène du **ligand CD40**, essentiel au signal d'activation entre les CD8 et les cellules T (voir précédemment). Ces études ont été menées pour l'essentiel par l'équipe de Kikuchi T., Moore AS et Crystal RG à partir de l'année 2000. Utilisant *le modèle murin* et le mélanome B16 entre autres, la transfection de l'ADNc du CD40L murin grâce à un adénovirus dans des CD8 issues de la moelle osseuse a permis d'observer, dans un premier temps, une augmentation des molécules de co-stimulation (CD80 (B7-1) et CD54 (ICAM-1) par exemple) sur les CD8 modifiées. De plus, la stimulation du récepteur CD40 par le CD40L va induire la sécrétion par les CD8 d'IL-12 à l'origine du développement des cellules T CD4⁺ et de leur maturation, et de MIP-1 α responsable de la migration des cellules T CD8⁺.

Concrètement, le traitement de souris malades à l'aide de ces CD8 modifiées a été à l'origine d'une inhibition significative de la croissance tumorale. De plus, l'activité CTL anti-tumorale obtenue était aussi associée à un effet thérapeutique dans le cas de métastases.

Enfin, il a été observé que l'expression du CD40L sur les CD8 les protégeait de l'apoptose spontanée induite par la liaison Fas/FasL et des effets inhibiteurs de cytokines inflammatoires telles IL-10 (411) (412) (413).

Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'immunisation de souris avec des CD8 transfectées simultanément avec les gènes du CD40L et d'un idiotype spécifique du lymphome murin à cellules B (414).

D'autres expériences plus récentes ont reporté l'intérêt de l'utilisation des molécules de co-stimulation **CD80** (B7-1), **ICAM-1** (CD54), et **LFA-3** (CD58) afin d'augmenter la capacité des CD8 à activer les LT.

Transfectés simultanément dans les CD8 sous forme de triade (TRICOM = TRIad of CO-stimulatory Molecules), ces trois gènes permettent en effet une meilleure stimulation des cellules T par les CD8 (415) (416).

Enfin, d'autres molécules ont été aussi utilisées de façon intéressante. C'est le cas de la **lymphotactine XCL1**, facteur chimiotactique, dont le gène a été introduit dans des CD pulsés avec le peptide Mut-1 ce qui a engendré une immunité plus efficace contre le carcinome pulmonaire de Lewis ainsi que lors de l'étude du mélanome B16 (417) (418).

De même, des CD modifiées avec le gène de la **chimiokine SLC/CCL21** puis injectées en intra-tumoral ont favorisé le recrutement des LT et augmenté ainsi la réponse anti-tumorale (419). Une étude comparative a récemment démontré la supériorité de la chimiokine CCL21 par rapport à la lymphotactine à induire une immunité anti-tumorale protectrice (420).

On peut aussi parler de la **protéine Bcl-XL**, appartenant à la famille des protéines Bcl-2 connues pour leurs propriétés anti-apoptotiques. L'intérêt de cette protéine est apparu lors d'études expérimentales sur le cancer de la prostate. En effet, les chercheurs se sont aperçus, dans un premier temps, que ce cancer était à l'origine de l'apoptose des CD ce qui empêchait le développement d'une réponse immunitaire spécifique anti-tumorale. Dans un deuxième temps, ils ont relaté que l'augmentation de la survie des CD lors de modification génétique par des gènes de cytokines (IL-12) était accompagnée d'une augmentation de l'expression de cette molécule Bcl-XL. En fait, cette protéine protège les cellules de l'apoptose par le NO (monoxyde d'azote) et inhibe la mort cellulaire provoquée par la liaison Fas/FasL entre les cellules tumorales et les CD. Ainsi, le traitement de souris atteintes d'un cancer de la prostate avec des CD transfectées a conduit à une inhibition significative de la croissance tumorale (421).

Le cancer de la prostate étant aujourd'hui le cancer le plus fréquent chez l'Homme, la deuxième cause de mort parmi les cancers humains et restant un cancer chimio résistant, ces résultats représentent un réel espoir de traitement efficace dans ce cas et peut-être bien dans d'autres.

En résumé, si l'immunothérapie anticancéreuse basée sur l'utilisation des CD représente un nouvel espoir pour le traitement des patients cancéreux, les CD modifiées génétiquement *in vitro* avant la vaccination semblent les plus prometteuses.

Ceci est d'autant plus vrai dans les essais cliniques utilisant des CD « doublement modifiées » avec, d'un côté un gène codant pour une molécule immuno-stimulatrice ou de co-stimulation, et de l'autre un ou plusieurs gènes codant pour des Ags tumoraux (transduction par des vecteurs viraux ou formation d'hybrides après transfection des CD).

Ces techniques de potentialisation des CD sont d'autant plus intéressantes car elles sont simples, peu coûteuses, ne nécessitent que peu de matériel et permettent l'application des essais thérapeutiques dans le cas de micro tumeurs difficiles à prélever, grâce aux nouvelles méthodes de microdissection et d'amplification génique par PCR.

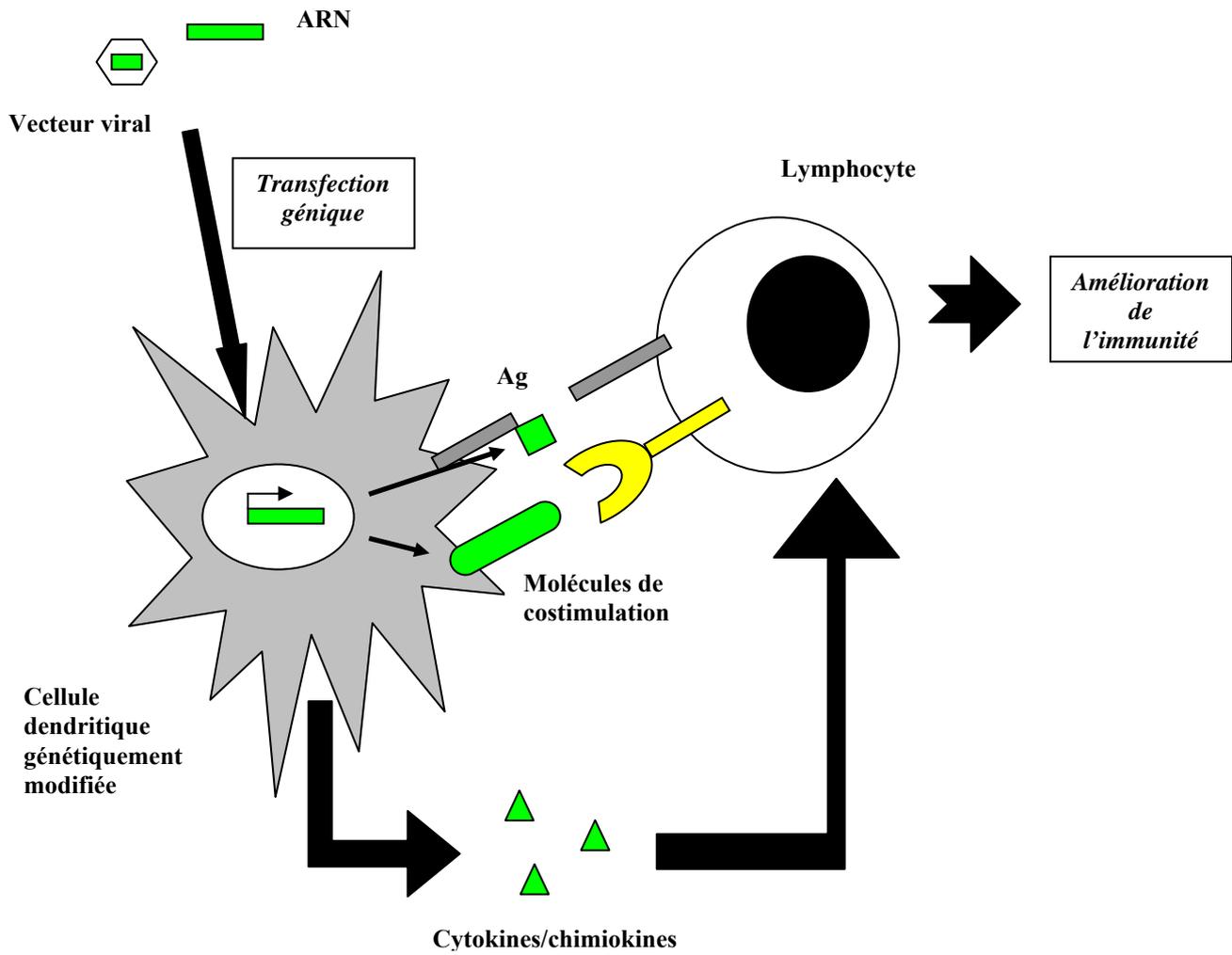


Schéma 9. Différentes possibilités de modification génique des cellules dendritiques améliorant leur capacité immuno-stimulatrice.

4. Voies d'administration et doses vaccinales

Si la question de la dose et de la fréquence vaccinales optimales reste encore aujourd'hui un problème, celle de **la voie d'administration** a été plus sérieusement étudiée.

In vivo, l'habilité des CD4 à migrer hors des vaisseaux sanguins, à travers les tissus, puis dans la circulation lymphatique afférente vers les organes lymphoïdes secondaires, est indissociable d'une expression régulée de différentes molécules d'adhésion et de récepteurs sur les CD4 et dans les tissus concernés.

La *première question* fut de savoir si celle des CD4 générées *in vitro* était la même. Or, la préparation des CD4 *in vitro* reste un stade primordial dans la vaccination puisque leur phénotype et surtout leur stade de maturation vont influencer à la fois leur capacité migratoire et celle d'immuno-stimulation *in vivo*.

Les avis sur ce sujet sont encore partagés. Certains auteurs supportent l'idée que l'utilisation de CD4 immatures aux propriétés migratoires supérieures permettrait une meilleure présentation de l'Ag aux nœuds lymphatiques périphériques tandis que d'autres préfèrent favoriser l'utilisation de CD4 matures aux capacités immuno-stimulatrices bien plus importantes.

Le problème de la capacité des CD4 immatures générées *in vitro* à murer naturellement *in vivo* après réinjection a été résolu grâce à l'utilisation de facteurs de maturation (voir précédemment).

De même, l'injection pré-vaccinale de facteurs inflammatoires permet d'améliorer la migration des CD4 vers les nœuds lymphatiques en augmentant localement les ligands du récepteur CCR7, MCP-3 et SLC (422).

La *deuxième question* fut de savoir si la voie d'administration des CD4 générées *in vitro* avait une influence quelconque sur le niveau de stimulation de l'immunité et sur la nature des réponses immunes induites.

Dans ce sens, de nombreux tests comparatifs sur les capacités migratoire et d'immuno-stimulation des CD4, injectées suivant différentes voies d'administration, ont été réalisés à partir des années 90s.

Ainsi, il apparaît qu'après injection de CD4 marquées à l'indium-111 chez *des souris* atteintes de mélanome B16, la voie intraveineuse (IV) aboutit à une accumulation de la radioactivité dans les organes richement capillarisés (foie, rate et reins) et que la voie sous-cutanée (SC) permet une accumulation des CD4 dans les aires à cellules T des NL drainants (423).

De même, une étude comparative utilisant aussi des CD4 marquées à l'oxyquinoline induim-111 entre les voies veineuse, sous-cutanée et intradermique a montré que les CD4 injectées en IV se localisent très vite dans les poumons pour être ensuite redistribuées au foie, à la rate et à la moelle osseuse mais sont indétectables dans les NL et les tumeurs. Par contre, lors d'injection intradermique (ID) un faible pourcentage (de 0.1 à 0.4%) de CD4 migre rapidement dans les NL régionaux (424).

D'autres études ont alors permis de définir quelle voie d'administration permettait une meilleure immunité anti-tumorale. Ainsi, la vaccination (par voie IV, ID ou intra-lymphatique (IL)) à l'aide de CDs pulsées de 21 patients répartis en 3 groupes, et atteints d'un cancer métastatique de la prostate, a engendré des réponses immunes à cellules T spécifiques chez tous les patients.

Par contre, l'induction d'une production d'IFN- γ n'est survenue qu'après injection ID ou IL alors que la production d'AcS spécifiques a été plus importante chez les patients immunisés par voie IV (425).

De même, une autre équipe a démontré que l'injection SC de CDs pulsées permettait une meilleure protection contre la croissance tumorale que la voie IV grâce à l'induction de cellules T CD8+ mémoires dans la rate et les NL (426).

En résumé, l'initiation d'une réponse immune à cellules T est possible par n'importe quelle voie d'administration. Par contre, la qualité de cette réponse est intimement liée à cette voie. Ainsi, la vaccination ID génère plutôt une forte réponse de type Th1 alors que celle IV favorise une réponse de type Th2 (427) (428) moins efficace contre les processus tumoraux.

Malgré les bons résultats obtenus après vaccination par voie ID (429), les chercheurs ont testé de nouvelles voies d'administration afin de résoudre **le problème du temps de maintien des capacités immuno-stimulatrices des CDs au cours de leur migration** entre le site d'injection et les organes lymphoïdes secondaires. En effet, la génération d'une immunité anti-tumorale efficace, c'est-à-dire cytotoxique et mémoire, n'est possible que si l'Ag est présenté aux cellules T pendant un temps suffisant. Or, on a vu précédemment que le temps de vie des complexes CMH/peptide est court.

Comparée à la voie intraveineuse, les injections intradermiques en des sites proches des NL drainants ont permis d'améliorer ce problème. Les voies intra-lymphatique (430) et intra-tumorale (431) ont obtenu aussi de meilleurs résultats que celle intra-veineuse mais c'est la voie intra-nodale qui aujourd'hui encore présente le plus d'intérêt car elle permet d'éliminer totalement le problème du temps de migration des CDs.

C'est l'équipe de Nestle en 1998 qui a, pour la première fois, réalisé une vaccination de patients atteints d'un mélanome par injection intra-nodale de CDs (291) avec, chez certains, une régression tumorale.

Plus récemment, des résultats intéressants ont été aussi obtenus chez des patients atteints d'un lymphome à cellules T après injection intra-nodale de CDs autologues pulsées avec un lysat de cellules tumorales (318).

Enfin, une étude comparative a permis de confirmer **la supériorité de la voie intra-nodale** par rapport à celles intra-veineuse et intra-dermique à stimuler les cellules T (432).

VACCINATION INTRATUMORALE	
<i>Avantages</i>	<i>Inconvénients</i>
Pas besoin d'identification des Ags ou du CMH	Accessibilité limitée des tumeurs
Possibilité de manipuler l'environnement	Environnement tumoral tolérogénique
Identification du site tumoral pour les cellules effectrices	Excision tumorale retardée

***Tableau 2.** Avantages et inconvénients de l'immunothérapie intratumorale.*

En ce qui concerne **la dose et la fréquence vaccinales**, les protocoles utilisés dans les différents essais cliniques se sont basés sur les résultats obtenus lors de vaccinations anti-infectieuses.

De plus, chez *un modèle murin*, une simple immunisation par voie sous-cutanée a provoqué un retard négligeable de la croissance tumorale alors que des immunisations répétées à 2-5 jours d'intervalle pendant 3 semaines ont permis d'empêcher la croissance tumorale de la majorité des lésions, voire même leur disparition complète (433). Ce fait s'explique par la nécessité d'une présence prolongée de l'Ag dans les organes lymphoïdes secondaires afin d'abord d'obtenir une expression maximale des CTLs puis de les maintenir sur un long terme.

Cette obligation de présence, estimée au moins de 7 à 14 jours, à favoriser les protocoles vaccinaux basés sur des injections répétitives.

Ainsi, la majorité des essais thérapeutiques sont réalisés avec des protocoles de vaccination utilisant, soit au minimum 2 injections administrées à 1 ou 2 semaines d'intervalle suivies de rappels mensuels, soit plusieurs injections à 1 mois d'intervalle.

En résumé, il semble aujourd'hui acquis que **la voie d'administration intra-nodale** semble la plus intéressante et la plus prometteuse pour obtenir une réponse immune anti-tumorale efficace, en éliminant ainsi le problème de l'affaiblissement des capacités immuno-stimulatrices des CD4 au cours de leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires.

De même, les meilleures méthodes de vaccination semblent privilégier **les injections répétées** de CD4 à 4-7 ou 14 jours d'intervalle pour maintenir au niveau des organes lymphoïdes secondaires une pression antigénique sur une période suffisante pour développer **une immunité mémoire**.

De nombreux essais expérimentaux restent pourtant encore nécessaires afin de mettre en place des protocoles stricts certifiés, pouvant être utilisés lors d'essais cliniques thérapeutiques de façon optimale pour chaque type de cancer.

III. Discussion

Les succès initiaux de l'immunothérapie anticancéreuse rencontrés chez les modèles animaux et utilisant les CD4 ont été à l'origine d'un optimisme considérable concernant la thérapie des cancers humains.

Pourtant, les essais cliniques chez l'Homme, initiés dès la moitié des années 90s, ont rapidement réfréné cet enthousiasme à cause du faible nombre des résultats thérapeutiques réellement bénéfiques obtenus associé à un lot non négligeable d'effets secondaires indésirables (phénomènes d'hypersensibilité, de tolérance et d'auto-immunité).

Pour expliquer ces échecs et essayer de les surmonter, plusieurs raisons ont été évoquées.

La *première* est **le manque de corrélation** existant entre les modèles animaux et les patients cancéreux. En effet, chez les premiers, les cancers traités sont issus de cellules malignes transplantées et la croissance des tumeurs issues de celles-ci se fait la plupart du temps en quelques jours voire quelques semaines alors qu'il faut parfois plusieurs années pour qu'une même tumeur se développe naturellement chez l'Homme.

La *deuxième* raison est directement liée au fait que **les espoirs misés sur cette immunothérapie** ont été mal définis. En effet, le but des essais cliniques a été surtout d'augmenter le pourcentage de survie des patients cancéreux soit en obtenant une éradication complète de la maladie soit en retardant sa progression (éviter l'apparition de nouveaux nodules cancéreux) mais aussi, de prévenir ou de retarder le développement de cancers chez les patients précancéreux (thérapie préventive).

Or, dans le premier cas, les patients traités étaient tous à un stade avancé de leur maladie à l'origine souvent d'un état immunodépressif (action des prétraitements de chimio- ou de radiothérapie et de l'interleukine tumorale IL-10) et ne permettant pas des traitements à long terme (durée de survie des patients courte).

Enfin, dans le deuxième cas, les thérapies chez les précancéreux ou les patients à un stade précoce de leur maladie n'ont pas encore été autorisées à cause du risque des effets secondaires cités précédemment.

La *troisième* raison invoquée, et pas la moindre, est **le manque d'homogénéité et de fiabilité des cultures de CD**s utilisées lors des vaccinations lié à une absence de systématisation et de contrôle des protocoles, et ce, à tous les niveaux.

En effet, si la génération *ex vivo*, en grande quantité, de CD humaines à partir de progéniteurs hématopoïétiques CD34+ ou de monocytes sanguins est aujourd'hui bien maîtrisée, **le stade de maturation** de ces cellules utilisées dans les vaccinations reste le point le plus sensible des protocoles car il est reconnu comme déterminant dans leur immunogénicité.

L'ensemble des équipes de chercheurs est d'accord sur le fait que l'utilisation de CD issues de précurseurs (prélevés dans le sang ou la moelle du patient cancéreux) et maturées *ex vivo* est préférable lors des essais thérapeutiques car elles semblent plus immunogènes que celles utilisées à un stade immature et elles diminuent les risques de tolérance.

Ainsi, plusieurs protocoles de maturation *ex vivo* des CD humaines sont aujourd'hui établis avec une combinaison de cytokines (TNF, IL-1 β , IL-6 et PGE2 pour le MCM (monocyte conditioned media) ou TNF, IL-1 β , POLYI:C, IFN- α et IFN- γ pour le méga cocktail) et de ligands aux TLRs.

Enfin, plus récemment, des protocoles de maturation rapide des CD sur 2 jours au lieu de 7-9 jours ont été testés avec succès.

L'autre point sensible de ces protocoles est **le choix de l'antigène** car il est aussi déterminant dans l'immunogénicité des CD que dans le type de réponse immune obtenue (importance d'une réponse à la fois à cellules T CD8+ et CD4+ pour un meilleur résultat clinique).

L'utilisation d'une source génique endogène semble être la méthode la plus satisfaisante à ce jour. En effet, les CD transfectées sont facilement contrôlables et permettent la présentation de nombreux antigènes tumoraux dont les plus immunogènes, à la fois par la voie du CMH I et celle du CMH II (après mise en place d'un signal sur l'extrémité carboxyl de l'ARNm), et ce de façon plus persistante qu'avec de simples peptides.

En résumé, si la rareté des résultats cliniques obtenus à ce jour chez l'Homme lors des essais d'immunothérapie anticancéreuse à base de CD a largement contribué à diminuer l'optimisme des chercheurs sur l'existence d'un traitement anticancéreux miraculeux, elle a permis par ailleurs à ces mêmes équipes de chercher, d'un côté à améliorer les protocoles existants (patients traités immunocompétents et à un stade plus précoce de leur maladie, conservation optimale des CD par cryopréservation, maturation des CD *ex vivo* et source antigénique endogène) et de l'autre à élaborer de nouvelles stratégies vaccinales. Ainsi, les nouveaux protocoles de vaccination utilisant les CD s'associent de plus en plus souvent à **des traitements adjuvants**, administrés de façon concomitante ou non et qui se composent par exemple des cytokines IL-2 ou IL-12, de toxines bactériennes et leurs dérivés ou encore tout dernièrement du composé glycosylcéramide KRN7000 isolé d'une éponge océanique (434).

CONCLUSION

CONCLUSION

Les cellules dendritiques, décrites chez l'Homme dès 1868 par Langerhans, sont des cellules jouant un rôle essentiel dans le système immunitaire. Véritables sentinelles positionnées dans les épithéliums, elles sont à l'origine de l'initiation des réactions immunes de l'organisme grâce à leur capacité à capturer un corps étranger, à le transformer puis à le présenter afin qu'il soit reconnaissable par les lymphocytes T de l'immunité.

La connaissance approfondie de leur mode d'action dès les années 70s puis le développement des techniques de production de ces cellules à partir de progéniteurs fin des années 80s a permis d'envisager avec optimisme leur utilisation en immunothérapie. Plus particulièrement, leur capacité à reconnaître puis à présenter au système immunitaire des Ags tumoraux en ont fait ses dernières années les outils d'une nouvelle immunothérapie anticancéreuse.

Pourtant, le faible nombre de résultats thérapeutiques probants obtenu lors des récents essais cliniques chez l'Homme a remis en question l'utilisation de ces cellules. En effet, à ce stade précoce du développement clinique, aucune indication ou évidence n'a permis de confirmer la supériorité des vaccins à base de CDs par rapport aux autres stratégies vaccinales ainsi qu'aux autres traitements anticancéreux. A ceci s'ajoutent un coût et une complexité d'élaboration non négligeables limitant l'avancée des recherches et déséquilibrant un peu plus la balance entre les inconvénients et le bénéfice médical réel d'une telle thérapeutique chez les patients cancéreux.

Ainsi, le rôle des CDs en tant que meilleures CPAgs a même été remis en question. Des essais cliniques *in vitro* puis *in vivo* chez la souris ont mis en évidence la capacité des cellules B à stimuler fortement une réponse à cellules T. Il est donc évident que de nombreuses études cliniques de phase III sont encore nécessaires pour évaluer correctement les avantages de l'immunothérapie anticancéreuse utilisant les CDs. Il semble aujourd'hui que cette thérapie ne soit intéressante que dans le cas de patients en état de rémission ou pour de petites tumeurs résiduelles

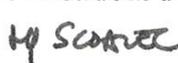
Malgré tout, la vaccination à base de CDs représente encore pour certains un traitement optionnel plein de promesses, surtout dans certains types de cancers comme ceux de la prostate ou du rein et les lymphomes pour lesquels des cas de rémission complète ou partielle ont été obtenus.

Les perspectives pour l'avenir sont donc d'approfondir encore les connaissances sur la physiologie des CDs, d'améliorer les protocoles de vaccination en standardisant chaque étape afin d'optimiser les essais cliniques de phase III, mais aussi de rechercher les meilleurs traitements adjuvants à associer à cette vaccination afin d'obtenir le meilleur résultat clinique envisageable chez les patients : la rémission.

**Le Professeur responsable
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon**


M. Mauchat

Le Président de la thèse


H. Scazzec

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le 18 DEC. 2007

Pour Le Président de l'Université
Le Président du Comité de Coordination
Des Etudes Médicales

Professeur F.N GILLY



**Vu : Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon**

Pour le Directeur et par délégation,
LA DIRECTRICE DE L'ENSEIGNEMENT


Professeur Françoise GRAIN

TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLE DES ILLUSTRATIONS

SCHEMAS

<i>Schéma 1. Différentes voies de production de cellules dendritiques à partir des progéniteurs CD34+ de la moelle osseuse.....</i>	19
<i>Schéma 2. Activation du système des cellules dendritiques lors d'une agression de l'organisme (infectieuse, virale ou tumorale).....</i>	29
<i>Schéma 3. Expression et rôle de différents récepteurs Fc et du complément sur les cellules dendritiques humaines.....</i>	42
<i>Schéma 4. Différentes voies de présentation de l'Ag aux cellules effectrices par les cellules dendritiques.....</i>	45
<i>Schéma 5. Interaction cellule dendritique/lymphocyte T : absence du second signal.....</i>	50
<i>Schéma 6. Interaction cellule dendritique/lymphocyte T : présence du second signal.....</i>	53
<i>Schéma 7. Différentes méthodes d'identification des antigènes associés à la tumeur.....</i>	74
<i>Schéma 8. Différentes sources d'antigène tumoral pour la potentialisation des cellules dendritiques.....</i>	90
<i>Schéma 9. Différentes possibilités de modification génique des cellules dendritiques améliorant leur capacité immuno-stimulatrice.....</i>	94

PHOTOS

<i>Photo 1. Granule de Birbeck : suspension de cellules épidermiques de chat, microscopie électronique à transmission.....</i>	30
<i>Photo 2. Cellule dendritique épidermique : épiderme de chien, fixation formol, inclusion en paraffine, marquage Ac BLA 36.....</i>	37
<i>Photo 3. Cellules dendritiques épidermiques : feuillet d'épiderme de chat, marquage CD1a.....</i>	37
<i>Photo 4. Cellules dendritiques périvasculaires : peau de chien, coupe en congélation, marquage Ac anti-CMH II.....</i>	38
<i>Photo 5. Cellules dendritiques interdigitées : nœud lymphatique de chat, fixation formol, inclusion en paraffine, zone paracorticale, marquage Ac anti-DC Lamp.....</i>	38
<i>Photo 6. Cellules dendritiques spléniques : rate de chien, fixation formol, inclusion en paraffine, manchon péri-artériolaire, marquage Ac anti-DC Lamp.....</i>	39
<i>Photo 7. Cellules dendritiques : intestin grêle de chien, fixation formol, inclusion en paraffine, marquage Ac anti-BLA 36.....</i>	39

Photo 8. *Cellules dendritiques interstitielles* : DC-Lamp positives, infiltrant progressivement le massif tumoral et accompagnant les lymphocytes T CD8+ (cellules tumorales DC-Lamp négatives) (HCC : histiocytose canine).....61

TABLEAUX

Tableau 1. *Différentes méthodes de transfection génique de l'antigène dans les cellules dendritiques*.....85

Tableau 2. *Avantages et inconvénients de l'immuno-thérapie intratumorale*.....97

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- 1- **STEINMAN RM and COHN ZA.** Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*, 1973; 137: 1142-1162.
- 2- **STEINMAN RM, LUSTIG DS and COHN ZA.** Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties *in vivo*. *J Exp Med*, 1974; 139: 1431-1445.
- 3- **STEINMAN RM, KAPLAN G, WITMER MD and COHN ZA.** Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance *in vitro*. *J Exp Med*, 1979; 149: 1-16.
- 4- **STEINMAN RM, GUTCHINOV B, WITMER MD and NUSSENZWEIG MC.** Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *J Exp Med*, 1983; 157: 613-627.
- 5- **MOSIER DE.** A requirement for two cell types for antibody formation *in vitro*. *Science* 1967;158: 1573-1573.
- 6- **CHESNUT RW and GREY HM.** Studies on the capacity of B cells to serve as antigen-presenting cells. *J Immunol*, 1981; 126: 1075-1079.
- 7- **INABA K, STEINMAN RM, VAN VOORHIS WC and MURAMATSU S.** Dendritic cells are critical accessory cells for thymus-dependent antibody responses in mouse and in man. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 1983; 80: 6041-6045.
- 8- **STEINMAN RM.** The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*, 1991; 9: 271-296.
- 9- **AUSTYN JM.** Antigen-presenting cells. Experimental and clinical studies of dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: S146-150.
- 10- **LEVINE TP and CHAIN BM.** Endocytosis by antigen presenting cells: dendritic cells are as endocytically active as other antigen presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 1992; 89: 8342-8346.
- 11- **KATZ SI, TAMAKI K and SACHS DH.** Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature*, 1979; 282: 324-326.
- 12- **BARCLAY AN and MAYRHOFER G.** Bone marrow origin of Ia-positive cells in the medulla rat thymus. *J Exp Med*, 1981; 153: 1666-1671.
- 13- **MAYRHOFER G, PUGH CW and BARCLAY AN.** The distribution, ontogeny and origin in the rat of Ia-positive cells with dendritic morphology and of Ia antigen in epithelia, with special reference to the intestine. *Eur J Immunol* 1983; 13: 112-122.
- 14- **HART DNJ.** Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; 90: 3245-3287.

- 15- WU L, SCOLLAY R, EGERTON M, PEARSE M, SPANGRUDE GJ and SHORTMAN K.** CD4 expressed on earliest T lineage precursor cells in the adult murine thymus. *Nature* 1991; 349: 71-74.
- 16- ARDAVIN C, WU L, LI CL and SHORTMAN K.** Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 1993; 362: 761-763.
- 17- WU L, LI CL and SHORTMAN K.** Thymic dendritic cell precursor: relationship to the lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J Exp Med* 1996; 184: 903-911.
- 18- LUCAS K, VREMEC D, WU L and SHORTMAN K.** A linkage between dendritic cell and T-cell development in the mouse thymus: the capacity of sequential T-cell precursors to form dendritic cells in culture. *Dev Comp Immunol* 1998; 22: 339-349.
- 19- KONDO M, WEISSMAN IL and AKASHI K.** Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997; 91: 661-672.
- 20- AKASHI K, TRAVER D, MIYAMOTO T and WEISSMAN IL.** A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 2000; 404: 193-197.
- 21- TRAVER D, AKASHI K, MANZ M, MERAD M, MIYAMOTO T, ENGLEMAN EG and WEISSMAN IL.** Development of CD8 α -positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 2000; 290: 2152-2154.
- 22- YOUNG JW, SZABOLCS P and MOORE MAS.** Identification of dendritic cell colony forming units among normal human CD34⁺ bone marrow progenitors that are expanded by c-kit ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage/colony stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1995; 182: 1111-1120.
- 23- CAUX C, VANBERVLIET B, MASSACRIER C, DEZUTTER-DAMDUYANT C, de SAINT-VIS B, JACQUET C, YONEDA K, IMAMURA S, SCHMITT D and BANCHEREAU J.** CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF + TNF-alpha. *J Exp Med* 1996; 184: 695-706.
- 24- GALY AH, CEN D, TRAVIS M, CHEN S and CHEN BP.** Delineation of T-progenitor cell activity within the CD34⁺ compartment of adult bone marrow. *Blood* 1995; 85: 2770-2778.
- 25- CANQUE B, CAMUS S, DALLOUL A, KAHN E, YAGELLO M, DEZUTTER-DAMBUYANT C, SCHMITT D, SCHMITT C and GLUCKMAN JC.** Characterization of dendritic cell differentiation pathways from cord blood CD34⁺ CD7⁺ CD45RA⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2000; 96: 3748-3755.
- 26- STRUNK D, EGGER C, LEITNER G, HANAU D and STINGL G.** A skin homing molecule defines the Langerhans cell progenitor in human peripheral blood. *J Exp Med* 1997; 185: 1131-1136.
- 27- GALY AHM, TRAVIS M, CEN D and CHEN B.** Human T, B, natural killer and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 1995b; 3: 459-473.

- 28- RES PC, MARTINEZ-CACERES E, CRISTINA JALECO A, STAAL F, NOTEBOOM E, WEIJER K and SPITS H.** CD34⁺ CD38^{dim} cells in human thymus can differentiate into T, natural killer and dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells. *Blood* 1996; 87: 5196-5206.
- 29- RES PC, COUWENBERG F, VYTH-DREESE FA and SPITS H.** Expression of pT alpha mRNA in a committed dendritic cell precursor in the human thymus. *Blood* 1999; 94; 2647-2657.
- 30- GEORGOPOULOS K, BIGBY M, WANG JH, MOLNAR A, WU P, WINANDY S and SHARPE A.** The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineage. *Cell* 1994; 79: 143-156.
- 31- WARGNIER A, LEGROS-MAIDA S, BOSSELUT R, BOURGE JF, LAFAURIE C, GHYSDAEL CJ, SASPORTES M and PAUL P.** Identification of human granzyme B promoter regulatory elements interacting with activated T-cell specific proteins: implication of IKAROS and CBF binding sites in promoter activation. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1995; 92: 6930-6934.
- 32- BABICHUK CK, DUGGAN BL and BLEACKLEY RC.** In vivo regulation of murine granzyme B gene transcription in activated primary T cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 16485-16493.
- 33- MOLNAR A, WU P, LARGESPADA DA, VORTKAMP A, SCHERER S, COPELAND NG, JENKINS NA, BRUNS G and GEORGOPOULOS K.** The Ikaros gene encodes a family of lymphocyte-restricted zinc finger DNA binding proteins, highly conserved in human and mouse. *J Immunol* 1996; 156: 585-592.
- 34- GALY AHM, MOREL F, HILL B and CHEN BP.** Hematopoietic progenitor cells of lymphocytes and dendritic cells. *J Immunother* 1998; 21: 132-141.
- 35- SUN L, LIU A and GEORGOPOULOS K.** Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development . *Embo J* 1996; 15: 5358-5369.
- 36- GALY AHM, CHRISTOPHERSON I, FERLAZZO G, LIU G, SPITS H and GEORGOPOULOS K.** Distinct signals control the hematopoiesis of lymphoid-related dendritic cells . *Blood* 2000; 95: 128-137.
- 37- NEUMANN M, FRIES H, SCHEICHER C, KEIKAVOUSSI P, KOLB-MÄURER A, BRÖCKER E, SERFLING E and KÄMPGEN E.** Differential expression of Rel/NF-kappaB and octamer factors is a hallmark of the generation and maturation of dendritic cells. *Blood* 2000; 95: 277-285.
- 38- WU L, D'AMICO A, WINKEL KD, SUTER M, LO D and SHORTMAN K.** RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha⁻ dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha⁺ dendritic cells. *Immunity* 1998; 9: 839-847.
- 39- ANDERSON KL, SMITH KA, CONNERS K, McKERCHER SR, MAKI RA and TORBETT BE.** Myeloid development is selectively disrupted in PU.1 null mice. *Blood* 1998; 91: 3702-3710.
- 40- PUGH CW.** The role of the macrophage in the immune response. Ph D Thesis, University Of Oxford 1981.

- 41- PUGH CW, MACPHERSON GG and STEER HW.** Characterization of non lymphoid cells derived from rat peripheral lymph. *J Exp Med* 1983; 158: 1522-1536.
- 42- CHEN HD, MA CL, YUAN JT, WANG YK and SILVERS NK.** Occurrence of donor Langerhans cells in mouse and rat chimeras and their replacement in skin grafts. *J Invest Dermatol* 1986; 86: 630-633.
- 43- KELLY RH.** Localization of afferent lymph cells within the draining node during a primary immune response. *Nature* 1970; 227: 510-513.
- 44- FOSSUM S.** The architecture of rat lymph nodes. II. Lymph node compartments. *Scand J Immunol* 1980; 12: 411-420.
- 45- BANCHEREAU J and STEINMAN RM.** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252.
- 46- AUSTYN JM and LARSEN CP.** Migration patterns of dendritic leukocytes. Implication for transplantation. *Transplantation* 1990; 49: 1-7.
- 47- GROUARD G, RISSOAN MC, FILGUEIRA L, DURAND I, BANCHEREAU J and LIU YJ.** The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin IL-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997; 185: 1101-1111.
- 48- D'AMICO G, BIANCHI G, BERNASCONI S, BERSANI L, PIEMONTE L, SOZZANI S, MANTOVANI A and ALLAVENA P.** Adhesion, transendothelial migration, and reserve transmigration of *in vitro* cultured dendritic cells. *Blood* 1998; 92: 207-214.
- 49- UDEY MC.** Cadherins and Langerhans cell immunobiology. *Clin Exp Immunol* 1997; 107: 6-8.
- 50- LIN CL, SUTI RM, RAHDON RA53- CHARBONNIER AS, KOHRGRUBER N, KRIEHLER E, STINGL G, ROT A and MAURER D.** Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. *Eur J Immunol* 1998; 28: 4114-4122.
- 51- CHARBONNIER AS, KOHRGRUBER N, KRIEHLER E, STINGL G, ROT A and MAURER D.** Macrophage inflammatory protein 3alpha is involved in the constitutive trafficking of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 1999; 190: 1755-1767.
- 52- SOZZANI S, ALLAVENA P, VECCHI A and MANTOVANI A.** The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 1-9.
- 53- AYEHNIE S, GARCIA-ZEPEDA EA, HOXIE JA, HORUK R, KUPPER TS, LUSTER AD and RUPRECHT RM.** Human immunodeficiency virus-1 entry into purified blood dendritic cells through CC and CXC chemokine coreceptors. *Blood* 1997; 90: 1379-1386.
- 54- GRANELLI-PIPERNO A, MOSER B, POPE M, CHEN DL, WEI Y, ISDELL F, O'DOHERTY U, PAXTON W, KOUP R, MOJSOV S, BHARDWAJ N, CLARKLEWIS I, BAGGIOLINI M and STEINMAN RM.** Efficient interaction of HIV-1 with purified dendritic cells via multiple chemokine coreceptors. *J Exp Med* 1996; 184: 2433-2438.

- 55- HOEFSMIT EC, DUIJVESTIJN AM and KAMPERDIJK EW.** Relation between Langerhans cells, veiled cells, and interdigitating cells. *Immunobiology* 1982; 161: 255-265.
- 56- LARSEN CP, STEINMAN RM, WITMER-PACK M, HANKINS DF, MORRIS PJ and AUSTYN JM.** Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med* 1990; 172: 1483-1493.
- 57- MACATONIA SE, KNIGHT SC, EDWARDS AJ, GRIFFITH S and FRYER P.** Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *J Exp Med* 1987; 166: 1654-1667.
- 58- ENK AH and KATZ SI.** Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1398-1402.
- 59- WANG B, FUJISAWA H, ZHUANG L, KONDO S, SHIVJI GM, KIM CS, MAK TW and SAUDER DN.** Depressed Langerhans cell migration and reduced contact hypersensitivity response in mice lacking TNF receptor p75. *J Immunol* 1997; 159 : 6148-6155.
- 60- CUMBERBATCH M and KIMBER I.** Dermal tumor necrosis factor-alpha induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans cell migration. *Immunol* 1992; 75: 257-263.
- 61- TAKAYAMA K, YOKOZEKI H, GHOREISHI M, SATOH T, KATAYAMA I, UMEDA T and NISHIOKA K.** Il-4 inhibits the migration of human Langerhans cells through the down-regulation of the TNF receptor II expression. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 541-546.
- 62- WANG B, ZHUANG L, FUJISAWA H, SHINDER GA, FELICIANI C, SHIVJI GM, SUZUKI H, AMERIO P, TOTO P and SAUDER DN.** Enhanced epidermal Langerhans cell migration in IL-10 knockout mice. *J Immunol* 1999; 162: 277-283.
- 63- MOODYCLIFFE AM, SHREEDHAR V, ULLRICH SE, WALTERSCHEID J, BUCANA C, KRIPKE ML and FLORES-ROMO L.** CD40-CD40 ligand interactions *in vivo* regulate migration of antigen-bearing dendritic cells from the skin to draining lymph nodes. *J Exp Med* 2000; 191: 2011-2020.
- 64- ROAKE JA, RAO AS, LARSEN CP, HANKINS DF and AUSTYN JM.** Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor and interleukin 1. *J Exp Med* 1995; 181: 2237-2247.
- 65- SOZZANI S, LUINI W, BORSATTI A, POLENTARUTTI N, ZHOU D, PIEMONTE L, D'AMICO G, POWER CA, WELLS TN, GOBBI M, ALLAVENA P and MANTOVANI A.** Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. *J Immunol* 1997b; 159: 1993-2000.
- 66- FOTI M, GRANUCCI D, AGGUJARO D, LUINI W, MINARDI S, MANTOVANI A, SOZZANI S and RICCIARDI-CASTAGNOLI P.** Upon dendritic cell activation chemokines and chemokine receptor expression are rapidly regulated for recruitment and maintenance of dendritic cells at the inflammatory site. *Int Immunol* 1999; 11: 979-986.

- 67- SOZZANI S, ALLAVENA P, D'AMICO G, LUINI W, BIANCHI G, KATAURA M, IMAI T, YOSHIE O, BENECCHI R and MANTOVANI A.** Cutting edge: Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: A model for their trafficking properties. *J Immunol* 1998; 161: 1083-1086.
- 68- SALLUSTO F, SCHAERLI P, LOETSCHER M, SCHANIEL C, LENIG D, MACKAY CR, QIN S and LANZAVECCHIA A.** Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2760-2769.
- 69- SALLUSTO F, PALERMO B, LENIG D, MIETTINEN M, MATIKAINEN S, JULKUNEN I, FORSTER R, BURGSTAHLER R, LIPP M and LANZAVECCHIA A.** Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol* 1999; 29: 1617-1625.
- 70- WILLIMANN K, LEGLER DF, LOETSCHER P, STUBER ROOS R, DELGADO MB, CLARK-LEWIS I, BAGGIOLINI M and MOSER B.** The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2025-2034.
- 71- GUNN MD, KYUWA S, TAM C, KAKIUCHI T, MATSUZAWA A, WILLIAMS LT and NAKANO H.** Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* 1999; 189: 451-460.
- 72- HART DNJ and FABRE JW.** Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J Exp Med* 1981; 153: 347-361.
- 73- HART DNJ and McKENZIE JL.** Interstitial dendritic cells. *Intern Rev Immunol* 1990; 6: 127-138.
- 74- LANGERHANS P.** Uber die nerven des menschlichen haut. *Virchows Arch Path Anat* 1868; 44: 325-337.
- 75- BIRBECK MS, BREATHNACH AS and EVERALL JD.** An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol* 1961; 37: 51-64.
- 76- ROMANI N, STINGL G, TSCHACHLER E, WITMER MD, STEINMAN RM, SHEVACH EM and SCHULER G.** The Thy-1-bearing cell of murine epidermis. A distinctive leukocyte perhaps related to natural killer cells. *J Exp Med* 1985; 161: 1368-1383.
- 77- IBRAHIM MA, CHAIN BM and KATZ DR.** The injured cell: the role of the dendritic cell system as a sentinel receptor pathway. *Immunol Today* 1995; 16: 181-186.
- 78- GONG JL, McCARTHY KM, TELFORD J, TAMATANI T, MIYASAKA M and SCHNEEBERGER EE.** Intraepithelial airway dendritic cells: a distinct subset of pulmonary dendritic cells obtained by microdissection. *J Exp Med* 1992; 175: 797-807.
- 79- SCHON-HEGRAD MA, OLIVER J, McMENAMIN PG and HOLT PG.** Studies on the density, distribution, and surface phenotype of intraepithelial class II major histocompatibility complex antigen (Ia)-bearing dendritic cells (DC) in the conducting airways. *J Exp Med* 1991; 173: 1345-1356.

- 80- AUSTYN JM, HANKINS DF, LARSEN CP, MORRIS PJ, RAO A and ROAKE JA.** Isolation and characterization of dendritic cells from mouse heart and kidney. *J Immunol* 1994; 152: 2401-2410.
- 81- NESTLE FO, FILGUEIRA L, NICKOLOFF BJ and BURG G.** Human dermal dendritic cells process and present soluble protein antigens. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 762-766.
- 82- KNIGHT SC, BALFOUR BM, O'BRIEN J, BUTTIFANT L, SUMERSKA T and CLARKE J.** Role of veiled cells in lymphocyte activation. *Eur J Immunol* 1982; 12: 1057-1060.
- 83- INABA K, STEINMAN RM, WITMER-PACK M, AYA H, INABA M, SUDO T, WOLPE S and SCHULER G.** Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. *J Exp Med* 1992; 175: 1157-1167.
- 84- ROMANI N, GRUNER S, BRANG D, KAMPGEN E, LENZ A, TROCKENBACHER B, KONWALINKA GF, STEINMAN RM and SCHULER G.** Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 180: 83-93.
- 85- VREMEC D and SHORTMAN K.** Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J Immunol* 1997; 159: 565-573.
- 86- ANJUERE F, MARTIN P, FERRERRO J, FRAGA ML, del HOYO GM, WRIGHT N and ARDAVIN C.** Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. *Blood* 1999; 93: 590-598.
- 87- KELSALL BL and STROBER W.** Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *J Exp Med* 1996; 183: 237-247.
- 88- NUSSENZWEIG MC, STEINMAN RM, WITMER MD and GUTCHINOV B.** A monoclonal antibody specific for mouse dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 161-165.
- 89- JIANG W, SWIGGARD WJ, HEUFLER C, PENG M, MIRZA A, STEINMAN RM and NUSSENZWEIG MC.** The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995; 375: 151-155.
- 90- KRAAL G, BREEL M, JANSE M and BRUIN G.** Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in mouse recognized by a monoclonal antibody. *J Exp Med* 1986; 163: 981-997.
- 91- METLAY JP, WITMER-PACK MD, AGGER R, CROWLEY MT, LAWLESS D and STEINMAN RM.** The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J Exp Med* 1990; 171: 1753-1771.
- 92- BRENAN M and PUKLAVEC M.** The MRC OX-62 antigen: a useful marker in the purification of rat veiled cells with the biochemical properties of an integrin. *J Exp Med* 1992; 175: 1457-1465.
- 93- LIU L, ZHANG M, JENKINS C and MacPHERSON GG.** Dendritic cell heterogeneity in vivo: two functionally different dendritic cell populations in rat intestinal lymph can be distinguished by CD4 expression. *J Immunol* 1998; 161: 1146-1155.

- 94- PORCELLI SA and MODLIN RL.** The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 297-329.
- 95- RICHTERS CD, REITS EAJ, Van PELT AM, HOEKSTRA MJ, Van BAARE J, DU PONT JS and KAMPERDIJK EW.** Effect of low dose UVB irradiation on the migratory properties and functional capacities of human skin dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 1996; 104: 191-197.
- 96- CATTORETTI G, BERTI E and MANCUSO A.** *Leucocyte Typing III* Oxford: Oxford University Press 1987: 89-92.
- 97- HOCK BD, STARLING GC, DANIEL PB and HART DNJ.** Characterization of CMRF-44, a novel monoclonal antibody to an activation antigen expressed by the allostimulatory cells within peripheral blood, including dendritic cells. *Immunology* 1994; 83: 573-581.
- 98- HOCK BD, FEARNLEY DB, BOYCE A, McLELLAN AD, SORG RV, SUMMERS KL and HART DNJ.** Human dendritic cells express a 95 kDa activation/differentiation antigen defined by CMRF-56. *Tissue Antigens* 1999; 53: 320-334.
- 99- ZHOU LJ and TEDDER TF.** Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 1995; 154: 3821-3835.
- 100- HART DNJ and McKENZIE JL.** Isolation and characterization of human tonsil dendritic cells. *J Exp Med* 1988; 168: 157-170.
- 101- de SAINT-VIS B, VINCENT J, VANDENABEELE S, VANBERVLIET B, PIN JJ, AÏT-YAHIA S, PATEL S, MATTEI MG, BANCHEREAU J, ZURAWSKI S, DAVOUST J, CAUX C and LEBECQUE S.** A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* 1998; 9: 325-336.
- 102- EGNER W, McKENZIE JL, SMITH SM, BEARD MEJ and HART DNJ.** Identification of potent mixed leukocyte reaction-stimulatory cells in human bone marrow. Putative differentiation stage of human blood dendritic cells. *J Immunol* 1993c; 150: 3043-3052.
- 103- STRUNK D, RAPPERSBERGER K, EGGER C, STROBL H, KRÖMER E, ELBE A, MAURER D and STINGL G.** Generation of human dendritic cells/Langerhans cells from circulating CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996; 87: 1292-1302.
- 104- OLWEUS J, BITMANSOUR A, WARNKER R, THOMPSON PA, CARBALLIDO J, PICKER LJ and LUND-JOHANSEN F.** Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1997; 94: 12551-12556.
- 105- DZIOANEK A, FUCHS A, SCHMIDT P, CREMER S, ZYSK M, MILTENYI S, BUCK DW and SCHMITZ J.** BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2000; 165: 6037-6046.
- 106- BORKOWSKI TA, Van DYKE BJ, SCHWARZENBERGER K, McFARLAND VW, FARR AG and UDEY MC.** Expression of E-cadherin by murine dendritic cells: E-cadherin differentiation antigen characteristic of epidermal Langerhans cells and related cells. *Eur J Immunol* 1994; 24: 2767-2774.

- 107- VALLADEAU J, RAVEL O, DEZUTTER-DAMBUYANT C, MOORE K, KLEIJMEER M, LIU Y, DUVERT-FRANCES V, VINCENT C, SCHMITT D, DAVOUST J, CAUX C, LEBECQUE S and SAELAND S.** Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 2000; 12: 71-81.
- 108- ROMANI N, LENZ A, GLASSEL H, STOSSEL H, STANZL U, MAJDIC O, FRITSCH P and SCHULER G.** Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J Invest Dermatol* 1989; 93: 600-609.
- 109- SUMMERS KL, HOCK BD, MCKENZIE JL and HART DNJ.** Phenotypic characterization of five dendritic cell subsets in human tonsils. *Am J Path* 2001; 159 (1): 285-295.
- 110- CROFT M, DUNCAN DD and SWAIN SL.** Response of naïve antigen-specific CD4+ T cells *in vitro*: characteristics and antigen-presenting cell requirements. *J Exp Med* 1992; 176: 1431-1437.
- 111- WITMER-PACK MD, CROWLEY MT, INABA K and STEINMAN RM.** Macrophages, but not dendritic cells, accumulate colloidal carbon following administration *in situ*. *J Cell Sci* 1993; 105: 965-973.
- 112- SALLUSTO F, CELLA M, DANIELI C and LANZAVECCHIA A.** Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995; 182: 389-400.
- 113- WEST MA, PRESCOTT AR, ESKELINEN EL, RIDLEY AJ and WATTS C.** Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr Biol* 2000; 10: 839-848.
- 114- FANGER NA, VOIGTLAENDER D, LIU C, SWINK S, WARDWELL K, FISHER J, GRAZIANO RF, PFEFFERKORN LC and GUYRE PM.** Characterization of expression, cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor FcγRI (CD64) expressed on human blood dendritic cells. *J Immunol* 1997; 158: 3090-3098.
- 115- SCHMITT DA, HANAU D, BIEBER T, DEZUTTER-DAMBUYANT C, SCHMITT D, FABRE M, PAULY G and CAZENAVE JP.** Human epidermal Langerhans cells express only the 40-kilodalton Fc receptor (FcγRII). *J Immunol* 1990; 144: 4284-4290.
- 116- KRAFT S, WESSENDORF JH, HANAU D and BIEBER T.** Regulation of the high affinity receptor for the IgE on human epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 1998; 161: 1000-1006.
- 117- KRAUSS S, MAYER E, RANK G and RIEBER EP.** Induction of the low affinity receptor for Ig E (FcεRII/CD23) on human blood dendritic cells by interleukin-4. *Adv Exp Med Biol* 1993; 329: 231-236.
- 118- BIEBER T.** Fc epsilon RI-expressing antigen-presenting cells: new players in the atopic game. *Immunol Today* 1997; 18: 311-313.

- 119- MAURER D, FIEBIGER S, EBNER C, REININGER B, FISCHER GF, WICHLAS S, JOUVIN MH, SCHMITT-EGENOLF M, KRAFT D, KINET JP and STINGL G.** Peripheral blood dendritic cells express Fc epsilon RI as a complex composed of epsilon RI alpha- and epsilon RI gamma-chains and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. *J Immunol* 1996; 157: 607-616.
- 120- GEISSMANN F, LAUNAY P, PASQUIER B, LEPELLETIER Y, LEBORGNE M, LEHUEN A, BROUSSE N and MONTEIRO RC.** A subset of human dendritic cells expresses Ig A Fc receptor (CD28), which mediates internalization and activation upon cross-linking by Ig A complexes. *J Immunol* 2001; 166: 346-352.
- 121- HEYSTEK HC, MOULON C, WOLTMAN AM, GARONNE P and van KOOTEN C.** Human immature dendritic cells efficiently bind and take up secretory Ig A without the induction of maturation. *J Immunol* 2002; 168: 102-107.
- 122- KLINKSTEIN LB, BARBASHOV SF, LIU T, JACK RM and NICHOLSON-WELLER A.** Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q. *Immunity* 1997; 7: 345-355.
- 123- GHEBREHIWET B and PEERSCHKE EI.** CC1q-R (calreticulin) and gC1q-R/p33: ubiquitously expressed multi-ligand binding cellular proteins involved in inflammation and infection. *Mol Immunol* 2004; 41: 173-183.
- 124- De PANFILIS G, SOLIGO D, MANARA GC, FERRARI C and TORRESANI C.** Adhesion molecules on the plasma membrane of epidermal cells. I. Human resting Langerhans cells express two members of the adherence-promoting CD11/CD18 family, namely, H-Mac-1 (CD11b/cd18) and gp 150,95 (CD11c/CD18). *J Invest Dermatol* 1989; 93: 60-69.
- 125- MORELLI AE, LARREGINA AT, SHUFESKY WJ, ZAHORCHAK AF, LOGAR AJ, PAPWORTH GD, WANG Z, WATKINS SC, FALO LD jr and THOMSON AW.** Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production; *Blood* 2003; 101: 611-620.
- 126- De LA SALLE H, HAEGEL-KRONENBERGER H, BAUSINGER H, ASTIER A, CAZENAVE JP, FRIDMAN WH, SAUTES C, TEILLAUD JL, HANAU D and BIEBER T.** Functions of Fc receptors on human dendritic Langerhans cells. *Int Rev Immunol* 1997; 16: 187-203.
- 127- Mc CARTHY DA, MACEY MG, BEDFORD PA, KNIGHT SC, DUMONDE DC and BROWN KA.** Adhesion molecules are upregulated on dendritic cells isolated from human blood. *Immunology* 1997; 92: 244-251.
- 128- VERBOVETSKI I, BYCHKOV H, TRAHTEMBERG U, SHAPIRA I, HAREUVENI M, BEN-TAL O, KUTIKOV I, GILL O and MEVORACH D.** Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7. *J Exp Med* 2002; 196: 1553-1561.
- 129- ENGERING AJ, CELLA M, FLUITSMA D, BROCKHAUS M, HOEFSMIT EC, LANZAVECCHIA A and PIETERS J.** The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur J Immunol* 1997; 27: 2417-2425.

- 130- MOMMAAS AM, MULDER AA, JORDENS R, OUT C, TAN MC, CRESSWELL P, KLUIN PM and KONING F.** Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptors and a fully developed endosomal/lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules. *Eur J Immunol* 1999; 29 : 571-580.
- 131- LENNARTZ MR, WILEMAN TE and STAHL PD.** Isolation and characterization of a mannose-specific endocytosis receptor from rabbit alveolar macrophages. *Biochem* 1987; 245: 705-711.
- 132- KHAN S, WLEKLINSKI M, ARUFFO A, FARR A, CODER D and KAHN M.** Trypasonoma cruzi amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. *J Exp Med* 1995; 182: 1243-1258.
- 133- RIGOTTI A, TRIGATTI B, BABITT J, PENHAN M, XU S and KRIEGER M.** Scavenger receptor BI-a cell surface receptor for high density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 1997; 8: 181-188.
- 134- ALBERT ML, PEARCE SF, FRANCISCO LM, SAUTER B, ROY P, SILVERSTEIN RL and BHARDWAJ N.** Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 188: 1359-1368.
- 135- RUBARTELLI A, POGGI A and ZOCCHI MR.** The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the alpha(v) beta3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1893-1900.
- 136- HEEMELS MT and PLOEGH H.** Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 463-491.
- 137- WATTS C.** Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 821-850.
- 138- KLEIJMEER MJ, OORSCHOT VM and GEUZE HJ.** Human resident Langerhans cells display a lysosomal compartment enriched in MHC class II. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 516-523.
- 139- GEUZE HJ.** The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol Today* 1998; 19: 282-287.
- 140- PIERRE P and MELLMAN I.** Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell* 1998; 93: 1135-1145.
- 141- RIBERDY JM, NEWCOMB JR, SURMAN MJ, BARBOSA JA and CRESSWELL P.** HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* 1992; 360: 474-477.
- 142- CELLA M, SALLUSTO F and LANZAVECCHIA A.** Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 10-16.
- 143- CELLA M, ENGERING A, PINET V, PIETERS J and LANZAVECCHIA A.** Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997; 388: 782-787.

- 144- TURLEY SJ, INABA K, GARRETT WS, EBERSOLD M, UNTERNAEHRER J, STEINMAN RM and MELLMAN I.** Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* 2000; 288: 522-527.
- 145- HARDING CV and UNANUE ER.** Antigen processing and intracellular Ia. Possible roles of endocytosis and protein synthesis in Ia function. *J Immunol* 1989; 142: 12-19.
- 146- DEGEN E and WILLIAMS DB.** Participation of a novel 88-kD protein in the biogenesis of murine class I histocompatibility molecules. *J Cell Biol* 1991; 112: 1099-1115.
- 147- ORTMANN B, COPERMAN J, LEHNER PJ, SADASIVAN B, HERBERG JA, GRANDEA AG, RIDDELL SR, TAMPE R, SPIES T, TROWSDALE J and CRESSWELL P.** A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* 1997; 277: 1306-1309.
- 148- NORBURY CC, CHAMBERS BJ, PRESCOTT AR, LJUNGGREN HG and WATTS C.** Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 1997; 27: 280-288.
- 149- LENZ P, ELBE A, STINGL G and BERGSTRESSER PR.** MHC class I expression on dendritic cells is sufficient to sensitize for transplantation immunity. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 844-848.
- 150- KURTS C, KOSAKA H, CARBONE FR, MILLER JF and HEATH WR.** Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* 1997; 186: 239-245.
- 151- RODRIGUEZ A, REGNAULT A, KLEIJMEER M, RICCIARDI-CASTAGNOLI P and AMIGORENA S.** Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nature Cell Biol* 1999; 1: 362-368.
- 152- DRIESSEN C, BRYANT RA, LENNON-DUMENIL AM, VILLADANGOS JA, BRYANT PW, SHI GP, CHAPMAN HA and PLOEGH HL.** Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells. *J Cell Biol* 1999; 147: 775-790.
- 153- HENSKENS YM, VEERMAN EC and NIEUW AMERONGEN AV.** Cystatins in health and disease. *Biol Chem Hopp Seyler* 1996; 377: 71-86.
- 154- LUTZ MB, ROVERE P, KLEIJMEER MJ, RESCIGNO M, ASSMANN CU, OORSCHOT VM, GEUZE HJ, TRUCY J, DEMANDOLX D, DAVOUST J and RICCIARDI-CASTAGNOLI P.** Intracellular routes and selective retention of antigens in mildly acidic cathepsin D/lysosome-associated membrane protein-1/MHC class II-positive vesicles in immature dendritic cells. *J Immunol* 1997; 159: 3707-3716.
- 155- MACAGNO A, GILLIET M, SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A, NESTLE FO and GROETTRUP M.** Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation. *Eur J Immunol* 1999; 29: 4037-4042.

- 156- MOREL S, LEVY F, BURLET-SCHILTZ O, BRASSEUR F, PROBST-KEPPER M, PEITREQUIN AL, MONSARRAT B, van VELTHOVEN R, CEROTTINI JC, BOON T, GAIRIN JE and van den EYNDE BJ.** Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 2000; 12: 107-117.
- 157- BANCHEREAU J, BRIERE F, CAUX C, DAVOUST J, LEBECQUE S, LIU YJ, PULENDRAN B and PALUCKA K.** Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.
- 158- MUZIO M, POLENTARUTTI N, BOSISIO D, PRAHLADAN MK and MANTOVANI A.** Toll-like receptors: a growing family of immune receptors that are differentially expressed and regulated by different leukocytes. *J Leukoc Biol* 2000b; 67: 450-456.
- 159- PIERRE P, TURLEY SJ, GATTI E, HULL M, MELTZER J, MIRZA A, INABA K, STEINMAN RM and MELLMAN I.** Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 1997; 388: 787-792.
- 160- INABA K, TURLEY S, IYODA T, YAMAIDE F, SHIMOYAMA S, REIS e SOUSA C, GERMAIN RN, MELLMAN I and STEINMAN RM.** The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med* 2000; 191: 927-936.
- 161- DIEU MC, VANBERVLIET B, VICARI A, BRIDON JM, OLDHAM E, AÏT-YAHIA S, BRIERE F, ZLOTNIK A, LEBECQUE S and CAUX C.** Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 1998; 188: 373-386.
- 162- VECCHI A, MASSIMI LIANO L, RAMPONI S, LUINI W, BERNASCONI S, BONECCHI R, ALLAVENA P, PARMENTIER M, MANTOVANI A and SOZZANI S.** Differential responsiveness to constitutive vs. inducible chemokines of immature and mature mouse dendritic cells. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 489-494.
- 163- YONEYAMA H, MATSUMO K and MATSUSHIMAA K.** Migration of dendritic cells. *Int J Hematol* 2005; 81: 204-207.
- 164- SAEKI H, MOORE AM, BROWN MJ and HWANG ST.** Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol* 1999; 162: 2472-2475.
- 165- INABA K, WITMER-PACK M, INABA M, HATHCOCK KS, SAKUTA H, AZUMA M, YAGITA H, OKUMURA K, LINSLEY PS, IKEHARA S, MURAMATSU S, HODES RJ and STEINMAN RM.** The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* 1994; 180: 1849-1860.
- 166- CAUX C, VANBERVLIET B, MASSACRIER C, AZUMA M, OKUMURA K, LANIER LL and BANCHEREAU J.** B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 1994; 180: 1841-1847.
- 167- HASHIMOTO S, SUZUKI T, DONG HY, NAGAI S, YAMAZAKI N and MATSUSHIMA K.** Serial analysis of gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 1999; 94: 845-852.

- 168- TANG HL and CYSTER JG.** Chemokine up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science* 1999; 284: 819-822.
- 169- ADEMA GJ, HARTGERS F, VERSTRATEN R, de VRIES E, MARLAND G, MENON S, FOSTER J, XU Y, NOOYEN P, MacCLANAHAN T, BACON KB and FIGDOR CG.** A dendritic -cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 1997; 387: 713-717.
- 170- de SAINT-VIS B, FUGIER-VIVIER I, MASSACRIER C, GAILLARD C, VANBERVLIET B, AÏT-YAHIA S, BANCHEREAU J, LIU YJ, LEBECQUE S and CAUX C.** The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J Immunol* 1998; 160: 1666-1676.
- 171- KOCH F, STANZL U, JENNEWEIN P, JANKE K, HEUFLER C, KAMPGEN E, ROMANI N and SCHULER G.** High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10 published erratum appears in *J Exp Med* 1996; 1; 184 (4): following 1590. *J Exp Med* 1996; 184: 741-746.
- 172- ARDAVIN C.** Thymic dendritic cells. *Immunol Today* 1997; 18: 350-361.
- 173- SIMON JC, TIGELAAR RE, BERGSTRESSER PR, EDELBAUM D and CRUZ PD Jr.** Ultraviolet B radiation converts Langerhans cells from immunogenic to tolerogenic antigen-presenting cells. Induction of specific clonal anergy in CD4+ T helper 1 cells. *J Immunol* 1991; 146: 485-491.
- 174- VINK AA, STRICKLAND FM, BUCANA C, COX PA, ROZA L, YAROSH DD and KRIPKE ML.** Localization of DNA damage and its role in altered antigen-presenting cell function in ultraviolet-irradiated mice. *J Exp Med* 1996; 183: 1491-1500.
- 175- KHOURY SJ, GALLON L, CHEN W, BETRES K, RUSSEL ME, HANCOCK WN, CARPENTER CB, SAYEGH MH and WEINER HL.** Mechanisms of acquired thymic tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis: thymic dendritic-enriched cells induce specific peripheral T cell unresponsiveness in vivo. *J Exp Med* 1995; 182: 357-366.
- 176- OLUWOLE SF, JIN MX, CHOWDHURY NC, ENGELSTAD K, OHAJEKWE OA and JAMES T.** Induction of peripheral tolerance by intrathymic inoculation of soluble alloantigens: evidence for the role of host antigen-presenting cells and suppressor cell mechanism. *Cell Immunol* 1995; 162: 33-41.
- 177- CHANG CC, CIUBOTARIU R, MANAVALAN JS, YUAN J, COLOVAI AI, PIAZZA F, LEDERMAN S, COLONNA M, CORTESINI R, DALLA-FAVERA R and SUCIU-FOCA N.** Tolerization of dendritic cells by T cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 2002; 3: 237-243.
- 178- HARDING FA, McARTHUR JG, GROSS JA, RAULET DH and ALLISON JP.** CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 1992; 356: 607-609.
- 179- BURKLY L, HESSION C, OGATA L, REILLY C, MARCONI LA, OLSON D, TIZARD R, CATE R and LO D.** Expression of RelB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* 1995; 373: 531-536.

- 180- ENK AH, ANGELONI VL, UDEY MC and KATZ SI.** Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J Immunol* 1993; 151: 2390-2398.
- 181- MELLOR AL, BABAN B, CHANDLER P, MARSHALL B, JHAVER K, HANSEN A, KONI PA, IWASHIMA M and MUNN DH.** Cutting edge: induced indoleamine 2,3-dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J Immunol* 2003; 171: 1652-1655.
- 182- MUNN DH, SHARMA MD, LEE JR, JHAVER KG, JOHNSON TS, KESKIN DB, MARSHALL B, CHANDLER P, ANTONIA SJ, BURGESS R, SLINGLUFF CL Jr and MELLOR AL.** Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2, 3-dioxygenase. *Science* 2002; 297: 1867-1870.
- 183- INGULLI E, MONDINO A, KHORUTS A and JENKINS MK.** In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4+ T cells. *J Exp Med* 1997; 185: 2133-2141.
- 184- STEINMAN RM and WITMER MD.** Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed lymphocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1978; 75: 5132-5136.
- 185- HARDING FA, MacARTHUR JG, GROSS JA, RAULET DH and ALLISON JP.** CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 1992; 356: 607-609.
- 186- SCHOENBERGER SP, TOES RE, van der VOORT EI, OFFRINGA R and MELIEF CJ.** T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 1998; 393: 480-483.
- 187- BENNETT SR, CARBONE FR, KARAMALIS F, FLAVELL RA, MILLER JF and HEATH WR.** Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 1998; 393: 478-480.
- 188- BACHMANN MF, WONG BR, JOSIEN R, STEINMAN RM, OXENIUS A and CHOI Y.** TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation. *J Exp Med* 1999; 189: 1025-1031.
- 189- SORG RV, Mc LELLAN AD, HOCK BD, FEARNLEY DB and HART DNJ.** Human dendritic cells express functional interleukin-7. *Immunobiology* 1998; 198: 26-38.
- 190- KALINSKI P, SCHUITEMAKER J, HILKENS C, WIERENGA E and KAPSENBERG M.** Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness in IFN- γ and to bacterial IL-12 inducers: dendritic ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J Immunol* 1999; 162: 3231-3236.
- 191- CELLA M, SCHEIDEGGER D, PALMER-LEHMANN K, LANE P, LANZAVECCHIA A and ALBER G.** Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996; 184: 747-752.

- 192- MACATONIA SE, HOSKEN NA, LITTON M, VIEIRA P, HSIEH CS, CULPEPPER JA, WYSOCKA M, TRINCHIERI G, MURPHY KM and O’GARRA A.** Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of the Th1 cells from naïve CD4+ Tcells. *J Immunol* 1995; 154: 5071-5079.
- 193- MOSMANN TR and COFFMAN RL.** Th 1 and Th 2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-173.
- 194- BLUESTONE JA.** Is CTLA-4 a master switch for peripheral T cell tolerance ? *J Immunol* 1997; 158: 1989-1993.
- 195- LYNCH DH, RAMSDELL F and ALDERSON MR.** Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol Today* 1995; 16: 569-574.
- 196- LENARDO M, CHAN KM, HORNUNG F, McFARLAND H, SIEGEL R, WANG J and ZHENG L.** Mature T lymphocyte apoptosis-immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 221-253.
- 197- DUBOIS B, VANBERVLEIT B, FAYETTE J, MASSACRIER C, VAN KOOTEN C, BRIERE F, BANCHEREAU J and CAUX C.** Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes. *J Exp Med* 1997; 185: 941-951.
- 198- FAYETTE J, DUBOIS B, VANDENABEELE S, BRIDON JM, VANBERVLEIT B, DURAND I, BANCHEREAU J, CAUX C and BRIERE F.** Human dendritic cells skew isotype switching of CD40-activated naïve B cells towards Ig A1 and Ig A2. *J Exp Med* 1997; 185: 1909-1918.
- 199- MOORE PA, BELVEDERE O, ORR A, PIERI K, LA FLEUR DW, FENG P, SOPPET D, CHARTERS M, GENTZ R, PARMELEE D, LI Y, GALPERINA O, GIRI J, ROSCHKE V, NARDELLI B, CARELL J, SOSNOVTSEVA S, GREENFIELD W, RUBEN SM, OLSEN HS, FIKES J and HILBERT DM.** BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science* 1999; 285: 260-263.
- 200- MacKAY F, SCHNEIDER P, RENNERT P and BROWNING J.** BAFF/ APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 231-264.
- 201- LITINSKIY MB, NARDELLI B, HILBERT DM, HE B, SCHAFFER A, CASALI P and CERUTTI A.** DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat Immunol* 2002; 3: 822-829.
- 202- JEGO G, PALUCKA AK, BLANCK JP, CHALOUNI C, PASCUAL V and BANCHEREAU J.** Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 2003; 19: 225-234.
- 203- FERNANDEZ NC, LOZIER A, FLAMENT C, RICCIARDI-CASTAGNOLI P, BELLET D, SUTER M, PERRICAUDET M, TURSZ T, MARASKOVSKY E and ZITVOGEL L.** Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate antitumor immune responses in vivo. *Nat Med* 1999; 5: 405-411.
- 204- PORCELLI SA and MODLIN RL.** The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 297-329.

- 205- BURNET FM.** Cancer: a biological approach. *Br Med J* 1957; 1: 779-786.
- 206- BURNET FM.** Immunological aspects of malignant disease. *Lancet* 1967; 1: 1171-1174.
- 207- BOON T, CEROTTINI JC, VAN DEN EYNDE B, VAN DER BRUGGEN P and VAN PEL A.** Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 337-365.
- 208- HOUGHTON AN.** Cancer antigens: immune recognition of self and altered self. *J Exp Med* 1994; 180: 1-4.
- 209- AMBE K, MORI M and ENJOJI M.** S-100 protein-positive dendritic cells in colorectal adenocarcinomas. Distribution and relation to the clinical prognosis. *Cancer* 1989; 63: 496-503.
- 210- FURUKAWA T, WATANABE S, KODAMA T, SATO Y, SHIMOSATO Y and SUEMASU K.**T-zone histiocytes in adenocarcinoma of the lung in relation to postoperative prognosis. *Cancer* 1985; 56: 2651-2656.
- 211- SCHRODER S, SCHWARZ W, REHPENNING W, LONING T and BOCKER W.** Dendritic/Langerhans cells and prognosis in patients with papillary thyroid carcinomas. Immunocytochemical study of 106 thyroid neoplasms correlated to follow-up data. *Am J Clin Pathol* 1988; 89: 295-300.
- 212- TSUJITANI S, KAKEJI Y, WATANABE A, KOHNOE S, MAEHARA Y and SUGIMACHI K.** Infiltration of dendritic cells in relation to tumor invasion and lymph node metastasis in human gastric cancer. *Cancer* 1990; 66:2012-2016.
- 213- GABRILOVICH DI, CORAK J, CIERNIK IF, KAVANAUGH D and CARBONE DP.** Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clin Canc Res* 1997; 3: 483-490.
- 214- TROY AJ, DAVIDSON P, ATKINSON CA and HART DNJ.** Phenotypic characterization of the dendritic cell infiltrate in prostate cancer. *J Urol* 1998; 160: 214-219.
- 215- TROY AJ, SUMMERS KL, DAVIDSON P, ATKINSON CA and HART DNJ.** Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. *Clin Canc Res* 1998; 4: 585-593.
- 216- BODMER WF, BROWNING MJ, KRAUSA P, ROWAN A, BICKNELL DC and BODMER JG.** Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms. *Ann NY Acad Sci* 1993; 690: 42-49.
- 217- RUIZ-CABELLO F, PEREZ-AYALA M, GOMEZ O, REDONDO M, CONCHA A, CABRERA T and GARRIDO F.** Molecular analysis of MHC-class I alterations in human tumor cell lines. *Int J Cancer* 1991; suppl 6: 123-130.
- 218- GARRIDO F, RUIZ-CABELLO F, CABRERA T, PEREZ-VILLAR JJ, LOPEZ-BOTET M, DUGGAN-KEEN M and STERN PL.** Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumors. *Immunol Today* 1997; 18: 89-95.
- 219- JOHNSON A, FRANCE J, SY MS and HARDING CV.** Down-regulation of the transporter for antigen presentation, proteasome subunits and MHC class I in tumor cell lines. *Cancer Res* 1998; 58: 3660-3667.

- 220- FORTIS C, FOPPOLI M, GIANOTTI L, GALLI L, CITTERIO G, CONSOGLIO G, GENTILINI O and BRAGA M.** Increased interleukin-10 serum levels in patients with solid tumors. *Cancer Lett* 1996; 104: 1-5.
- 221- KIM J, MODLIN RL, MOY RL, DUBINETT SM, McHUGH T, NICKOLOFF BJ and UYEMURA K.** IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. *J Immunol* 1995; 155: 2240-2247.
- 222- FIORENTINO DF, ZLOTNIK A, VIEIRA P, MOSMANN TR, HOWARD M, MOORE KW and O'GARRA A.** IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991; 146: 3444-3451.
- 223- ENK AH, ANGELONI VL, UDEY MC and KATZ SI.** Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J Immunol* 1995; 154: 1280-1286.
- 224- STEINBRINK K, JONULEIT H, MULLER G, SCHULER G, KNOP J and ENK AH.** Interleukin-10 treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8+ T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 1999; 93: 1634-1642.
- 225- GABRILOVICH DI, CHEN HL, GORGIS KR, CUNNINGHAM HT, MENY GM, NADAF S, KAVANAUGH D and CARBONE DP.** Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nature Med* 1996; 2: 1096-1103.
- 226- BROWN RD, POPE B, MURRAY A, ESDALE W, SZE DM, GIBSON J, HO PJ, HART D and JOSHUA D.** Dendritic cells from patients with melanoma are numerically normal but functionally defective as they fail to upregulate CD80 (B7-1) expression after her CD40 LT stimulation due to inhibition by TGF- β 1 and IL-10. *Blood* 2001; 98: 2992-2998.
- 227- SUMMERS KL, O'DONNELL JL, HIGHTON J and HART DNJ.** Chronic arthritic synovial fluid TGF- β inhibits dendritic cell-T lymphocyte interactions. *Arth Rheum* 1999; 42: 507-518.
- 228- NESTLE FO, BURG G, FAH J, WRONE-SMITH T and NICKOLOFF BL.** Human sunlight-induced basal-cell-carcinoma-associated dendritic cells are deficient in T cell co-stimulatory molecules and are impaired as antigen-presenting cells. *Am J Pathol* 1997; 150: 641-651.
- 229- VIAC J, SCHMITT D and CLAUDY A.** CD40 expression in epidermal tumors. *Anticancer Res* 1997; 17: 569-572.
- 230- KIERTSCHER SM, LUO J, DUBINETT SM and ROTH MD.** Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2000; 164: 1269-1276.
- 231- THURNER B, RODER C, DIECKMANN D, HEUER M, KRUSE M, GLASER A, KEIKAVOUSSI P, KAMPGEN E, BENDER A and SCHULER G.** Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods* 1999; 223: 1-15.

- 232- HSU FJ, BENIKE C, FAGNONI F, LILES TM, CZERWINSKI D, TAIDI B, ENGLEMAN EG and LEOY R.** Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2: 52-58.
- 233- REICHARDT VL, OKADA CY, LISO A, BENIKE CJ, STOCKERL-GOLDSTEIN KE, ENGLEMAN EG, BLUME KG and LEVY R.** Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma: a feasibility study. *Blood* 1999; 93: 2411-2419.
- 234- FONG L, BROCKSTEDT, BENIKE C, BREEN JK, STRANG G, RUEGG CL and ENGLEMAN EG.** Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy. *J Immunol* 2001; 167: 7150-7156.
- 235- MARASKOVSKY E, BRASEL K, TEEPE M, ROUX ER, LYMAN SD, SHORTMAN K and MacKENNA HJ.** Dramatic increase in the number of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* 1996; 184: 1953-1962.
- 236- DONG J, Mc PHERSON CM and STAMBROOK PF.** Flt-3 ligand. *Cancer Biol Ther* 2002; 1: 486-489.
- 237- LYNCH DH, ANDREASEN A, MARASKOVSKY E, WHITMORE J, MILLER RE and SCHUH JC.** Flt3 ligand induces tumor regression and antitumor immune responses in vivo. *Nat Med* 1997; 3: 625-631.
- 238- ESCHE C, SUBBOTIN VM, MALISZEWSKY C, LOTZE MT and SHURIN MR.** Flt3 ligand administration inhibits tumor growth in murine melanoma and lymphoma. *Cancer Res* 1998; 58: 380-383.
- 239- PULENDRAN B, BRANCHEREAU J, BURKEHOLDER S, KRAUS E, GUINET E, CHALOUNI C, CARON D, MALISZEWSKI C, DAVOUST J, FAY J and PALUCKA K.** Flt3 ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol* 2000; 165: 566-572.
- 240- FEARNLEY DB, WHYTE LF, CARNOUTSOS SA, COOK AH and HART DNJ.** Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood* 1999; 93: 728-736.
- 241- MANNERING SI, MacKENZIE JL and HART DNJ.** Optimisation of the conditions for generating human DC initiated primary antigen specific T lymphocyte lines in vitro. *J Immunol Methods* 1998; 219: 69-83.
- 242- MORSE MA, LYERLY HK, GILBOA E, THOMAS E and NAIR SM.** Optimization of the sequence of antigen loading and CD40-ligand induced maturation of dendritic cells. *Cancer Research* 1998; 58: 2965-2968.
- 243- CAUX C, DEZUTTER DAMBUYANT C, SCHMITT D and BRANCHEREAU J.** GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 1992; 360: 258-261.

- 244- BERNHARD H, DISIS ML, HEIMFIELD S, HAND S, GRALOW JR and CHEEVER MA.** Generation of immunostimulatory dendritic cells from human CD34+ hematopoietic progenitor cells in the bone marrow and peripheral blood. *Cancer Res* 1995; 55: 1099-1104.
- 245- SIENA S, DI NICOLA M, BREGNI M, MORTARINI R, ANICHINI A, LOMBARDI L, RAVAGNANI F, PARMIANI G and GIANNI AM.** Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anti-cancer therapy. *Exp Hematol* 1995; 23: 1463-1471.
- 246- TALMOR M, MIRZA A, TURLEY S, MELLMAN I, HOFFMAN LA and STEINMAN RM.** Generation of large numbers of immature and mature dendritic cells from rat bone marrow cultures. *Eur J Immunol* 1998; 28: 811-817.
- 247- LABEUR MS, ROTERS B, PERS B, MEHLING A, LUGER TA, SCHWARZ T and GRABBE S.** Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *J Immunol* 1999; 162: 168-175.
- 248- WEIGEL BJ, NATH N, TAYLOR PA, PANOSKALTSIS-MORTARI A, CHEN W, KRIEG AM, BRASEL K and BLAZAR BR.** Comparative analysis of murine marrow-derived dendritic cells generated by Flt3L or GM-CSF/IL-4 and matured with immune stimulatory agents on the in vivo induction of antileukemia responses. *Blood* 2002; 100: 4169-4176.
- 249- CARRASCO CP, RIGDEN RC, SCHAFFNER R, GERBER H, NEUHAUS V, INUMARU S, TAKAMATSU H, BERTONI G, McCULLOUGH KC and SUMMERFIELD A.** Porcine dendritic cells generated in vitro: morphological, phenotypic and functional properties. *Immunology* 2001; 104 (2): 175-186.
- 250- AKIYAMA Y, MARUYAMA K, NARA N, HOJO T, CHENG JY, MORI T, WILTROUT RH and YAMAGUCHI K.** Antitumor effects induced by dendritic cell-based immunotherapy against established pancreatic cancer in hamsters. *Cancer Letters* 2002; 184 (1): 37-47.
- 251- CATCHPOLE B, STELL AJ and DOBSON JM.** Generation of blood-derived dendritic cells in dogs with oral malignant melanoma. *J Comp Path* 2002; 126: 238-241.
- 252- ISOTANI M, KATSUMA K, TAMURA K, YAMADA M, YAGIHARA H, AZAKAMI D, ONO K, WASHIZU T and BONKOBARA M.** Efficient generation of canine bone marrow-derived dendritic cells. *J Vet Med Sci* 2006; 68 (8): 809-814.
- 253- HAGGLUND HG, McSWEENEY PA, MATHIOUDAKIS G, BRUNO B, GEORGES GE, GASS MJ, MOORE P, SALE GE, STORB R and NASH RA.** Ex vivo expansion of canine dendritic cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *Transplantation* 2000; 70: 1437-1442.
- 254- GYORFFY S, RODRIGUEZ-LECOMPTE JC, WOODS JP, FOLEY R, KRUTH S, LIAW PCC and GAULDIE J.** Bone marrow-derived dendritic cell vaccination of dog with naturally occurring melanoma by using human gp 100 antigen. *J Vet Intern Med* 2005; 19: 56-63.
- 255- INABA K, STEINMAN RM, PACK MW, AYA H, INABA M, SUDO T, WOLPE S and SCHULER G.** Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. *J Exp Med* 1992; 175: 1157-1167.

- 256- SCHREURS MN, EGGERT AA, de BOER AJ, FIGDOR CG and ADEMA GJ.** Generation and functional characterization of mouse monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999; 29: 2835-2841.
- 257- SALLUSTO F and LANZAVECCHIA A.** Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor-alpha. *J Exp Med* 1994; 179: 1109-1118.
- 258- ROMANI N, REIDER D, HEUER M, EBNER S, KAMPGEN E, EIBL B, NIEDERWEISER D and SCHULER G.** Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996; 196: 137-151.
- 259- BENDER A, SAPP M, SCHULER G, STEINMAN RM and BHARDWAJ N.** Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods* 1996; 196: 121-135.
- 260- PAILLOT R, LAVAL F, AUDONNET JC, ANDREONI C and JUILLARD V.** Functional and phenotypic characterization of distinct porcine dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Immunology* 2001; 102 (4): 396-404.
- 261- IBISCH C, PRADAL G, BACH JM and LIEUBEAU B.** Functional canine dendritic cells can be generated in vitro from peripheral blood mononuclear cells and contain a cytoplasmic ultrastructural marker. *J Immunol Methods* 2005; 298: 175-182.
- 262- FREER G, MATTEUCCI D, MAZZETTI P, BOZZACCO L and BENDINELLI M.** Generation of feline dendritic cells derived from peripheral blood monocytes for in vivo use. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12 (10): 1202-1208.
- 263- MORSE MA, LYERLY HK, GILBOA E, THOMAS E and NAIR SK.** The role of CD40-ligand in induction of dendritic cell maturation. *Cancer Res* 1998; 58: 2965-2968.
- 264- CELLA M, SCHEIDEGGER D, PALMER-LEHMANN K, LANE P, LANZAVECCHIA A and ALBERT G.** Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high level of interleukin-12 and enhances T cell stimulator capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996; 184: 747-752.
- 265- CHEN HW, HUANG HI, LEE YP, CHEN LL, LIU HK, CHENG ML, TSAI JP, TAO MH and TING CC.** Linkage of CD40L to a self-tumor antigen enhances the antitumor immune responses of dendritic cell-based treatment. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51: 341-348.
- 266- KIKUCHI T, MOORE MAS and CRYSTAL RG.** Dendritic cells modified to express CD40 ligand elicit therapeutic immunity against preexisting murine tumors. *Blood* 2000; 96 (1): 91-99.
- 267-WONG BR, JOSIEN R, LEE SY, SAUTER B, LI HL, STEINMAN RM and CHOI Y.** TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* 1997; 186: 2075-2080.

- 268- BROSSART P, WIRTHS S, BRUGGER W and KANZ L.** Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp Hematol* 2001; 29 (11): 1247-1255.
- 269- SANTINI SM, LAPENTA C, LOGOZZI M, PARLATO S, SPADA M, DI PUCCHIO T and BELARDELLI F.** Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med* 2000; 191: 1777-1788.
- 270- PARLATO S, SANTINI SM, LAPENTA C, DI PUCCHIO T, LOGOZZI M, SPADA M, GIAMMARIOLI AM, MARLONI W, FAIS S and BELARDELLI F.** Expression of CCR-7, MIP-3 beta, and Th1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities. *Blood* 2001; 98: 3022-3029.
- 271- KNUTH A, WÖLFEL T and MEYER zum BÜSCHENFELDE KH.** T cell responses to human malignant tumors. *Cancer Surv* 1992; 13: 39-52.
- 272- BOON T, COULIE P and Van den EYNDE B.** Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today* 1997; 18: 267-268.
- 273- Van der BRUGGEN PC, TRAVERSARI C, CHOMEZ P, LURQUIN C, DE PLAEN E, Van den EYNDE B, KNUTH A and BOON T.** A gene encoding an antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254: 1643-1647.
- 274- CHEN YT.** Cancer vaccine: identification of human tumor antigens by SEREX. *Cancer J Sci Am* 2000; 6: 208-207.
- 275- NAKATSURA T, SENJU S, ITO M, NISHIMURS Y and ITOH K.** Cellular and humoral immune response to a human pancreatic cancer antigen, coactosin-like protein, originally defined by the SEREX method. *Eur J Immunol* 2002; 32: 826-836.
- 276- THOMAS AM, SANTARSIERO LM, LUTZ ER, ARMSTRONG TD, CHEN YC, HUANG LQ, LAHERU DA, GOGGINS M, HRUBAN RH and JAFFEE EM.** Mesothelin-specific CD8+ T cell responses provide evidence of in vivo cross-priming by antigen-presenting cells in vaccinated pancreatic cancer patients. *J Exp Med* 2004; 200: 297-306.
- 277- TRAVERSARI C, Van der BRUGGEN P, LUESCHER IF, LURQUIN C, CHOMEZ P, Van PEL A, DE PLAEN E, AMARCOSESEC A and BOON T.** A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T-lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J Exp Med* 1992; 176: 1453-1457.
- 278- Van den EYNDE B, PEETERS O, DE BACKER O, GAUGLER B, LUCAS S and BOON T.** A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med* 1995; 182: 689-698.
- 279- GAUGLER B, VAN DER EYNDE B, VAN DER BRUGGEN, ROMERO P, GAFORIO JJ, DE PLAEN E, LETHE B, BRASSEUR F and BOON T.** Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 1994; 179: 921-930.

- 280- JÄGER E, CHEN YT, DRIJFHOUT JW, KARBACH J, RINGHOFFER M, JÄGER D, ARAND M, WADA H, NOGUCHI Y, STOCKERT E, OLD LJ and KNUTH A.** Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leucocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes; *J Exp Med* 1998; 187: 265-270.
- 281- JÄGER E, MAEURER M, HÖHN H, KARBACH J, JÄGER D, ZIDIANAKIS Z, BAKHSHANDEH-BATH A, ORTH J, NEUKIRCH C, NECKER A, REICHERT TE and KNUTH A.** Clonal expansion of Melan A-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) in a melanoma patient responding to continued immunization with melanoma-associated peptides. *Int J Cancer* 2000; 6: 538-547.
- 282- BAKKER AB, SCHREURS MWJ, de BOER AJ, KAWAKAMI Y, ROSENBERG SA, ADEMA GJ and FIGDOR CG.** Melanocyte lineage-specific antigen gp 100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1994; 179: 1005-1009.
- 283- BRICHARD V, Van PEL A, WÖLFEL T, de PLAEN E, LETHE B, COULIE P and BOON T.** The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 1993; 178: 489-495.
- 284- COULIE P, LEMMANN F, LETHE B, HERMAN J, LURQUIN C, ANDRAWISS M and BOON T.** A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1995; 92: 7976-7980.
- 285- TILKIN AF, LUBIN R, SOUSSI T, LAZAR V, JANIN N, MATHIEU MC, LEFRERE I, CARLU C, ROY M and KAYIBANDA M.** Primary proliferative T cell response to wild-type p 53 protein in patients with breast cancer. *Eur J Immunol* 1995; 25: 1765-1769.
- 286- GJERTSEN MK, BAKKA A, BREIVIK J, SAETERDAL I, SOLHEIM BG, SOREIDE O, THORSBY E and GAUDERNACK G.** Vaccination with mutant Ras peptides and induction of T cell responsiveness in pancreatic carcinoma patients carrying the corresponding Ras mutation. *Lancet* 1995; 346: 1399-1400.
- 287- DISIS ML and CHEEVER MA.** Oncogenic proteins as tumor antigen. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 637-642.
- 288- WEBER J, SONDAK VK, SCOTLAND R, PHILIP R, WANG F, RUBIO V, STUGE TB, GROSHEN SB, GEE C, JEFFERY GG, SIAN S and LEE PP.** Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor added to a multi-peptide vaccine for resected stage II melanoma. *Cancer* 2003; 97: 186-200.
- 289- KNIGHT SC, HUNT R, DORE C and MEDAWAR PB.** Influence of dendritic cells on tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1985; 82: 4495-4497.
- 290- MAYORDOMO JI, ZORINA T, STORKUS WJ, ZITVOGEL L, CELLUZZI C, FALO LD, MELIEF CJ, ILDSTAD ST, KAST WM and DELEO AB.** Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med* 1995; 1297-1302.
- 291- NESTLE FO, ALIJAGIC S, GILLIET M, SUN Y, GRABBE S, DUMMER R, BURG G and SCHADENDORF D.** Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998; 4: 328-332.

292- THURNER B, HAENDLE I, RODER C, DIECKMANN D, KEIKAVOUSSI P, JONULEIT H, BENDER A, MACZEK C, SCHREINER D, von den DRIESCH P, BRÖCKER EB, STEINMAN RM, ENK A, KÄMPGEN E and SCHULER G. Vaccination with Mage-3A1 peptide-pulsed mature monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 1999; 190: 1669-1678.

293- PANELLI MC, WUNDERLICH J, JEFFRIES, WANG E, MIXON A, ROSENBERG SA and MARINCOLA FM. Phase I study in patients with metastatic melanoma of immunization with dendritic cells presenting epitopes derived from the melanoma-associated antigens MART-1 and gp100. *J Immunother* 2000; 23: 487-498.

294- SCHULER-THURNER B, SCHULTZ ES, BERGER TG, WEINLICH G, EBNER S, WOERL P, BENDER A, FEUERSTEIN B, FRITSCH PO, ROMANI N and SCHULER G. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195: 1279-1288.

295- BUTTERFIELD LH, RIBAS A, DISSETTE VB, AMARNANI SM, VU HT, OSEGUERA D, WANG HJ, ELASHOFF RM, McBRIDE WH, MUKHERJI B, COCHRAN AJ, GLASPY JA and ECONOMOU JS. Determinant spreading associated with clinical response in dendritic cell-based immunotherapy for malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 998-1008.

296- BURCH PA, CROGHAN GA, GASTINEAU VB, JONES LA, KAUR JS, KYLSTRA JW, RICHARDSON RL, VALONE FH and VUK-PAVLOVIC S. Autologous dendritic cells pulsed with prostatic acid phosphatase can induce durable remission of metastatic androgen-independent prostate cancer: A phase 2 trial. *Prostate* 2004; 60: 197-204.

297- MURPHY G, TJOA B, RADGE H, KENNY G and BOYNTON A. Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate* 1996; 29: 371-380.

298- TJOA BA, SIMMONS SJ, BOWES VA, RAGDE H, ROGERS M, ELGAMAL A, KENNY GM, COBB OE, IRETON RC, TROYCHAK MJ, SALGALLER ML, BOYNTON AL and MURPHY GP. Evaluation of phase I/II clinical trials in prostate cancer with dendritic cells and PSMA peptides. *Prostate* 1998; 36: 39-44.

299- MURPHY GP, TJOA BA, SIMMONS SJ, JARISCH J, BOWES VA, RADGE H, ROGERS M, ELGAMAL A, KENNY GM, COBB OE, IRETON RC, TROYCHAK MJ, SALGALLER ML and BOYNTON AL. Infusion of dendritic cells pulsed with HLA-A2-specific prostate-specific membrane antigen peptides: a phase II prostate cancer vaccine trial involving patients with hormone-refractory metastatic disease. *Prostate* 1999; 38: 73-78.

300- MURPHY GP, TJOA BA, SIMMONS SJ, ROGERS MK, KENNY GM and JARISCH J. Higher-dose and less frequent dendritic cell infusions with PSMA peptides in hormone-refractory metastatic prostate cancer patients. *Prostate* 2000; 43: 59-62.

301- BARROU B, BENOÎT G, OULDKACI M, CUSSENOT O, SALCEDO M, AGRAWAL S, MASSICARD S, BERCOVICI N, ERICSON ML and THIOUNN N. Vaccination of prostatectomized prostate cancer patients in biochemical relapse with autologous dendritic cells pulsed with recombinant human PSA. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 453-460.

- 302- OSTERBORG A, YI Q, HENRIKSSON L, FAGERBERG J, BERGENBRANT S, JEDDI-TEHRANI M, RUDEN U, LEFVERT AK, HOLM G and MELLSTEDT H.** Idiotype immunization combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in myeloma patients induced type 1, major histocompatibility complex-restricted, CD8- and CD4-specific T cell responses. *Blood* 1998; 91: 2459-2466.
- 303- WENG YJ, LING M, BAILEY-WOOD R and LIM SH.** Idiotype protein pulsed adherent peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells prime immune system in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 957-962.
- 304- REICHARDT VL, OKADA CY, LISO A, BENIKE CJ, STOCKERL-GOLDSTEIN KE, ENGLEMAN EG, BLUME KG and LEVY R.** Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma – a feasibility study. *Blood* 1999; 93: 2411-2419.
- 305- VALONE FH, SMALL E, MacKENZIE M, BURCH P, LACY M, PESHWA MV and LAUS R.** Dendritic cell-based treatment of cancer: closing in a cellular therapy. *Cancer J* 2001; 7: s 53-61.
- 306- BROSSART P, WIRTHS S, STUHLER G, REICHARDT VL, KANZ L and BRUGGER W.** Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 2000; 96: 3102-3108.
- 307- BANCHEREAU J, PALUCKA AK, DHODAPKAR M, BURKEHOLDER S, TAQUET N, ROLLAND A, TAQUET S, COQUERY S, WITTKOWSKI KM, BHARDWAJ N, PINEIRO L, STEINMAN RM and FAY J.** Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34+ progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 2001; 61: 6451-6458.
- 308- RIVOLTINI L, SQUARCINA P, LOFTUS DJ, CASTELLI C, TARSINI P, MAZZOCCHI A, RINI F, VIQQIANO V, BELLI F and PARMIANI G.** A super agonist ariant of peptide MART-1/Melan A27-35 elicits anti-melanoma CD8+ T cells with enhanced functional characteristics: implication for more effective immunotherapy. *Cancer Res* 1999; 59: 301-306.
- 309- PAGLIA P, CHIODONI C, RODOLFO M and COLOMBO MP.** Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J Exp Med* 1996; 183: 317-322.
- 310- GRABBE S, BRUVERS S, GALLO RL, KNISELY TL, NAZARENO R and GRANSTEIN RD.** Tumor antigen presentation by murine epidermal cells. *J Immunol* 1991; 146: 3656-3661.
- 311- HSU FJ, BENIKE C, FAGNONI F, LILES TM, CZERWINSKI D, TAIDI B, ENGLEMAN EG and LEVY R.** Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2: 52-57.
- 312- TIMMERMAN JM, CZERWINSKI DK, DAVIS TA, HSU FJ, BENIKE C, HAO ZM, TAIDI B, RAJAPAKSA R, CASPAR CB, OKADA CY, van BECKHOVEN A, LILES TM, ENGLEMAN EG and LEVY R.** Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 2002; 99: 1517-1526.

- 313- REICHARDT VL, MILAZZO C, BRUGGER W, EINSELE H, KANZ L and BROSSART P.** Idiotype vaccination of multiple myeloma patients using monocyte-derived dendritic cells. *Haematologica* 2003; 88: 1139-1149.
- 314- O'ROURKE MG, JOHNSON M, LANAGAN C, SEE J, YANQ J, BELL JR, SLATER GJ, KERR BM, CROWE B, PURDIE DM, ELLIOTT SL, ELLEM KA and SCHMIDT CW.** Durable complete clinical responses in a phase I/II trial using an autologous melanoma cell/dendritic cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52: 387-395.
- 315- HOLTL L, RIESER C, PAPESH C, RAMONER R, BARTSCH G and THURNHER M.** CD83+ blood dendritic cells as a vaccine for immunotherapy of metastatic renal-cell cancer. *Lancet* 1998; 352: 1358.
- 316- HOLTL L, ZELLE-RIESER C, GANDER H, PAPESH C, RAMONER R, BARTSCH G, ROGATSCH H, BARSOUM AL, COGGIN JH Jr and THURNHER M.** Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3369-3376.
- 317- SCHOTT M, FELDKAMP J, SCHATTENBERG D, SEISSLER J and SCHERBAUM WA.** Dendritic cell immuno-therapy in disseminated parathyroid carcinoma. *Lancet* 1999; 353: 1188-1189.
- 318- MAIER T, TUN-KYI A, TASSIS A, JUNQUIUS KP, BURQ G, DUMMER R and NESTLE FO.** Vaccination of patients with cutaneous T-cell lymphoma using intra-nodal injection of autologous tumor-lysate-pulsed dendritic cells. *Blood* 2003; 102: 2338-2344.
- 319- GEIGER J, HUTCHINSON R, HOHENKIRK L, McKENNA E, CHANG A and MULE J.** Treatment of solid tumors in children with tumour-lysate-pulsed dendritic cells. (Letter). *Lancet* 2000; 356: 1163-1165.
- 320- CHANG AE, REDMAN BG, WHITFIELD JR, NICKOLOFF BJ, BRAUN TM, LEE PP, GEIGER JD and MULE JJ.** A phase I trial of tumor lysate-pulsed dendritic cells in the treatment of advanced cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1021-1032.
- 321- FIELDS RC, SHIMIZU K and MULE JJ.** Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998; 95: 9482-9487.
- 322- DeMATOS P, ABDEL-WAHAB Z, VERVAERT C, HESTER D and SEIGLER H.** Pulsing of dendritic cells with cell lysates from either B16 melanoma or MCA-106 fibrosarcoma yields equally effective vaccines against B16 tumors in mice. *J Surg Oncol* 1998; 68: 73-91.
- 323- AKIYAMA Y, MARUYAMA K, NARA N, HOJO T, CHENG JY, MORI T, WILTROUT RH and YAMAGUCHI K.** Antitumor effects induced by dendritic cell-based immunotherapy against established pancreatic cancer in hamsters. *Can Let* 2002; 184: 37-47.
- 324- FADOK VA, SAVILL JS, HASLETT C, BRATTON DL, DOHERTY DE, CAMPBELL PA and HENSON PM.** Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidyl-serine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 1992; 149: 4029-4035.

- 325- ALBERT ML, PEARCE SF, FRANCISCO LM, SAUTER B, ROY P, SILVERSTEIN RL and BHARDWAJ N.** Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via $\alpha\beta 5$ and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 188: 1359-1368.
- 326- DEVITT A, MOFFATT CD, RAYKUNDALIA C, CAPRA JD, SIMMONS DL, and GREGORY CD.** Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 1998; 392: 505-509.
- 327- HENRY F, BOISTEAU O, BRETAEU L, LIEUBEAU B, MEFLAH K and GREGOIRE M.** Antigen-presenting cells that phagocytose apoptotic tumor-derived cells are potent tumor vaccines. *Cancer Res* 1999; 59: 3329-3332.
- 328- ALBERT ML, SAUTER B and BHARDWAJ N.** Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998; 392: 86-89.
- 329- RONCHETTI A, ROVERE P, IEZZI G, GALATI G, HELTAI S, PROTTI MP, GARANCINI MP, MANFREDI AA, RUGARLI C and BELLONE M.** Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines. *J Immunol* 1999; 163: 130-136.
- 330- RUSSO V, TANZARELLA S, DALERBA P, RIGATTI D, ROVERE P, VILLA A, BORDIGNON C and TRAVERSARI C.** Dendritic cells acquire the MAGE-3 human tumor antigen from apoptotic cells and induce a class I-restricted T cell response. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2000; 97: 2185-2190.
- 331- MULDER P, TSO CL, GITLITZ B, KABOO R, HINKEL A, FRAND S, KIERTSCHER S, ROTH MD, deKERNION J, FIGLIN R and BELLDEQRUN A.** Presentation of renal tumor antigens by human dendritic cells activates tumor-infiltrating lymphocytes against autologous tumor: implication for live kidney cancer vaccines. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 445-454.
- 332- JENNE L, ARRIGHI JF, JONULEIT H, SAURAT JH and HAUSER C.** Dendritic cells containing apoptotic melanoma cells prime human CD8⁺ T cells for efficient tumor cell lysis. *Cancer Res* 2000; 60: 4446-4452.
- 333- GALETTO A, CONTARINI M, SAPINO A, CASSONI P, CONSALVO E, FORNO S, PEZZI C, BARNABA V, MUSSA A and MATERA L.** Ex vivo host response to gastrointestinal cancer cells presented by autologous dendritic cells. *J Surg Res* 2001; 100: 32-38.
- 334- FERLAZZO G, SEMINO C, SPAGGIARI GM, META M, MINGARI MC and MELIOLI G.** Dendritic cells efficiently cross-prime HLA class I-restricted cytolytic T lymphocytes when pulsed with both apoptotic and necrotic cells but not with soluble cell-derived lysates. *Int Immunol* 2000; 12: 1741-1747.
- 335- GALEA-LAURI J, DARLING D, MUFTI G, HARRISON P and FARZANEH F.** Eliciting cytotoxic T lymphocytes against acute myeloid leukaemia-derived antigens: evaluation of dendritic cell-leukemia cell hybrids and other antigen-loading strategies for dendritic cell-based vaccination. *Can Immunol Immunother* 2002; 51: 299-310.
- 336- STEINMAN RM, TURLEY S, MELLMAN I and INABA K.** The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 2000; 191: 411-416.

- 337- SONG SY and KIM HS.** Strategies to improve dendritic cell-based immunotherapy against cancer. *Yonsei Med J* 2004; 45 suppl: 48-52.
- 338- TODRYK S, MELCHER AA, HARDWICK N, LINARDAKIS E, BATEMAN A, COLOMBO MP, STOPPACCIARO A and VILE RG.** Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake. *J Immunol* 1999; 163: 1398-1408.
- 339- LIPSKER D, ZIYLAN U, SPEHNER D, PROAMER F, BAUSINGER H, JEANNIN P, SALAMERO J, BOHBOT A, CAZENAVE JP, DRILLIEN R, DELNESTE Y, HANAU D and de la SALLE H.** Heat shock proteins 70 and 60 share common receptors which are expressed on human monocyte-derived but not epidermal dendritic cells. *Eur J Immunol* 2002; 32: 322-332.
- 340- BINDER RJ, HAN DK and SRIVASTAVA PK.** CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat Immunol* 2000; 1: 151-155.
- 341- GUO Y, WU M, CHEN H, WANG X, LIU G, LI G, MA J and SY M.** Effective tumor vaccine generated by fusion of hepatoma cell with activated B cells. *Science* 1994; 263: 518-520.
- 342- JANTSCHIEFF P, SPAGNOLI G, ZAJAC P and ROCHLITZ CF.** Cell fusion: an approach to generating constitutively proliferating human tumor antigen-presenting cells. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51: 367-375.
- 343- HART I and COLACO C.** Immunotherapy. Fusion induces tumour rejection. *Nature* 1997; 388: 626-627.
- 344- GONG JL, CHEN D, KASHIWABA M and KUFE D.** Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic cells and carcinoma cells. *Nat Med* 1997; 3: 558-561.
- 345- GONG JL, CHEN D, KASHIWABA M, LI Y, CHEN L, TAKEUCHI H, QU H, ROWSE GJ, GENDLER SJ and KUFE D.** Reversal of tolerance to human MUC1 antigen in MUC1 transgenic mice immunized with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1998; 95: 6279-6283.
- 346- CELLUZZI M and FALLO D.** Cutting edge: Physical interaction between dendritic cells and tumor cells results in an immunogen that induces protective and therapeutic tumor rejection. *J Immunol* 1998; 160: 3081-3085.
- 347- WANG J, SAFFOLD S, CAO X, KRAUSS J and CHEN W.** Eliciting T cell immunity against poorly immunogenic tumors by immunization with dendritic cell-tumor fusion vaccines. *J Immunol* 1998; 161: 5516-5524.
- 348- LESPAGNARD L, METTENS P, VERHEYDEN AM, TASIAUX N, THIELEMANS K, VAN MEIRVENNE S, GELDHOF A, DE BAETSELIER P, URBAIN J, LEO O and MOSER M.** Dendritic cells fused with mastocytoma cells elicit therapeutic antitumor immunity. *Int J Cancer* 1998; 76 (2): 250-258.
- 349- ORENTAS RJ, SCHAUER D, BIN Q and JOHNSON BD.** Electrofusion of a weakly immunogenic neuroblastoma with dendritic cells produces a tumor vaccine. *Cell Immunol* 2001; 213 (1): 4-13.

- 350- HAYASHI T, TANAKA H, TANAKA J, WANG R, AVERBOOK BJ, COHEN PA and SHU S.** Immunogenicity and therapeutic efficacy of dendritic-tumor hybrid cells generated by electrofusion. *Clin Immunol* 2002; 104 (1):14-20.
- 351- AKASAKI Y, KIKUCHI T, HOMMA S, ABE T, KOFE D and OHNO T.** Antitumor effect of immunizations with fusions of dendritic and glioma cells in a mouse brain tumor model. *J Immunother* 2001; 24 (2): 106-113.
- 352- ZHANG H, ZHENG SS, JIANG GP, WU LH, ZHU F and YANG ZL.** Antitumor effect of immunization with fusion of dendritic cells and hepatocellular carcinoma cells in mice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3 (2): 235-240.
- 353- YU Z, FAN Q, HAO X and LONG H.** Specific antitumor effects of tumor vaccine produced by electrofusion between osteosarcoma cell and dendritic cell in rats. *Cell Mol Immunol* 2004; 1 (6): 454-460.
- 354- KUGLER A, STUHLER G, WALDEN P, ZOLLER G, ZOBYWALSKI A, BROSSART P, TREFZER U, ULLRICH S, MULLER CA, BECKER V, GROSS AJ, HEMMERLEIN B, KANZ L, MULLER GA and RINGERT RH.** Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med* 2000; 6 (3): 332-336.
- 355- KUGLER A, SESEKE F, THELEN P, STUHLER G, MULLER C and RINGERT RH.** Autologous and allogenic hybrid cell vaccine in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Br J Urol* 1998; 82: 487.
- 356- AVIGAN A.** Dendritic cell-tumor fusion vaccines for renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10 (suppl): 6347-6352.
- 357- KRAUSE SW, NEUMANN C, SORURI A, MAYER S, PETERS JH and ANDREESEN R.** The treatment of patients with disseminated malignant melanoma by vaccination with autologous cell hybrids of tumor cells and dendritic cells. *J Immunother* 2002; 25: 421-428.
- 358- TREFZER U, WEINGART G, CHEN Y, ADRIAN K, AUDRING H, WINTER H, GUO YJ, STERRY W and WALDEN P.** A phase I trial with a hybrid cell vaccine in patients with metastatic melanoma. *Adv Exp Med Biol* 1998; 451: 519-525.
- 359- KIKUCHI T, AKASAKI Y, IRIE M, HOMMA S, ABE T and OHNO T.** Results of a phase I clinical trial of vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells. *Cancer Immunol Immunother* 2001; 50: 337-344.
- 360- GONG JL, AVIGAN D, CHEN DS, WU ZK, KOIDO S, KASHIWABA M and KUFU D.** Activation of antitumor cytotoxic T lymphocytes by fusions of human dendritic cells and breast carcinoma cells. 2000; 97: 2715-2718.
- 361- GONG JL, NIKRUI N, CHEN DS, KOIDO S, WU ZK, TANAKA Y, CANNISTRA S, AVIGAN D and KUFU D.** Fusions of human ovarian carcinoma cells with autologous or allogeneic dendritic cells induce antitumor immunity. *J Immunol* 2000; 165: 1705-1711.
- 362- NEIL G and ZIMMERMANN U.** Electrofusion. *Methods Enzymol* 1993; 220: 174-196.
- 363- WHITE KL.** Electrofusion of mammalian cells. *Methods Mol* 1995; 48: 283-293.

- 364- LUI Y, ZHANG W, CHAN T, SAXENA A and XIANG J.** Engineered fusion hybrid vaccine of IL-4 gene-modified myeloma and relative mature dendritic cells enhances antitumor immunity. *Leuk Res* 2002; 26 (8): 757-763.
- 365- ALIJAGIC S, MOLLER P, ARTUC M, JURGOVSKY K, CZARNETZKI BM and SCHADENDORF D.** Dendritic cells generated from peripheral blood transfected with human tyrosinase induce specific T cell activation. *Eur J Immunol* 1995; 25: 3100-3107.
- 366- REEVES ME, ROYAL RE, LAM JS, ROSENBERG SA and HWO P.** Retroviral transduction of human dendritic cells with a tumor-associated antigen gene. *Cancer Res* 1996; 56: 5672-5677.
- 367- KIM CJ, PREVETTE T, CORMIER J, OVERWIJK W, RODEN M, RESTIFO NP, ROSENBERG SA and MARINCOLA FM.** Dendritic cells infected with poxviruses encoding MART-1/Melan A sensitize T lymphocytes in vitro. *J Immunother* 1997; 20: 276-286.
- 368- PHILIP R, ALTERS SE, BRUNETTE E, ASHTON J, GADEA J, YAU J, LEBKOWSKI J and PHILIP M.** Dendritic cells loaded with MART-1 peptide or infected with adenoviral construct are functionally equivalent in the induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocyte responses in patients with melanoma. *J Immunother* 2000; 23: 168-176.
- 369- BUTTERFIELD LH, JILANI SM, CHAKRABORTY NG, BUI LA, RIBAS A, DISSETTE VB, LAU R, GAMRADT SC, GLASPY JA, McBRIDE WH, MUKHERJI B and ECONOMOU JS.** Generation of melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells transduced with a MART-1 adenovirus. *J Immunol* 1998; 161: 5607-5613.
- 370- RIBAS A, BUTTERFIELD LH, McBRIDE WH, JILANI SM, BUI LA, VOLLMER CM, LAU R, DISSETTE VB, HU B, CHEN AY, GLASPY JA and ECONOMOU JS.** Genetic immunization for the melanoma antigen MART-1/Melan-A using recombinant adenovirus-transduced murine dendritic cells. *Cancer Res* 1997; 57: 2865-2869.
- 371- RIBAS A, BUTTERFIELD LH, McBRIDE WH, DISSETTE VB, KOH A, VOLLMER CM, HU B, CHEN AY, GLASPY JA and ECONOMOU JS.** Characterization of antitumor immunization to a defined melanoma antigen using genetically engineered murine dendritic cells. *Cancer Gene Ther* 1999; 6: 523-536.
- 372- ARTHUR JF, BUTTERFIELD LH, ROTH MD, BUI LA, KIERTSCHER SM, LAU R, DUBINETT S, GLASPY J, McBRIDE WH and ECONOMOU JS.** A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells. *Cancer Gene Ther* 1997; 4: 17-25.
- 373- Van TENDELOO VF, PONSARTS P, LARDON F, NIJS G, LENJOU M, Van BROECKHOVEN C, Van BOCKSTAELE DR and BERNEMAN ZN.** Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood* 2001; 98: 49-56.
- 374- REA D, SCHAGEN FH, HOEBEN RC, MEHTALI M, HAVENGA MJ, TOES RE, MELIEF CJ and OFFRINGA R.** Adenoviruses activate human dendritic cells without polarization toward a T-helper type 1-inducing subset. *J Virol* 1999; 73: 10245-10253.
- 375- BROSSART P, GOLDRATH AW, BUTZ EA, MARTIN S and BEVAN MJ.** Virus-mediated delivery of antigenic epitopes into dendritic cells as a means to induce CTL. *J Immunol* 1997; 158: 3270-3276.

- 376- BOCZKOWSKI D, NAIR SK, SNYDER D and GILBOA E.** Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med* 1996; 184: 465-472.
- 377- GILBOA E, NAIR SK and LYERLY HK.** Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 1998; 46 (2): 82-87.
- 378- ASHLEY DM, FAIOLA B, NAIR SK, HALE LP, BIGNER DD and GILBOA E.** Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce anti-tumor immunity against central nervous system tumors. *J Exp Med* 1997; 186: 1177-1182.
- 379- NENCIONI A, MULLER MR, GRUNEBACH F, GARUTI A, MINGARI MC, PATRONE F, BALLESTRERO A and BROSSART P.** Dendritic cells transfected with tumor RNA for the induction of antitumor CTL in colorectal cancer. *Cancer Gene Ther* 2003; 10 (3): 209-214.
- 380- MILAZZO C, REICHARDT VL, MULLER MR, GRUNEBACH F and BROSSART P.** Induction of myeloma-specific cytotoxic T cells using dendritic cells transfected with tumor-derived RNA. *Blood* 2003; 101 (3): 977-982.
- 381- HEISER A, MAURICE MA, YANCEY DR, WU NZ, DAHM P, PRUITT SK, BOCZKOWSKI D, NAIR SK, BALLO MS, GILBOA E and VIEWEG J.** Induction of polyclonal prostate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor RNA. *J Immunol* 2001; 166: 2953-2960.
- 382- FROLKIS M, FISCHER MB, WANG Z, LEBKOWSKI JS, CHIU CP and MAJUMDAR AS.** Dendritic cells reconstituted with human telomerase gene induce potent cytotoxic T-cell response against different types of tumors. *Cancer Gene Ther* 2003; 10 (3): 239-249.
- 383- SU Z, DANNULL J, YANK BK, DAHM P, COLEMAN D, YANCEY D, SICHU S, NIEDZWIECKI D, BOCZKOWSKI D, GILBOA E and VIEWEG J.** Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. *J Immunol* 2005; 174: 3798-3807.
- 384- FEVRIER B and RAPOSO G.** Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 415-421.
- 385- DENZER K, KLEIJMEER MJ, HEIJNEN HF, STOORVOGEL W and GEUZE H.** Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intracellular signaling device. *J Cell Sci* 2000; 113 (19): 3365-3374.
- 386- THERY C, REGNAULT A, GARIN J, WOLFERS J, ZITVOGEL L, RICCIARDI-CASTAGNOLI P, RAPOSO G and AMIGORENA S.** Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol* 1999; 147: 599-610.
- 387- CABY MP, LANKAR D, VINCENDEAU-SCHERRER C, RAPOSO G and BONNEROT C.** Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol* 2005; 17: 879-887.
- 388- NAVABI H, CROSTON D, HOBOT J, CLAYTON A, ZITVOGEL L, JASANI B, BAILEY-WOOD R, WILSON K, TABI Z, MASON MD and ADAMS M.** Preparation of human ovarian cancer ascites-derived exosomes for a clinical trial. *Blood Cells Mol Dis* 2005; 35: 149-152.

- 389- ANDRE F, SCHATZ NE, CHAPUT N, FLAMENT C, RAPOSO G, AMIGORENA S, ANGEVIN E and ZITVOGEL L.** Tumor-derived exosomes: a new source of tumor rejection antigens. *Vaccine* 2002; 20 (4): 28-31.
- 390- ZITVOGEL L, REGNAULT A, LOZIER A, WOLFERS J, FLAMENT C, TENZA D, RICCIARDI-CASTAGNOLI P, RAPOSO G and AMIGORENA S.** Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 1998; 4: 594-600.
- 391- ANDRE F, CHAPUT N, SCHATZ NE, FLAMENT C, AUBERT N, LEMONNIER F, RAPOSO G, ESCUDIER B, HSU DH, TURSZ T, AMIGORENA S, ANGEVIN E and ZITVOGEL L.** Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC classI/peptide complexes to dendritic cells. *J Immunol* 2004; 172: 2126-2136.
- 392- VINCENT-SCHNEIDER H, STUMPTNER-CUVETETTE P, LANKAR D, PAIN S, RAPOSO G, BENAROCH P and BONNEROT C.** Exosomes bearing HLA-DR1 molecules need dendritic cells to efficiently stimulate specific T cells. *Int Immunol* 2002; 14: 713-722.
- 393- SEGURA E, AMIGORENA S and THERY C.** Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses. *Blood Cells Biol Dis* 2005; 35: 89-93.
- 394- SEGURA E, NICCO C, LOMBARD B, VERON P, RAPOSO G, BATTEUX F, AMIGORENA S and THERY C.** ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naïve T-cell priming. *Blood* 2005; 106: 216-223.
- 395- ESCUDIER B, DORVAL T, CHAPUT N, ANDRE F, CABY MP, NOVAULT S, FLAMENT C, LEBOULAIRE C, BORG C, AMIGORENA S, BOCCACCIO C, BONNEROT C, DHELLIN O, MOVASSAGH M, PIPERNO S, ROBERT C, SERRA V, VALENTE N, LE PECQ JB, SPATZ A, LANTZ O, TURSZ T, ANGEVIN E and ZITVOGEL L.** Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med* 2005; 3: 10.
- 396- MORSE MA, GARST J, OSADA T, KHAN S, HOBEIKA A, CLAY TM, VALENTE N, SHREENIWAS R, SUTTON MA, DELCAYRE A, HSU DH, LE PECQ JB and LYERLY HK.** A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Transl Med* 2005; 3: 9.
- 397- ABUSAMRA AJ, ZHONG Z, ZHENG X, LI M, ICHIM TE, CHIN JL and MIN WP.** Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. *Blood Cells Mol Dis* 2005; 35: 169-173.
- 398- BELARDELLI F and FERRANTINI M.** Cytokines as a link between innate and adoptive antitumor immunity. *Trends Immunol* 2002; 23: 201-208.
- 399- BORELLO I and PARDOLL D.** GM-CSF-based cellular vaccines: a review of the clinical experience. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 185-193.
- 400- BELARDELLI F, FERRANTINI M, PROIETTI E and KIRKWOOD JM.** Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 119-134.
- 401- COLOMBO MP and TRINCHIERI G.** Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 155-168.

- 402- NISHIOKA Y, HIRAO M, ROBBINS PD, LOTZE MT and TAHARA H.** Induction of systemic and therapeutic antitumor immunity using intratumoral injection of dendritic cells genetically modified to express interleukin 12. *Cancer Res* 1999; 59: 4035-4041.
- 403- TUTING T, WILSON CC, MARTIN DM, KASAMON YL, ROWLES J, MA DI, SLINGLUFF CL Jr, WAGNER SN, Van der BRUGGEN P, BAAR J, LOTZE MT and STORKUS WJ.** Autologous human monocyte-derived dendritic cells genetically modified to express melanoma antigens elicit primary cytotoxic T cell responses in vitro: enhancement by cotransfection of genes encoding the Th1-biasing cytokines IL-12 and IFN-alpha. *J Immunol* 1998; 160: 1139-1147.
- 404- ASSELIN-PATUREL C, LASSAU N, GUINEBRETIERE JM, ZHANG J, GAY F, BEX F, HALLEZ S, LECLERE J, PERONNEAU P, MAMI-CHOUAIB F and CHOUAIB S.** Transfer of the murine interleukin-12 gene in vivo by a Semliki forest virus vector induces B16 tumor regression through inhibition of tumor blood vessel formation monitored by Doppler ultrasonography. *Gene Ther* 1999; 6: 606-615.
- 405- WESTERMANN J, AICHER A, QUIN Z, CAYEUX Z, DAEMEN K, BLANKENSTEIN T, DORKEN B and PEZZUTTO A.** Retroviral interleukin-7 gene transfer into human dendritic cells enhances T cell activation. *Gene Ther* 1998; 5: 264-271.
- 406- MILLER PW, SHARMA S, STOLINA M, BUTTERFIELD LH, LUO J, LIN Y, DOHADWALA M, BATRA RK, WU L, ECONOMOU JS and DUBINETT SM.** Intratumoral administration of adenoviral interleukin-7 gene-modified dendritic cells augments specific antitumor immunity and achieves tumor eradication. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 53-65.
- 407- LIU Y, ZHANG W, CHAN T, SAXENA A and XIANG J.** Engineered fusion hybrid vaccine of IL-4 gene-modified myeloma and relative mature dendritic cells enhances antitumor immunity. *Leuk Res* 2002; 26 (8): 757-763.
- 408- OZAWA H, DING W, TORÜ H, HOSOI J, SEIFFERT K, CAMPTON K, HACKETT NR, TOPF N, CRYSTAL RG and GRANSTEIN RD.** Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer to dendritic cells or epidermal cells augments their antigen-presenting function including induction of anti-tumor immunity. *J Invest Dermatol* 1999; 113 (6): 999-1005.
- 409- CURIEL-LEWANDROWSKI C, MAHNKE K, LABEUR M, ROTERS B, SCHMIDT W, GRANSTEIN RD, LUGER TA, SCHWARZ T and GRABBE S.** Transfection of immature murine bone marrow-derived dendritic cells with the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene potently enhances their in vivo antigen-presenting capacity. *J Immunol* 1999; 163: 174-183.
- 410- CAO X, ZHANG W, WANG J, ZHANG M, HUANG X, HAMADA H and CHEN W.** Therapy of established tumour with a hybrid cellular vaccine generated by using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor genetically modified dendritic cells. *Immunology* 1999; 97: 616-625.
- 411- KIKUCHI T, MOORE MA and CRYSTAL RG.** Dendritic cells modified to express CD40 ligand elicit therapeutic immunity against preexisting murine tumors. *Blood* 2000; 96 (1): 91-99.

- 412- KIKUCHI T, MIYAZAWA N, MOORE MA and CRYSTAL RG.** Tumor regression induced by intratumor administration of adenovirus vector expressing CD40 ligand and naïve dendritic cells. *Cancer Res* 2000; 60: 6391-6395.
- 413- KIKUCHI T, WORGALL S, SINGH R, MOORE MA and CRYSTAL RG.** Dendritic cells genetically modified to express CD40 ligand and pulsed with antigen can initiate antigen-specific humoral immunity independent of CD4+ T cells. *Nat Med* 2000; 6: 1154-1159.
- 414- CHEN HW, HUANG HI, LEE YP, CHEN LL, LIU HK, CHENG ML, TSAI JP, TAO MH and TING CC.** Linkage of CD40L to a self-tumor antigen enhances the antitumor immune responses of dendritic cell-based treatment. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51 (6): 341-348.
- 415- HODGE JW, RAD AN, GROSENBACH DW, SABZEVARI H, YAFAL AG, GRITZ L and SCHLOM J.** Enhanced activation of T cells by dendritic cells engineered to hyperexpress a triad of costimulatory molecules. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1228-1239.
- 416- MARSHALL JL, GULLEY JL, ARLEN PM, BEETHAM PK, TSANQ KY, STACK R, HODGE JW, DOREN S, GROSENBACH DW, HWANQ J, FOX E, ODOQWU L, PARK S, PANICALI D and SCHLOM J.** Phase I study of sequential vaccinations with fowlpox-CEA(6D)-TRICOM alone and sequentially with vaccinia-CEA(6D)-TRICOM, with and without granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, in patients with carcinoembryonic antigen-expressing carcinomas. *J Clin Oncol* 2005; 23: 720-731.
- 417- CAO X, ZHANG W, HE L, XIE Z, MA S, TAO Q, YU Y, HAMADA H and WANG J.** Lymphotoxin gene-modified bone marrow dendritic cells act as more potent adjuvants for peptide delivery to induce specific antitumor immunity. *J Immunol* 1998; 161: 6238-6244.
- 418- ZHANG W, HE L, YUANG Z, XIE Z, WANG J, HAMADA H and CAO X.** Enhanced therapeutic efficacy of tumor RNA-pulsed dendritic cells after genetic modification with lymphotoxin. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 1151-1161.
- 419- YANG SC, HILLINGER S, RIEDL K, ZHANG L, ZHU L, HUANG M, ATIANZAR K, KUO BY, GARDNER B, BATRA RK, STRIETER RM, DUBINETT SM and SHARMA S.** Intra-tumoral administration of dendritic cells overexpressing CCL21 generates systemic antitumor responses and confers tumor immunity. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2891-2901.
- 420- MATSUYOSHI H, SENJU S, HIRATA S, YOSHITAKE Y, UEMURA Y and NISHIMURA Y.** Enhanced priming of antigen-specific CTLs in vivo by embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing chemokine along with antigenic protein: application to antitumor vaccination. *J Immunol* 2004; 172: 776-786.
- 421- PIRTSKHALAISHIRLI G, SHURIN GV, GAMBOTTO A, ESCHE C, WAHL M, YURKOVETSKY ZR, ROBBINS PD and SHURIN MR.** Transduction of dendritic cells with Bcl-XL increases their resistance to prostate cancer-induced apoptosis and antitumor effect in mice. *J Immunol* 2000; 165: 1956-1964.
- 422- MARTIN-FONTECHA A, SEBASTIANI S, HOPKEN UE, UGUCCIONI M, LIPP M, LANZAVECCHIA A and SALLUSTO F.** Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* 2003; 198: 615-621.

- 423- EGGERT AO, SCHREURS MJ, BOERMAN OC, OYEN WJC, de BOER AJ, PUNT CA, FIGDOR CG and ADEMA GJ.** Biodistribution and vaccine efficiency of murine dendritic cells are dependent on the route of administration. *Cancer Res* 1999; 59: 3340-3345.
- 424- MORSE MA, COLEMAN RE, AKABANI G, NIEHAUS N, COLEMAN D and LYERLY HK.** Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res* 1999; 59: 56-58.
- 425- FONG L, BROCKSTEDT D, BENIKE C, WU L and ENGLEMAN EG.** Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *J Immunol* 2001; 166: 4254-4259.
- 426- MULLINS DW, SHEASLEY SL, REAM RM, BULLOCK TN, FU YX and ENGELHARD VH.** Route of immunization with peptide-pulsed dendritic cells controls the distribution of memory and effector T cells in lymphoid tissues and determines the patterns of regional tumor control. *J Exp Med* 2003; 198: 1023-1034.
- 427 MORIKAWA Y, TOKYA K, ISHIDA H, MATSUURA N and KAKUDO K.** Different migration patterns of antigen-presenting cells correlate with Th1/Th2-type responses in mice. *Immunology* 1995; 85: 575-581.
- 428- DILLON SM, GRIFFIN JFT, HART DNJ, WATSON JD and BAIRD MA.** A long-lasting IFN-alpha response is induced to a single inoculation of antigen-pulsed dendritic cells. *Immunol* 1998; 95: 132-140.
- 429- SMITHERS M, O'CONNELL K, Mac FADYEN S, CHAMBERS M, GREENWOOD K, BOYCE A, ABDUL-JABBAR I, BARKER K, GRIMMETT K, WALPOLE E and THOMAS R.** Clinical response after intradermal immature dendritic cell vaccination in metastatic melanoma is associated with immune response to particulate antigen. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52: 41-52.
- 430- MACKENSEN A, KRAUSE T, BLUM U, UHRMEISTER P, MERTELSMANN R and LINDEMANN A.** Homing of intravenously and intralymphatically injected human dendritic cells generated in vitro from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Cancer Immunol Immunother* 1999; 48: 118-122.
- 431- TRIOZZI PL, KHURRAM R, ALDRICH WA, WALKER MJ, KIM JA and JAYNES S.** Intratumoral injection of dendritic cells derived in vitro in patients with metastatic cancer. *Cancer* 2000; 89: 2646-2654.
- 432- BEDROSIAN I, MICK R, XU S, NISENBAUM H, FARIES M, ZHANG P, COHEN PA, KOSKI G and CZERNIECKI BJ.** Intranodal administration of peptide-pulsed mature dendritic cell vaccines results in superior CD8+ T-cell function in melanoma patients. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3826-3835.
- 433- OCHSENBEIN AF, KLENERMAN P, KARRER U, LUDEWIG B, PERICIN M, HENGARTNER H and ZINKERNAGEL RM.** Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1999; 96 (5): 2233-2238.
- 434- NAKAGAWA R, SERIZAWA I, MOTOKI K, SATO M, UENO H, IJIMA R, NAKAMURA H, SHIMOSAKA A and KOEZUKA Y.** Antitumor activity of alpha-galactosylceramide, KR7000, in mice with the melanoma B16 hepatic metastasis and immunohistological study of tumor infiltrating cell. *Oncol Res* 2000; 12: 51-58.

FOGACCI-SCHEINER Camille

**CELLULES DENDRITIQUES ET IMMUNOTHERAPIE
ANTICANCEREUSE-ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

Thèse Vétérinaire : Lyon , le 28 janvier 2008

RESUME :

Les cellules dendritiques chez l'Homme et les carnivores domestiques sont considérées comme les meilleures cellules présentatrices d'antigènes, qu'ils soient d'origine bactérienne, virale ou tumorale.

Leur capacité à stimuler les lymphocytes T spécifiques les rend responsables de l'initiation des réponses immunes primaires.

Le phénomène d'échappement rencontré lors du développement d'un processus tumoral a été la source des recherches mises en œuvre afin d'optimiser l'efficacité des cellules dendritiques et par là-même l'immunité anti-tumorale.

Après un rappel des connaissances physiologiques acquises sur les cellules dendritiques, il était intéressant de faire le bilan de leur utilisation en immunothérapie anticancéreuse pour en définir les avantages, les inconvénients et les perspectives d'avenir.

MOTS CLES :

- cellules dendritiques
- immunothérapie anticancéreuse
- cellule de Langerhans
- cellule présentatrice d'antigène

JURY :

Président :	Monsieur le Professeur J-Y. SCOAZEC
1er Assesseur :	Monsieur le Professeur T. MARCHAL
2ème Assesseur :	Monsieur le Professeur F. PONCE

DATE DE SOUTENANCE :

Le 28 janvier 2008

ADRESSE DE L'AUTEUR :

34, rue du président Edouard Herriot
69001 LYON