



**HAL**  
open science

**Potentiel des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans  
l'immunité anti-tumorale : nature de la réponse T  
induite par des pDC activées par différents ligands  
TLR : étude de candidats adjuvants au vaccin  
immunothérapeutique**

Bruno Revol

► **To cite this version:**

Bruno Revol. Potentiel des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans l'immunité anti-tumorale : nature de la réponse T induite par des pDC activées par différents ligands TLR : étude de candidats adjuvants au vaccin immunothérapeutique. Sciences pharmaceutiques. 2011. dumas-00604387

**HAL Id: dumas-00604387**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00604387>**

Submitted on 28 Jun 2011

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

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

**UNIVERSITÉ GRENOBLE I  
UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE  
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

**ANNÉE : 2011**

**N° .....**

**THÈSE**

Présentée  
À L'UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE  
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE  
DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE I

Pour l'obtention du diplôme d'État de :

**DOCTEUR EN PHARMACIE**

PAR : **Bruno REVOL**

Né le 19/IX/1986 à Rillieux-la-Pape (Rhône)

Titre de la thèse :

**Potentiel des cellules dendritiques plasmacytoïdes  
dans l'immunité anti-tumorale : nature de la  
réponse T induite par des pDC activées par  
différents ligands TLR**

*Étude de candidats adjuvants au vaccin immunothérapeutique*

Présentée et soutenue publiquement le 17/VI/2011

**DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :**

**Président :**

**Dr Benoit ALLENET** (UJF-CNRS UMR 5525, Grenoble)

**Membres :**

**Dr Laurence CHAPEROT** (UJF-INSERM U823, EFS, Grenoble)

**Pr Emmanuel DROUET** (UJF-EMBL-CNRS UMR 5233, Grenoble)

**Dr Benoit BUSSER** (UJF-INSERM U823, IAB, Grenoble)

**UNIVERSITÉ GRENOBLE I  
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE**  
Domaine de la Merci 387000 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**  
Vice-Doyen et directeur des Études : Mme **Edwige NICOLLE**

**Année 2010-2011**

**PROFESSEURS À L'UFR DE PHARMACIE (N=17)**

<b>BAKRI</b>	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
<b>BOUMENDJEL</b>	Ahcène	Chimie Organique (DPM)
<b>BURMEISTER</b>	Wilhelm	Physique (UVHCI)
<b>CALOP</b>	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
<b>DANEL</b>	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU, PU-PH)
<b>DECOUT</b>	Jean-Luc	Chimie Inorganique (DPM)
<b>DROUET</b>	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
<b>DROUET</b>	Emmanuel	Microbiologie (UVHCI)
<b>FAURE</b>	Patrice	Biochimie (HP2, PU-PH)
<b>GODIN-RIBUOT</b>	Diane	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
<b>GRILLOT</b>	Renée	Parasitologie - Mycologie Médicale (Doyen, LAPM, PU-PH)
<b>LENORMAND</b>	Jean-Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (Therex, TIMC-IMAG)
<b>PEYRIN</b>	Éric	Chimie Analytique (DPM)
<b>SEVE</b>	Michel	Biochimie - Biotechnologie (IAB, PU-PH)
<b>RIBUOT</b>	Christophe	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
<b>ROUSSEL</b>	Anne-Marie	Biochimie Nutrition (LBFA)
<b>WOUESSIDJEWÉ</b>	Denis	Pharmacotechnie (DPM)

**PROFESSEURS ASSOCIÉS (PAST) (N=3)**

<b>BELLET</b>	Béatrice	Pharmacie Clinique
<b>RIEU</b>	Isabelle	Qualitologie (Praticien attaché, CHU)
<b>TROUILLER</b>	Patrice	Santé publique (PH, CHU)

**PROFESSEUR AGRÉGÉ (PRAG) (N=1)**

<b>GAUCHARD</b>	Pierre Alexis	Chimie (DPM)
-----------------	---------------	--------------

**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire

**DPM** : Département de Pharmacochimie Moléculaire

**HP2** : Hypoxie Physiopathologie respiratoire et Cardiovasculaire

**IAB** : Institut Albert Bonniot

**LAPM** : Laboratoire Adaptation et Pathogénèse des Microorganismes

**LBFA** : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

**LCIB** : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie

**LR** : Laboratoire des Radio pharmaceutiques

**PAST** : Professeur Associé à Temps Partiel

**PRAG** : Professeur Agrégé

**TIMC-IMAG** : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition

**UVHCI** : Unit of Virus Host Cell Interactions

**UNIVERSITÉ GRENOBLE I  
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE**  
Domaine de la Merci 387000 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**  
Vice-Doyen et directeur des Études : Mme **Edwige NICOLLE**

**Année 2010-2011**

**MAITRES DE CONFÉRENCES DE PHARMACIE (N=34)**

<b>ALDEBERT</b>	Delphine	Parasitologie - Mycologie (LAPM)
<b>ALLENET</b>	Benoit	Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG, MCU-PH)
<b>BATANDIER</b>	Cécile	Nutrition et Physiologie (LBFA)
<b>BRETON</b>	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (LCIB - LAN)
<b>BRIANCON-MARJOLLET</b>	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
<b>BUDAYOVA SPANO</b>	Monika	Biophysique (IBS)
<b>CAVAILLES</b>	Pierre	Biologie Cellulaire et Génétique (LAPM)
<b>CHOISNARD</b>	Luc	Pharmacotechnie (DPM)
<b>DELETRAZ-DELPORTE</b>	Martine	Droit Pharmaceutique
<b>DEMEILLIERS</b>	Christine	Biochimie (LBFA)
<b>DURMORT-MEUNIER</b>	Claire	Biotechnologies (IBS)
<b>GEZE</b>	Annabelle	Pharmacotechnie (DPM)
<b>GERMI</b>	Raphaële	Microbiologie (UVHCI, MCU-PH)
<b>GILLY</b>	Catherine	Chimie Thérapeutique (DPM)
<b>GROSSET</b>	Catherine	Chimie Analytique (DPM)
<b>GUIEU</b>	Valérie	Chimie Analytique (DPM)
<b>HININGER-FAVIER</b>	Isabelle	Biochimie (LBFA)
<b>JOYEUX-FAURE</b>	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
<b>KHALEF</b>	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
<b>KRIVOBOK</b>	Serge	Biologie Végétale et Botanique (LCBM)
<b>MOUHAMADOU</b>	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (LECA)
<b>MORAND</b>	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (DPM)
<b>MELO DE LIMA</b>	Christelle	Probabilités Biostatistiques (LECA)
<b>NICOLLE</b>	Edwige	Chimie Thérapeutique (DPM)
<b>PERES</b>	Basile	Pharmacognosie (DPM)
<b>PEUCHMAUR</b>	Marine	Chimie Organique (DPM)
<b>PINEL</b>	Claudine	Parasitologie - Mycologie Médicale (GIN, MCU-PH)
<b>RACHIDI</b>	Walid	Biochimie (LCIB)
<b>RAVEL</b>	Anne	Chimie Analytique (DPM)
<b>RAVELET</b>	Corinne	Chimie Analytique (DPM)
<b>SOUARD</b>	Florence	Pharmacognosie (DPM)
<b>TARBOURIECH</b>	Nicolas	Biophysique (UVHCI)
<b>VANHAVERBEKE</b>	Cécile	Chimie Organique (DPM)
<b>VILLET</b>	Annick	Chimie Analytique (VP Form Adjoint UJF, DPM)

### ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (N=2)

<b>BUSSER</b>	Benoît	Biochimie (IAB, AHU - Biochimie)
<b>MONNERET</b>	Denis	Biochimie (HP2, AHU - Biochimie)

### ENSEIGNANTS ANGLAIS (N=3)

<b>COLLE</b>	Pierre Emmanuel	Maître de Conférence
<b>FITE</b>	Andrée	Professeur Certifié
<b>GOUBIER</b>	Laurence	Professeur Certifié

### ATER (N=5)

<b>DEFENDI</b>	Frederica	ATER	Immunologie Médicale (GREPI - TIMC)
<b>GRATIA</b>	Séverine	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (LBFA)
<b>REGENT</b>	Myriam	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (IAB)
<b>ROSSI</b>	Caroline	ATER	Anglais Master ISM (JR)
<b>RUFFIN</b>	Émilie	ATER	Pharmacie Galénique (Therex/TIMC, La Serve)
<b>SAPIN</b>	Émilie	ATER	Physiologie Pharmacologie (HP2)

### MONITEURS ET DOCTORANTS contractuels (N=7)

<b>BOUCHET</b>	Audrey	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Biotechnologie (GIN, ESRF)
<b>DUCAROUGE</b>	Benjamin	(01-10-2008 au 30-09-2011)	Laboratoire HP2 (JR)
<b>FAVIER</b>	Mathieu	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)
<b>GRAS</b>	Emmanuelle	(01-10-2010 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2 (JR)
<b>HAUDECOEUR</b>	Romain	(01-10-2008 au 30-09-2011)	Chimie Thérapeutique (DPM)
<b>LESART</b>	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013)	Informatique C2i
<b>POULAIN</b>	Laureline	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)

**ATER** : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche

**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire

**CIB** : Centre d'Innovation en Biologie

**DPM** : Département de Pharmacochimie Moléculaire

**HP2** : Hypoxie Physiopathologie respiratoire et Cardiovasculaire

**IAB** : Institut Albert Bonniot

**IBS** : Institut de Biologie Structurale

**JR** : Jean Roget

**LAPM** : Laboratoire Adaptation et Pathogénèse des Microorganismes

**LBFA** : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

**LCBM** : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux

**LCIB** : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie

**LECA** : Laboratoire d'Écologie Alpine

**TIMC-IMAG** : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition

**UVHCI** : Unit of Virus Host Cell Interactions

**« La pharmacie est une collection de sciences, un art et une profession »**

*Pr Léon Guignard*



**À mon président de thèse,**

Monsieur,

*Je suis sensible à l'honneur que vous me faites de juger ce travail.*

*Veillez trouver ici la preuve de ma sincère reconnaissance.*

**À mes juges,**

*Vous me faites l'honneur de juger mon travail.*

*Trouvez ici tous mes remerciements.*

---

**Aux membres de l'EFS Rhône-Alpes,**

*Mes remerciements vont d'abord au **Pr Jean Claude Bensa**, directeur scientifique de l'Établissement Français du Sang Rhône Alpes, pour m'avoir ouvert les portes du site de La Tronche ; ainsi qu'à **tous les membres de l'EFS** que j'ai côtoyés, pour leur accueil et leur disponibilité.*

*Je remercie le **Dr Joël Plumas**, directeur de l'équipe 9 de l'U823, située au sein de l'EFS Rhône Alpes, site de La Tronche, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser mon stage de Master 1 sous sa responsabilité, au sein de son laboratoire.*

*Merci au **Dr Laurence Chaperot** qui a accepté d'être mon directeur de thèse. Tu as réussi à me communiquer l'envie de m'investir dans ce projet et à me guider jusqu'à son terme.*

*Merci évidemment au **Dr Jérémie Di Domizio**, mon maître de stage. Merci pour le temps que tu m'as consacré : des rappels d'immunologie fondamentale jusqu'à la rédaction de ce manuscrit en passant par mon autonomie à la paillasse, je mesure l'étendue de ce que j'ai appris et donc l'étendue de ta patience et de ton côté pédagogue. Rien n'aurait été pareil sans ton dynamisme et ton sourire : « Oh maître » !*

*Je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire de recherche pour son attention, ses conseils et la bonne humeur qu'ils suscitent : **Caroline, Dalil, David, Françoise, Jean-Paul et Julie**. Ces moments partagés ont marqué mes débuts en recherche. Des débuts passionnants et dans une ambiance agréable, en attendant la suite !*

*Merci enfin à l'équipe de l'**Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire**, dirigée par le **Dr Marie-Jeanne Richard** et située à Grenoble, pour nous avoir fourni du sang de cordon ombilical humain : matériel précieux nécessaire à cette étude.*

---

**À mes parents,**  
*À qui je dois tout.*

*Les mots me manquent pour vous exprimer à quel point je tiens à vous.*

**À mes amis,** de la faculté, du lycée, de la Pharmacie de l'Alliance et d'ailleurs,  
*Pour tous les bons moments que nous avons passé ensemble et pour tous ceux à venir !*

**À toi Lucie.**

# Sommaire

---

<b>Abréviations</b> .....	<b>6</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>7</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1. La découverte de l'immunité anti-tumorale</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2. Les cellules dendritiques</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2.1. Les cellules dendritiques myéloïdes</b> .....	<b>17</b>
<b>1.2.2. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes</b> .....	<b>19</b>
<b>1.2.3. Une lignée de pDC : les cellules GEN 2.2</b> .....	<b>21</b>
<b>1.3. Les lymphocytes T</b> .....	<b>22</b>
<b>1.3.1. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup></b> .....	<b>23</b>
<b>1.3.2. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup></b> .....	<b>26</b>
<b>1.4. La réponse immunitaire anti-tumorale « idéale »</b> .....	<b>26</b>
<b>1.5. Les pDC en contexte tumoral</b> .....	<b>28</b>
<b>1.5.1. Cancer du sein</b> .....	<b>29</b>
<b>1.5.2. Cancer de l'ovaire</b> .....	<b>30</b>
<b>1.5.3. Cancers de la peau</b> .....	<b>30</b>
<b>1.6. Les pDC en thérapeutique</b> .....	<b>32</b>
<b>1.6.1. Agonistes utilisés</b> .....	<b>33</b>
<b>1.6.2. Utilisation des ligands TLR7 et -9 en tant qu'adjuvants de vaccination contre des pathogènes</b> .....	<b>34</b>
<b>1.6.3. Utilisation des ligands TLR7 et -9 dans le cancer</b> .....	<b>35</b>
<b>1.6.4. Immunothérapie active du cancer et pDC</b> .....	<b>38</b>
<b>1.7. Projet d'étude</b> .....	<b>40</b>
<b>2. Matériels et méthodes</b> .....	<b>42</b>
<b>2.1. Milieux</b> .....	<b>42</b>
<b>2.2. Cellules</b> .....	<b>42</b>
<b>2.3. Conditions de culture d'activation des cellules GEN 2.2</b> .....	<b>42</b>
<b>2.4. Culture mixte leucocytaire et activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par PMA/iono</b> .....	<b>43</b>

2.5. Phénotypage.....	43
2.6. Analyse CBA : Cytometric Bead Array .....	44
2.7. ELISA IFN- $\alpha$ .....	45
2.8. Test d'incorporation de la thymidine tritiée .....	45
3. Résultats .....	46
3.1. Activation des cellules GEN 2.2 .....	46
3.2. Prolifération et activation des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....	49
3.3. Polarisation des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....	51
4. Discussion .....	56
Conclusion .....	60
Références .....	62
Serment des Apothicaires .....	73

## Abréviations

---

**APC-Cy7** : Allo PhycoCyanine/Cyanine 7

**BCG** : Bacille de Calmette et Guérin

**CBA** : Cytometric Bead Array

**CCR** : CC chemokine Receptor

**CDP** : Common Dendritic cell Progenitors

**CLP** : Common Lymphoid Precursor

**CMH** : Complexe Majeur

d'Histocompatibilité

**CMP** : Common Myeloid Precursor

**CPA** : Cellule Présentatrice d'Antigène

**CpG** : Cytosine-phosphate Guanine

**CPM** : Coups Par Minute

**CTL** : Lymphocytes T Cytotoxiques

**Dc** : Cellule Dendritique

**EFS** : Établissement Français du Sang

**FITC** : Isothiocyanate de Fluorescéine

**Foxp3** : Forkhead box P3

**HBSS** : Hank's Balanced Salt Solution

**HLA** : Human Leukocyte Antigen

**IFN- $\alpha/\gamma$**  : Interféron-alpha/gamma

**Ig** : Immunoglobuline

**IL** : Interleukine

**INCA** : Institut National du Cancer

**INPI** : Institut National de la Propriété Industrielle

**ISS** : ImmunoStimulatory Sequences

**LT** : Lymphocyte T

**MAP** : Mitogen Activated-Protein

**mDC** : Myeloid Dendritic Cell

**MFI** : Mean Fluorescence Intensity

**NF $\kappa$ B** : Nuclear Factor-Kappa B

**NK** : Natural Killer

**ODN** : Oligodeoxynucléotides

**PAMPs** : Pathogen Associated Molecular Patterns

**PBMC** : Peripheral-Blood Mononuclear Cell

**pDC** : Plasmacytoid Dendritic Cell

**PC7** : PhycoCyanine 7

**PE** : PhycoErythrine

**PRRs** : Pattern Recognition Receptors

**SSC** : Side Scatter

**ssRNA** : ARN simple brin

**SVF** : Sérum de Veau Foetal

**TH1/2/9/17/22** : Lymphocyte T Helper type 1/2/9/17/22

**TCR** : T Cell Receptor

**TGF- $\beta$**  : Transforming Growth Factor  $\beta$

**TIL** : Tumor Infiltrating Lymphocytes

**TLR** : Toll Like Receptor

**TNF- $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

**TRAIL** : TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand

**Treg** : Lymphocyte T régulateur

**VHB** : Virus de l'Hépatite B

**VIH** : Virus de l'Immunodéficienne Humaine

## Liste des tableaux

---

Tableau I. Expression des TLR par les différentes sous-populations de DC humaines.....	18
Tableau II. Immunophénotype simplifié des DC. ....	20
Tableau III. Exemples d'agonistes de TLR utilisés en immunothérapie. ....	34
Tableau IV. Essais cliniques récents sur l'utilisation de ligands TLR7 et -9 en immunothérapie anti-tumorale. ....	38

## Liste des figures

---

Figure 1. Ontogénie des DC.....	14
Figure 2. Morphologie des pDC.....	19
Figure 3. Morphologie des LT.....	22
Figure 4. Profil des cytokines produites par TH1, TH2, Treg et TH17.....	25
Figure 5. Photo d'une DC dialoguant avec un LT.....	27
Figure 6. Natures possibles de la réponse T induite par des pDC activées par leurs TLR.....	41
Figure 7. Principe du test CBA.....	45
Figure 8. Expression des molécules de co-stimulation CD40 et CD80 par les cellules GEN 2.2 après 24h de culture en présence de milieu (medium), de virus de l' <i>influenza</i> , de R837, de CL097, de CpG A, de CpG B et de HKPG.....	47
Figure 9. Production des cytokines pro-inflammatoires IFN- $\alpha$ , IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$ par les cellules GEN 2.2 après 24h de culture en présence de milieu (medium), de virus de l' <i>influenza</i> , de R837, de CL097, de CpG A, de CpG B et de HKPG.....	48
Figure 10. Degrés de prolifération et d'activation des LT CD4 <sup>+</sup> stimulés par des cellules GEN 2.2 activées.....	50
Figure 11. Fréquences de lymphocytes TH1, TH2 et Treg induits par des cellules GEN 2.2 activées.....	53
Figure 12. Production des cytokines IL-5, IL-13, IL-10 et IFN- $\gamma$ par les LT CD4 <sup>+</sup> après 6 jours de culture en présence de GEN 2.2 activées.....	55

# 1. Introduction

## 1.1. La découverte de l'immunité anti-tumorale

La **découverte** de l'**immunité anti-tumorale** est une histoire pleine de rebondissements qui a débuté au **XIX<sup>ème</sup> siècle**, lorsqu'un chirurgien du Memorial Hospital de New York, **William Coley**, constate des **régressions** de tumeur chez des malades qui développent parallèlement un **épisode infectieux** (Coley 1893). Plus tard, d'autres équipes ont confirmé ce constat : l'injection d'extraits de bactéries à des souris peut entraîner la nécrose hémorragique de leur tumeur. Les substances injectées **stimulent** les défenses immunitaires de l'organisme qui, à leur tour, **limitent la prolifération cancéreuse**.

En **1909**, **Paul Ehrlich** suggère que la prolifération anormale des cellules cancéreuses puisse être **contrôlée** par notre système immunitaire. A l'époque, cette hypothèse fut réfutée en raison de la méconnaissance du système immunitaire et de son fonctionnement.

Dans les **années 1950**, **Frank M. Burnet** et **Lewis Thomas** introduisent le concept d'**immunosurveillance** du cancer en proposant qu'une des fonctions physiologiques du système immunitaire et, en particulier des cellules **T**, soit de reconnaître et détruire les cellules cancéreuses.

Les premières **preuves** de l'**existence** de l'**immunité anti-tumorale** sont elles aussi obtenues dans les années **1950**.

Chez l'animal d'abord : l'application du carcinogène méthylcholanthrène sur la peau d'une souris de laboratoire d'une certaine souche peut induire la formation d'un sarcome. Si ce sarcome est excisé et ensuite transplanté chez la même souris, celle-ci le rejette : elle a développé une **immunité** vis-à-vis de cette tumeur. Si par contre on transplante la tumeur chez une souris non immune, la tumeur prolifère et cette prolifération peut être inhibée par le transfert de cellules **T** de la souris immune.

Chez l'homme ensuite : l'immunité anti-tumorale est suggérée par la découverte au cours d'autopsies, de tumeurs **cliniquement silencieuses** ; ou encore par

l'observation confirmée par des données anatomopathologiques, de **régressions spontanées** de tumeurs. De plus, les cancers sont plus fréquents pendant la période **néonatale** ainsi que chez les **sujets âgés**, deux périodes de la vie au cours desquelles le système immunitaire serait moins efficace. Les cas de cancers sont également plus fréquents chez les sujets **immunodéprimés**, c'est le cas en particulier des tumeurs viro-induites chez des patients traités par **immunosuppresseurs** ou **co-infectés** par le **virus de l'immunodéficience humaine (VIH)**. L'histologie apporte son lot d'arguments favorables à l'existence d'une immunité anti-tumorale : les tumeurs sont souvent infiltrées par des **lymphocytes T (LT)**, **cellules Natural Killer (NK)** et **cellules présentatrices d'Antigène (CPA)**. Les ganglions drainant les tumeurs sont eux aussi infiltrés par des lymphocytes activés. Enfin, la présence d'un infiltrat lymphocytaire dans certains types de cancers, notamment colorectaux est un **critère pronostique favorable** (Pagès *et al.* 2009).

La reconnaissance par les **LT** des **tumeurs humaines**, **preuve définitive** de l'existence de l'**immunité anti-tumorale**, a été démontrée par l'équipe de **T. Boon** de l'Institut Ludwig de Bruxelles, en **1991**. Les travaux expérimentaux à l'origine de cette découverte ont consisté à cultiver des cellules issues d'une biopsie de tumeur primaire, en présence de lymphocytes périphériques autologues. Au cours de cette culture mixte, les lymphocytes reconnaissant des **antigènes tumoraux** prolifèrent et se différencient en **lymphocytes T cytotoxiques (CTL)**, **effecteurs** de l'**immunité anti-tumorale** qui peuvent être **clonés**. Les clones obtenus sont utilisés pour sélectionner des sous-populations de cellules tumorales dont les génomes peuvent être comparés. C'est ainsi que les gènes codants pour ces **antigènes tumoraux** ont été identifiés (Van der Bruggen *et al.* 1991). Dès lors, l'existence de réponses immunitaires spontanées anti-tumorales est communément admise.

Les premiers essais d'**immunothérapie** menés par Coley en 1893 ont encouragé d'autres essais cliniques avec des micro-organismes, comme l'administration du **Bacille de Calmette et Guérin (BCG)** dans le traitement du **mélanome** (Morton *et al.* 1970). Aujourd'hui le terme « immunothérapie » regroupe des stratégies thérapeutiques très différentes selon qu'elles **mobilisent** ou **renforcent** les ressources du système immunitaire du malade (**immunothérapie active**) ou au

contraire qu'elles utilisent des **réactifs immunologiques extérieurs à l'organisme** (immunothérapie passive).

Les **stratégies passives** consistent en l'**injection directe** d'un **effecteur cytotoxique** l'**IFN- $\alpha$** , d'**IL-2** ou d'**anticorps** au patient. Le **transfert de CTL générées ex vivo** constitue également une voie privilégiée de recherche.

L'**IL-2** a été découverte en 1976 dans le surnageant de cultures de lymphocytes (Morgan *et al.* 1976). L'**IL-2** compte tenu de son activité **mitogène** et de sa capacité à activer les **LT** et les **cellules NK**, a été expérimentée dans le traitement des **mélanomes métastatiques** et **carcinomes rénaux** (Rosenberg *et al.* 1989 ; Bukowski *et al.* 1990 ; Parkinson *et al.* 1990). Bien que des régressions aient été observées, les fortes doses d'**IL-2** administrées ont des **effets toxiques** non négligeables (cardiaques, vasculaires, digestifs, syndromes pseudo-grippaux). L'unique indication actuelle de l'**IL-2 humaine (Proleukin®)** est l'**adénocarcinome rénal métastatique**.

L'effet **cytotoxique** de l'**IFN- $\alpha$** , sécrété principalement par les **cellules NK** et les **cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)**, est décrit depuis de nombreuses années dans des modèles de prolifération tumorale (Gresser & Bourali 1970). Des essais cliniques ont été mis œuvre dans les cancers rénaux, les mélanomes, les lymphomes et les leucémies, parfois en association avec l'**IL-2** (Robinson *et al.* 1986 ; Creagan *et al.* 1990 ; Hernberg *et al.* 1999). En France, parmi les indications actuelles de l'**IFN- $\alpha$**  (**Introna®**, **Roféron-A®**, **Viraféronpeg®**, **Pegasys®**) figurent le **myélome multiple**, la **leucémie myéloïde chronique**, certains **lymphomes** ou encore le **mélanome malin**.

L'**IL-12** a également été sujette à des expérimentations, compte tenu de son action sur les **LT**, les **cellules NK** et de son effet **anti-angiogénique**. Alors que la phase I des tests cliniques a démontré son effet immunologique (Robertson *et al.* 1999) et son innocuité (Atkins *et al.* 1997), la phase II a révélé une toxicité sévère menant parfois à la mort des patients (Leonard *et al.* 1997). Les essais avec cette cytokine sont depuis restés marginaux et elle n'est pas commercialisée.

Bien que beaucoup d'antigènes spécifiques de tumeurs soient des **protéines intracellulaires**, certains sont exprimés à la surface de la cellule et peuvent alors être la cible d'anticorps. L'utilisation d'**anticorps monoclonaux** en immunothérapie

s'est largement développée ces dernières années grâce à l'identification croissante d'**antigènes cibles**. Parmi les anticorps monoclonaux qui ont prouvé leur efficacité dans les protocoles cliniques, on peut citer le **rituximab (Mabthera®)** (anti-CD20) indiqué dans la prise en charge des **lymphomes B non Hodgkiniens** (McLaughlin *et al.* 1998) et dont les mécanismes d'action ont notamment été étudiés dans notre laboratoire (Manches *et al.* 2003) ; le **trastuzumab (Herceptin®)** (anti Her2/neu) indiqué dans le traitement du **cancer du sein métastatique** (Slamon *et al.* 2001) ; le **bevacizumab (Avastin®)** (anti-VEGF) dans le traitement de première ligne du **cancer colorectal métastatique** ; l'**alemtuzumab (Mabcampath®)** (anti-CD52) dans les **leucémies lymphoïdes chroniques** (Dumont 2001) ; le **cétuximab (Erbix®)** (anti-EGFR) et le **panitumumab (Vectibix®)** (anti-EGFR) dans le **cancer colorectal métastatique**.

Enfin, parmi les protocoles d'immunothérapie anti-tumorale **passive**, la possibilité d'injecter aux patients des **LT anti-tumoraux générés et sélectionnés ex vivo** à partir du **sang** ou de la **tumeur** paraît prometteuse. Partant de l'observation que des LT spécifiques des cellules tumorales, appelés **Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL)**, sont présents dans certains cancers et de l'identification d'un facteur de croissance de ces lymphocytes, l'**IL2**, le groupe de **Steven Rosenberg** aux Etats-Unis a commencé, dès les **années 1980**, les essais d'**immunothérapie adoptive** chez l'homme par **transfert de TIL**. Ces essais consistent à multiplier *in vitro* les **TIL** de chaque patient à partir de **fragments de sa tumeur**, puis à **réinjecter** un grand nombre de ces TIL par voie intraveineuse, avec des injections d'IL2, systémiques ou sous-cutanées, destinées à favoriser la survie, la multiplication et la fonction des **TIL in vivo**.

L'intérêt pour la **thérapie adoptive** en général et pour le traitement par TIL en particulier a été ravivé au début des années 2000 par les travaux de plusieurs équipes. Deux d'entre elles ont montré que ces lymphocytes peuvent **survivre plusieurs semaines à plusieurs mois** chez les patients et **coloniser** la tumeur (Dudley *et al.* 2002 ; Yee *et al.* 2002). Les équipes apportent des arguments **immunologiques et cliniques** à l'appui d'une efficacité de la **thérapie adoptive par TIL** ou **clones T spécifiques d'antigène de mélanome** pour le traitement de ce cancer (Dudley *et al.* 2002 ; Yee *et al.* 2002 ; Labarriere *et al.* 2002 ; Dreno *et al.* 2002). Depuis, les essais cliniques menés chez des patients atteints de mélanome

métastatique ont démontré la capacité des cellules T transférées à induire une **régression complète** et **durable** de la tumeur (Robbins *et al.* 2010). Néanmoins, des questions importantes, en particulier d'ordre technique, restent à résoudre pour développer des protocoles plus sûrs et plus efficaces, applicables à d'autres pathologies cancéreuses que le mélanome.

À la différence de l'immunothérapie passive (injection d'IFN- $\alpha$ , d'IL-2, d'anticorps ou de CTL générées *ex vivo*), l'**immunothérapie active** ou **vaccination** permet à la fois la mise en place d'une **immunité thérapeutique**, grâce à l'induction d'**effecteurs T spécifiques** et d'une **immunité protectrice** par l'intermédiaire des **LT mémoires** qui contrôlent une éventuelle rechute. La **vaccination** constitue donc la stratégie anti-tumorale la plus attractive, elle sera développée par la suite.

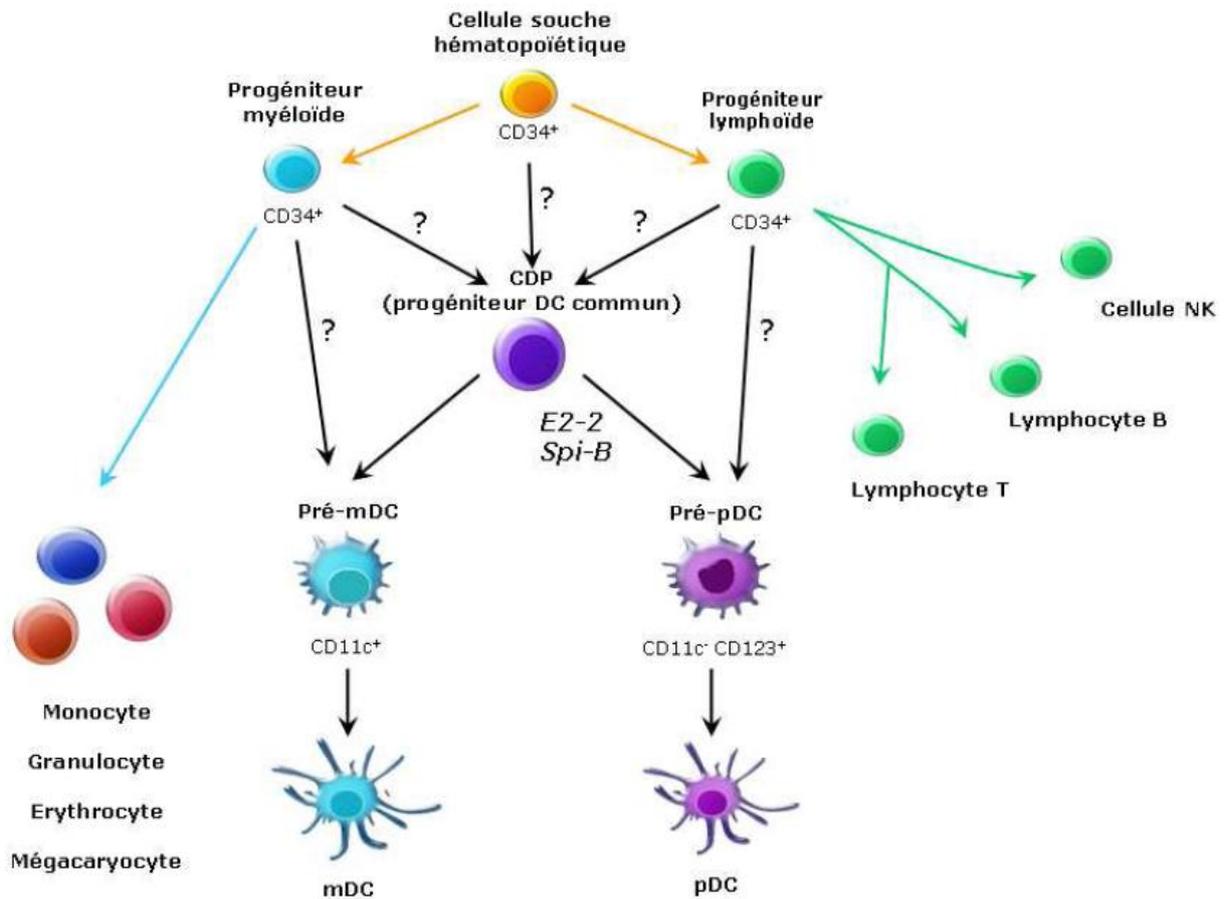
Parmi les différentes voies actuellement explorées dans le domaine de l'immunothérapie anti-tumorale, l'une des plus prometteuses repose sur l'utilisation de cellules du système immunitaire décrites pour la première fois au **XIX<sup>ème</sup> siècle** par l'allemand **Paul Langerhans** (Langerhans 1868) et redécouvertes il y a près de **quarante ans** par les américains **Ralf Steinman** et **Zanvil Cohn** (Steinman & Cohn 1973). Baptisées **cellules dendritiques (DC)**, ces dernières sont longtemps restées peu étudiées. Il a depuis été démontré, tout au moins *in vitro*, que ces cellules sont les CPA les plus efficaces pour engendrer des effecteurs cytotoxiques spécifiques des cellules tumorales.

## 1.2. Les cellules dendritiques

Les DC constituent une **population cellulaire hétérogène**, tant par leurs origines que par leurs fonctions (Banchereau *et al.* 2000).

Au cours de l'hématopoïèse, la **cellule souche hématopoïétique CD34<sup>+</sup>** se différencie en deux progéniteurs : le **progéniteur myéloïde commun (CMP)** et le **progéniteur lymphoïde commun (CLP)** donnant respectivement les lignées cellulaires myéloïdes (monocytes, granulocytes, érythrocytes et mégacaryocytes) et lymphoïdes (lymphocytes, cellules NK).

L'hypothèse la plus récente avance l'existence d'un progéniteur **commun** aux **cellules dendritiques myéloïdes (mDC)** et aux **pDC** : le **progéniteur DC commun (CDP)** (figure 1).



**Figure 1. Ontogénie des DC.**  
D'après Di Domizio (2009a).

Les arguments en faveur d'une **origine commune** des mDC et des pDC sont nombreux. D'une part, plusieurs équipes de recherche ont démontré que les pDC peuvent être générées à partir **à la fois** de **CMP** et de **CLP** dans des modèles d'allotransplantation murins (Shigematsu *et al.* 2004 ; Karsunky *et al.* 2005). D'autre part, Ishikawa et son équipe ont démontrés que l'injection intraveineuse de **CMP** ou de **CLP** humains purifiés chez des souris nouveau-nés dépourvus de système immunitaire permet dans chacun des cas la **différenciation phénotypique de mDC et de pDC** (Ishikawa *et al.* 2007). Ils concluent que les DC humaines utilisent une **voie de différenciation unique et flexible, indépendante** des voies myéloïdes et lymphoïdes classiques.

La définition des DC est arrêtée dans les années 90. Elles répondent à trois critères : ce sont des **CPA** exprimant constitutivement des molécules du **Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe II**, elles sont capables de **stimuler les LT naïfs** et elles présentent une **morphologie dendritique** une fois activées (Steinmann 1991). La présence de dendrites a pour objectif d'augmenter la probabilité de rencontre avec les LT et le cas échéant leur surface de contact renforçant ainsi la **synapse immunologique** (Montoya *et al.* 2002). Seules les **cellules de Langerhans**, sous-type de **mDC** situées dans l'épiderme présentent des dendrites à l'**état inactif**. Celles-ci leur permettent d'augmenter leur surface de contact avec les antigènes et le milieu.

Les DC sont donc des **CPA**. Elles initient les réponses immunes primaires et secondaires et permettent le **lien entre immunité innée et adaptative** (Ito *et al.* 2005a). Les effecteurs induits par les DC sont également capables de **réguler** les réponses immunitaires (Lionel *et al.* 2008).

L'immunité **innée** fournit une réponse **immédiate** à la présence d'un pathogène dans l'organisme. En tant qu'acteurs de l'immunité **innée**, les DC immatures expriment des **Pattern Recognition Receptors (PRRs)**, c'est-à-dire des récepteurs capables de reconnaître des motifs microbiens appelés **Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs)** (Ito *et al.* 2005b). Les DC expriment différents PRRs dont certains **Toll Like Receptors (TLRs)**. Les TLRs sont des récepteurs présents à la surface de la cellule ou endosomaux, de la famille du récepteur à l'**interleukine-1 (IL-1)**. Ils possèdent un **domaine N-terminal extracellulaire** riche en répétitions leucine pour la fixation du ligand, un **domaine transmembranaire** et un **domaine C-terminal intracellulaire** de signalisation.

L'engagement des TLRs par reconnaissance d'un PAMP induit l'**activation** des DC via une **cascade de signalisation**, notamment l'activation des **Mitogen Activated-Protein (MAP) kinases** et du **Facteur Nucléaire Kappa B (NFκB)**, aboutissant à l'expression de **médiateurs inflammatoires** et de molécules nécessaires à la mise en place d'une réponse immune. Le **TLR4** par exemple, premier TLR décrit, est essentiel dans la reconnaissance du **lipopolysaccharide bactérien** (Poltorak *et al.* 1998 ; Hoshino *et al.* 1999). Les voies de signalisation TLR ont notamment été décrites par Takeda & Akira 2004.

Les DC **endocytent** (phagocytose, macropinocytose) les agents pathogènes reconnus via leurs **PRRs**. La cellule dendritique mature acquiert la capacité de **migrer** vers les **organes lymphoïdes secondaires**, elle **apprête** des **peptides antigéniques** et les **présente** en association avec des molécules **HLA de classe I et de classe II** du **CMH** afin d'**activer** les **LT spécifiques** et ainsi permettre la mise en place de l'**immunité adaptative**.

De manière ubiquitaire, l'**apprêtement** et la **présentation** par les cellules des antigènes issus de protéines synthétisées de façon **endogène** (**protéines mutées** dérivées d'une cellule **cancéreuse** ou protéines issues de **micro-organismes intracellulaires** tels que des bactéries ou des virus) est assurée par la **voie endogène**. Celle-ci aboutit à la présentation par les cellules de peptides antigéniques associés aux molécules **HLA de classe I** du **CMH**.

Les DC et les CPA en général, sont également capables de présenter aux LT des antigènes **exogènes** qu'elles auront captés. Les antigènes issus de ces protéines **exogènes** sont internalisés par les DC puis présentés en association aux molécules **HLA de classe II du CMH** : ils empruntent la **voie exogène**. Cette voie ne concerne que les **CPA**, car elles seules expriment à leur surface des molécules **HLA de classe II** du **CMH**, et permettent l'activation des **LT CD4<sup>+</sup>**.

À côté des voies endogène et exogène, il a été démontré que l'**apprêtement** et la **présentation d'antigènes exogènes** par les molécules **HLA de classe I du CMH** est possible dans certaines **CPA**. Cette voie **non conventionnelle**, appelée **cross-présentation**, est cruciale car elle permet l'activation de **LT CD8<sup>+</sup> naïfs** spécifiques d'antigènes **exogènes**, donc la mise en œuvre de réponses immunes protectrices à base de **CTL** à l'encontre de tumeurs (Huang *et al.* 1994) ou de pathogènes n'infectant pas directement les cellules présentatrices d'antigènes (Sigal *et al.* 1999). La **cross-présentation** concerne différentes formes d'antigènes : **solubles**, **particulaires** ou **associés** à des cellules. Elle est spécifique des CPA professionnelles : **DC**, **macrophages** (Rock *et al.* 1990) et principalement décrite avec les **mDC**. La cross-présentation apparaît également comme centrale dans le maintien de la **tolérance** périphérique à l'encontre des **antigènes du soi** (Kurts *et al.* 1997). Des travaux récents prouvent son implication dans le processus de **rejet de greffe** et dans certaines **maladies auto-immunes**. Néanmoins les mécanismes exacts de la cross-présentation sont encore mal connus, ils impliqueraient Nox2 et

sec61 dans les endosomes pour permettre le passage des antigènes vers le cytosol1 (Amigorena & Savina 2010).

La maturation de la DC s'accompagne de l'augmentation de l'expression des molécules **HLA de classe I et II** du **CMH** et des **molécules de co-stimulation** comme **CD40**, **CD80** et **CD86**. Les DC activés sont capables de produire des **cytokines pro-inflammatoires**.

### 1.2.1. Les cellules dendritiques myéloïdes

Les mDC sont des cellules **circulantes** ou **résidentes** de l'organisme. Les pré-mDC, issues du progéniteur médullaire CD34<sup>+</sup>, gagnent le **sang** puis les **tissus périphériques** pour devenir des **mDC immatures**. Elles résident principalement à **l'interface** avec le **milieu extérieur** (la peau, les muqueuses), porte d'entrée de nombreux micro-organismes. Grâce à cette localisation stratégique, elles jouent le rôle de **sentinelles immunologiques** en testant continuellement leur environnement antigénique.

On distingue deux types de mDC immatures tissulaires :

- Les **cellules de Langerhans** sont retrouvées dans l'épiderme, elles expriment **CD1a** et la **langerine**, une lectine de type C associée de manière constitutive à la présence de granules de Birbeck.
- Les **mDC interstitielles** sont retrouvées dans les **tissus conjonctifs** de **nombreux organes (poumons, intestins, cœur, pancréas, reins ou foie)** (Steiniger *et al.* 1984 ; McWilliam *et al.* 1995 ; Kelsall & Strober 1996 ; Thomson *et al.* 1999). Elles ne possèdent pas de granules de Birbeck et n'expriment pas la langerine mais expriment le **facteur XIIIa**, ou plus rarement : **CD1a**. Au niveau des **tissus lymphoïdes (rate, ganglions, thymus)**, on retrouve également des mDC immatures de type **interstitielles** (Ardavin 1997 ; Vremec *et al.* 2000).

D'une façon générale, les mDC sont caractérisées par le phénotype suivant : **linéage<sub>neg</sub> CD4<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD123<sub>low</sub>**. Le terme **linéage<sub>neg</sub>** désigne l'absence d'expression des marqueurs de lignée T (CD3), B (CD19), NK (CD56) et monocyte (CD14).

Dans une situation pathologique, les tissus lésés ou infectés par un pathogène et en particulier les **mDC résidentes** vont sécréter des **chimiokines** dites « inflammatoires » afin de recruter les **mDC circulantes**, qui expriment les récepteurs adéquats comme **CCR1** ou **CCR5**, et les **autres cellules immunes environnantes**.

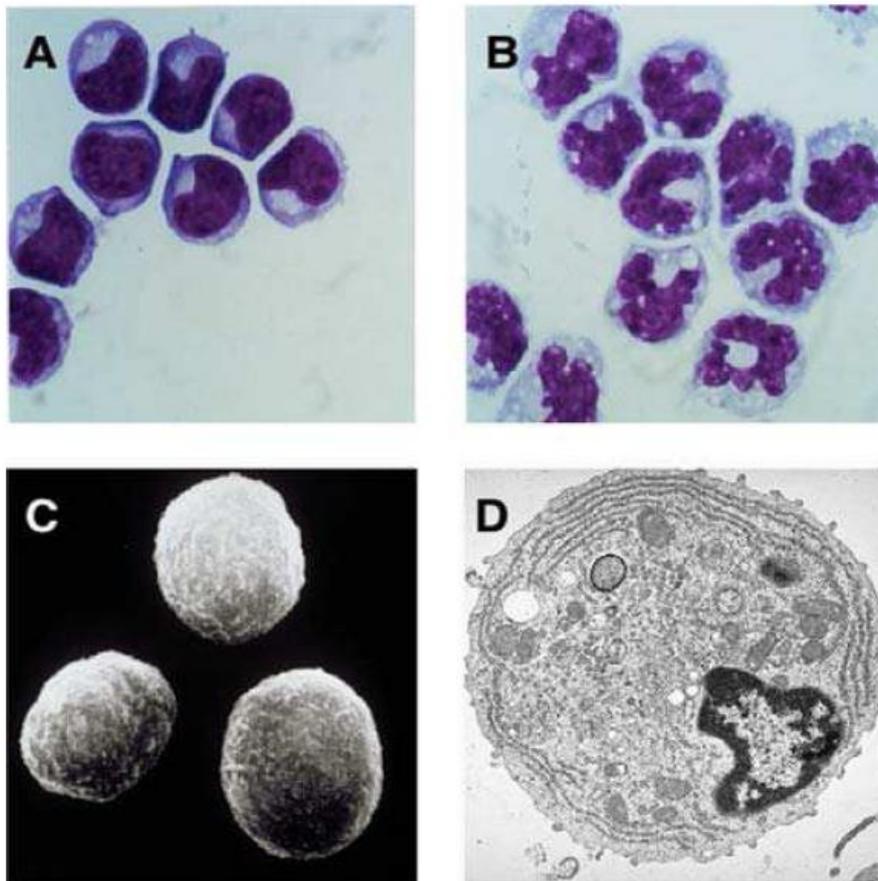
Les mDC expriment les **TLR1, -2, -3, -4, -5, -6, -8 et -10** (tableau I). Ce profil d'expression permet aux mDC de reconnaître les **produits bactériens** : peptidoglycane (ligand TLR2), acide lipoteichoïque (ligand TLR2), et lipopolysaccharide (ligand TLR4).

	pDC	mDC
TLR1	±	+
TLR2	-	+
TLR3	-	++
TLR4	-	+
TLR5	-	+
TLR6	+	+
TLR7	++	-
TLR8	-	++
TLR9	++	-
TLR10	±	+

**Tableau I. Expression des TLR par les différentes sous-populations de DC humaines.** +, ++, ± et – indiquent l'expression relative de l'ARNm de chaque TLR. D'après Liu 2005.

Les **mDC matures** ont la capacité de sécréter différentes cytokines comme l'**IL-8** ou le **tumor necrosis factor α (TNF-α)** qui contribuent au maintien de l'inflammation en favorisant le développement de l'immunité adaptative. La production d'**IL-12** des mDC matures augmente l'activité cytotoxique des **cellules NK** et des **CTL**. Par ailleurs, elles perdent l'expression des récepteurs des chimiokines inflammatoires et acquièrent celle de récepteur pour des chimiokines ganglionnaires (**CCR7**) leur permettant de quitter le site infectieux et de migrer vers les **ganglions lymphatiques drainants** (Banchereau *et al.* 2000).

## 1.2.2. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes



**Figure 2. Morphologie des pDC.**

**A.** pDC colorées au Giemsa, X400. **B.** monocytes colorés au Giemsa, X400. **C.** pDC observées par microscopie électronique à balayage, X3000. **D.** pDC observée par microscopie électronique à transmission, X7000. D'après Asselin-Paturel *et al.* 2001.

Les pDC sont présentes dans le **sang** des adultes (O'Doherty *et al.* 1994) et des nouveaux-nés (Sorg *et al.* 1999) où elles ne représentent que 0,5% des **Cellules Mononuclées du Sang Périphérique (PBMC)**. Elles ont également été observées dans les **zones T** des **organes lymphoïdes**, le **thymus**, les **amygdales**, la **rate**, la **moelle osseuse** (Grouard *et al.* 1997 ; Cella *et al.* 1999 ; Bendriss-Vermare *et al.* 2001 ; Jameson *et al.* 2002) ainsi que dans certains tissus périphériques : le **poumon** (Masten *et al.* 2006) et le **foie** (Colonna *et al.* 2004). Leur durée de vie est évaluée à deux semaines chez la souris et le pool de pDC dans l'organisme est maintenu constant (Merad & Manz 2009).

Au microscope optique, les pDC ont une morphologie semblable à celle des **plasmocytes**, un **noyau excentré en forme de haricot** et un **cytoplasme**

**basophile**. Leur taille est intermédiaire entre celle des monocytes et des lymphocytes au repos. Au microscope électronique, les pDC présentent une morphologie **ronde** et **lisse**, un noyau avec une **hétérochromatine marginale**. Leur cytoplasme contient un **réticulum endoplasmique rugueux développé** et de **nombreuses mitochondries** (figure 2).

Les pDC se caractérisent d'une part par l'**absence des marqueurs myéloïdes (CD11c, CD13)** et **lymphoïdes (CD3, CD19)** et d'autre part par la **forte expression de CD123 (IL-3R $\alpha$ ), HLA-DR, CD4** et **CD45RA**. Elles expriment également deux marqueurs spécifiques : **BDCA-2** et **BDCA-4**. En résumé, les **pDC** peuvent être caractérisées par les marqueurs suivants : **linéage<sub>neg</sub> CD4<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup> CD123<sup>high</sup> BDCA-2<sup>+</sup> BDCA-4<sup>+</sup>** et **HLA-DR<sup>high</sup>** (Grouard *et al.* 1997; Dzionek *et al.* 2000) (tableau II).

Marqueur phénotypique	pDC	mDC
CD1a	-	+
CD4	++	+
CD11c	-	++
BDCA-1 (CD1c)	-	+
BDCA-2	+	-
BDCA-3	-	-/sous-pop +
BDCA-4	+	-
CD116 (GM-CSFR)	+	++
CD123	++	+
HLA-DR	+	++

**Tableau II. Immunophénotype simplifié des DC.**

+, ++, ± et – indiquent l'expression relative de chaque protéine évaluée par cytométrie en flux. D'après Dzionek *et al.* 2000.

À la différence des **mDC** qui expriment principalement les **TLR1, -2, -3, -4, -5, -6, -8** et **-10**, les récepteurs endosomaux **TLR7** et **-9** sont exprimés de façon prédominante par les **pDC** (tableau I). Le récepteur **TLR7** lie les **ARN simple brin (ssRNA)**, il reconnaît donc les **virus à ARN** comme le virus *influenza* (Heil *et al.* 2004). Le récepteur **TLR9** reconnaît les **motifs Cytosine-phosphate Guanine (CpG)** des **ADN viraux et bactériens** (Moseman *et al.* 2004). Alors que les mDC sont

d'avantage orientés vers la reconnaissance **bactérienne** (Kadowaki *et al.* 2001), les pDC semblent jouer un rôle dans la réponse immunitaire vis à vis des **virus à ARN** et à **ADN** (Haeryfar 2005) : mDC et pDC se complètent.

Les pDC activées sécrètent massivement de l'**interféron- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )**, une cytokine aux propriétés **anti-virales** et **anti-tumorales** (Siegal *et al.* 1999). L'**IFN- $\alpha$**  agit à plusieurs niveaux, d'une part il active les autres cellules du système immunitaire (NK, LT, lymphocytes B, macrophages et mDC). D'autre part, il a un effet auto-stimulant sur les pDC, participant à leur **maturation**. Les pDC activées sécrètent également des **cytokines pro-inflammatoires**, telles que l'**IL-6**, l'**IL-8** et le **TNF- $\alpha$** . Les pDC se différencient en **CPA** et peuvent alors **polariser** la réponse **T** (Kadowaki *et al.* 2000).

Le rôle des pDC dans la mise en place de l'immunité adaptative a été détaillé dans le contexte d'une infection virale. Leur rôle dans l'induction d'une réponse cytotoxique anti-tumorale spécifique a également été décrit (Banchereau *et al.* 2005).

L'unité INSERM U823 équipe 9 Immunobiologie et Immunothérapie des cancers a montré que la maturation des pDC s'accompagne de l'expression de **TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL)** qui confère à la cellule une **cytotoxicité ciblée** contre les **cellules infectées** ou **tumorales** (Chaperot *et al.* 2006). Entre autres travaux de l'équipe, les **voies de signalisation en aval de TLR7** ont été décrites pour les **pDC** par Di Domizio *et al.* 2009b.

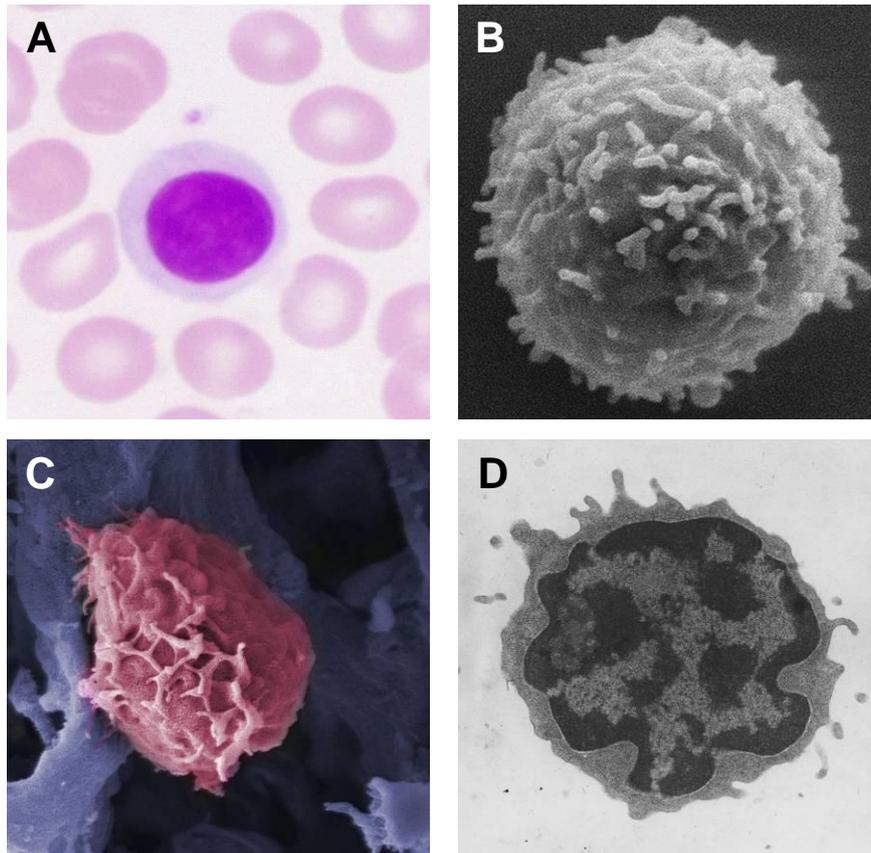
### 1.2.3. Une lignée de pDC : les cellules GEN 2.2

Les DC circulantes, représentent **moins de 1% des PBMC**. Les mDC ont fait l'objet de nombreuses études. En effet, ces cellules peuvent être générées *in vitro* à partir de précurseurs myéloïdes CD34<sup>+</sup> ou dérivées de monocytes. En revanche, il n'existe aucune méthode simple et peu coûteuse permettant de produire des pDC *in vitro*. L'étude des pDC reste donc difficile.

En 2001, la découverte d'une entité de leucémie à pDC par l'unité INSERM U823, équipe 9 Immunobiologie et Immunothérapie des cancers a permis d'établir une **lignée de pDC** appelée **GEN 2.2** (Chaperot *et al.* 2001). Cette lignée, a fait l'objet

d'un brevet, déposé à l'**Institut National de la Propriété Industrielle (INPI)** le 16 décembre 2002. La caractérisation de la lignée montre que ces cellules diffèrent peu de leurs homologues saines (Chaperot *et al.* 2006). Ce matériel autorise l'**étude approfondie et illimitée** de ce type cellulaire.

### 1.3. Les lymphocytes T



#### Figure 3. Morphologie des LT.

**A.** LT coloré au Giemsa, X400. **B.** LT observé par microscopie électronique à balayage, X3000. D'après S. Majstoravich *et al.* 2004. **C.** Migration d'un LT observée par microscopie électronique à balayage, X3000. Copyright United States Government Work, courtesy of the Biology Image Library <http://biologyimagelibrary.com>. **D.** LT observé par microscopie électronique à transmission, X7000. Copyright Arthur O. Anderson, courtesy of the Biology Image Library <http://biologyimagelibrary.com>.

Les **LT** sont des **leucocytes mononucléaires**, issus de la **lignée lymphoïde**. Leur **noyau ovoïde** est entouré d'une **étroite couronne de cytoplasme hyalin, basophile et riche en ribosomes** (figure 3).

Les LT expriment un récepteur à l'antigène appelé **T Cell Receptor (TCR)** couplé à un complexe **CD3**. Le TCR reconnaît les peptides qui sont **présentés** par les molécules du **CMH**. La quasi-totalité des cellules nucléées de l'organisme expriment des molécules de **classe I du CMH**, alors que les molécules de **classe II du CMH** sont exprimées seulement par des **CPA**.

Le système immunitaire **adaptatif** repose principalement sur la **présentation** des **antigènes** par les **CPA** aux **LT** dans les **organes lymphoïdes secondaires**. Un LT qui n'a jamais rencontré l'antigène est dit **naïf**. La première activation des lymphocytes naïfs est appelée **priming**. Les LT naïfs sont activés de façon optimale par des **CPA « professionnelles »**, telles que les **DC**. Dans certaines conditions de maturation et de contexte cytokinique, les DC deviennent capables d'activer directement des **LT CD8<sup>+</sup> naïfs** (Rodriguez *et al.* 1999). Ce sont les seules CPA douées de cette capacité, et ceci grâce à leur **haut niveau** d'expression des molécules de **co-stimulation**, de production de **cytokines** et de **présentation**.

Parmi les LT, se distinguent deux sous-populations bien définies : les **LT CD4<sup>+</sup>** et les **LT CD8<sup>+</sup>**. Les **LT CD4<sup>+</sup>** sont capables d'**orienter** la **nature de la réponse immunitaire**. Les **LT CD8<sup>+</sup>** sont les **effecteurs** de la **réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire** par opposition aux **lymphocytes B** et aux **plasmocytes**, **effecteurs** de la **réponse immunitaire adaptative à médiation humorale**.

### 1.3.1. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Les **LT** qui expriment la glycoprotéine membranaire **CD4** associée à leur TCR reconnaissent l'antigène présenté par les molécules de **classe II du CMH**. Il est établi que les **LT CD4<sup>+</sup>** jouent un **rôle central** dans l'**orchestration** de la réponse immune à travers leur capacité à fournir de l'**aide** aux autres cellules du système immunitaire **inné** et **adaptatif**. Ils tiennent d'ailleurs leur nom de **lymphocyte T helper (TH)** ou **auxiliaire** de cette particularité.

Les **TH activés** prolifèrent **clonalement** afin d'augmenter le nombre de cellules **spécifiques** d'un **même antigène**. Les TH activés sont caractérisés par leur

exigence d'activation moins stricte, leur expression accrue de molécules d'adhérence cellulaire et l'expression de **CD25**, sous-unité alpha du récepteur de l'**IL-2**, intervenant dans la survie des cellules. En fonction de leur **environnement**, les TH vont se **polariser** au cours de leur activation et le **profil** des **cytokines** produites par les TH pourra **changer le type de réponse immunitaire** qui se développe parmi les autres leucocytes.

Les premières études portant sur la biologie du TH ont caractérisé deux types de cellules : certaines initient l'immunité à **médiation cellulaire**, d'autres orientent vers l'immunité à **médiation humorale**. En **1989**, **Mossman** et **Coffman** ont alors proposé le **modèle TH1 / TH2**, dans lequel les auxiliaires TH1 et TH2 produisent un **profil** de **cytokines** qui leurs sont propres et qui influence l'immunité vers un type cellulaire (TH1) ou humoral (TH2) (Mosmann & Coffman 1989).

À l'heure actuelle, les différents types de TH différenciés connus sont : les **lymphocytes T Helper 1 (TH1)**, **T Helper 2 (TH2)**, **T Helper 17 (TH17)**, **T régulateurs (Treg)**, **T Helper 9 (TH9)** et **T Helper 22 (TH22)**.

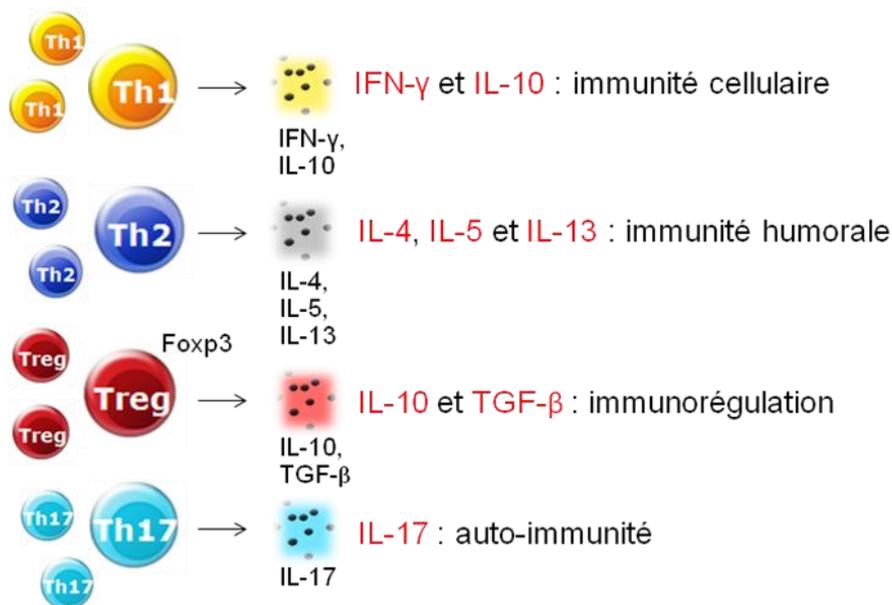
Les **TH1** produisent une cytokine caractéristique : l'**interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )** (figure 4). Cette cytokine entretient l'**inflammation** en activant principalement certains **macrophages** et les **CTL** (Murphy & Reiner 2002). Les TH1 peuvent également produire de l'**IL-10** (Liu *et al.* 2007) (figure 4). Deux systèmes sont capables d'induire une polarisation TH1 chez l'Homme : les **mDC** activées par des bactéries et leur production d'**IL-12** et les **pDC** activées par des virus et leur production d'**IFN- $\alpha$** .

Les **TH2** produisent de l'**IL-4**, de l'**IL-5** et de l'**IL-13** (figure 4). Ce profil cytokinique active essentiellement les **lymphocytes B** et les réponses immunitaires dépendantes des **anticorps** (Murphy & Reiner 2002).

Les **Treg** expriment le facteur de transcription **Foxp3** (figure 4). Les Treg contribuent à diminuer l'amplitude des réactions immunitaires et à prévenir l'auto-immunité par la production notamment d'**IL-10** et de **Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )**, cytokines aux propriétés **immunorégulatrices** (Sakaguchi 2000) (figure 4). Les Treg sont capables de supprimer à la fois les réponses immunes **TH1 et TH2**. Deux sous-populations principales de Treg existent : les **Treg naturels** spécifiques d'**antigènes**

**du soi** qui se développent dans le **thymus** et les **Treg induits** spécifiques d'**antigènes de l'environnement** qui proviennent de la différenciation de LT CD4<sup>+</sup> naïfs en **périphérie** (Workman *et al.* 2009).

Les **TH17** produisent de l'**IL-17** (figure 4). Les TH17 participent à la défense de l'organisme contre des **pathogènes infectieux extracellulaires**, tels que : *Citrobacter rodentium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi* ou *Bordetella pertussis* (Infante-Duarte *et al.* 2000 ; Fedele *et al.* 2005 ; Happel *et al.* 2005 ; Mangan *et al.* 2006). Mais ils sont également responsables de **pathologies auto-immunes** (Langrish *et al.* 2005 ; Annunziato *et al.* 2007 ; Korn *et al.* 2009).



**Figure 4. Profil des cytokines produites par TH1, TH2, Treg et TH17.**

Les **TH9** produisent de l'**IL-9** et de l'**IL-10**. Cette sous-population est impliquée dans le développement de **processus inflammatoires**, tels que l'**allergie** et l'**asthme** (Xing *et al.* 2011).

Plus récemment, une nouvelle sous-population de lymphocytes **TH cutanés mémoires** produisant de l'**IL-22** et de l'**IL-13** mais **pas d'IL-17 ni d'IFN-γ** a été décrite. Ces cellules nommées **TH22** constituent une sous-population de TH à part entière, impliquées dans le développement de **maladies inflammatoires** et **auto-immunes** telles que : **polyarthrite rhumatoïde**, **maladie de Crohn**, **psoriasis**,

**dermatite atopique, sarcoïdose** ou encore **lupus érythémateux disséminé** (Zhang *et al.* 2011).

Les **LT CD4<sup>+</sup>** interviennent dans l'**ensemble des réponses immunitaires**, notamment **anti-tumorales** (Kennedy *et al.* 2008). Leur rôle dans le modèle du mélanome a été mis en évidence (Hunder *et al.* 2008).

### 1.3.2. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>

Les **LT** exprimant la glycoprotéine membranaire dimérique **CD8** associés à leur **TCR** sont restreints à la reconnaissance de l'antigène par les molécules de **classe I du CMH**. Les **LT CD8<sup>+</sup> naïfs** activés par la reconnaissance d'un complexe antigène-molécule de classe I présent à la surface d'une CPA deviennent des **CTL** et prolifèrent.

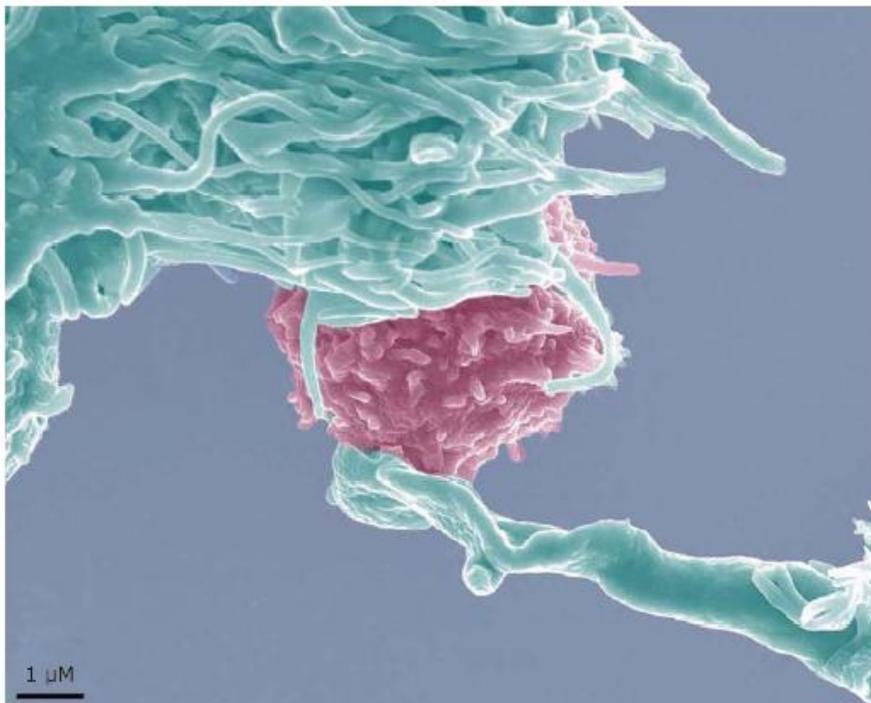
La **quasi-totalité** des cellules nucléées de l'organisme expriment des molécules de **classe I du CMH**, les CTL peuvent donc reconnaître et éliminer **presque toutes les cellules altérées** de l'organisme.

Les **LT CD8<sup>+</sup>** sous l'action de l'**IL-2** et de l'**IFN-γ** sécrétés par les **LT CD4<sup>+</sup>**, ont le pouvoir de **lyser** des cellules et jouent un rôle essentiel dans la **reconnaissance et l'élimination des cellules du Soi altérées** (par exemple des cellules infectées par un virus ou des cellules tumorales) ainsi que dans les réactions de **rejet de greffe**. Les **LT CD8<sup>+</sup>** sont donc les **effecteurs de l'immunité anti-tumorale**.

### 1.4. La réponse immunitaire anti-tumorale « idéale »

Il a été démontré, tout au moins *in vitro*, que les DC sont des CPA dites « professionnelles », les **plus efficaces** pour **engendrer des effecteurs cytotoxiques spécifiques des cellules tumorales**, en particulier à partir des **LT naïfs**. *In vivo*, on suppose qu'elles **phagocytent** les **antigènes exogènes** dans les **tissus périphériques**, puis **migrent** sous l'influence des **chimiokines** jusqu'aux **organes lymphoïdes secondaires**. Ces antigènes proviennent de **lysats**, de **fragments** ou de **corps apoptotiques de cellules tumorales**.

Au niveau des **aires T** des ganglions de drainage, l'antigène présenté par les molécules de **classe II** des DC est reconnu par des **LT CD4<sup>+</sup> spécifiques** de cet antigène. La communication entre ces deux cellules est qualifiée de **synapse immunologique** (figure 5). Les LT CD4<sup>+</sup> ne seront activés que si la reconnaissance du peptide est accompagnée de **signaux** dits de « **co-stimulation** », tels que **CD40**, **CD80** et **CD86**. Le niveau d'expression des molécules de co-stimulation est corrélé à l'état de **maturation** des DC.



**Figure 5. Photo d'une DC dialoguant avec un LT.**

La DC est colorée en vert et le LT en rose. Le LT scanne la surface de la DC à la recherche d'un complexe CMH-peptide dont il est spécifique. D'après Schwartz 2004.

Les **LT CD4<sup>+</sup> activés**, véritables chefs d'orchestre de la réponse immunitaire adaptative, sécrètent des **cytokines**, en particulier l'**IL-2** nécessaire à leur **prolifération** et à celle des **LT CD8<sup>+</sup>**. Les LT CD4<sup>+</sup> favorisent également la maturation des CPA par l'**engagement** du **CD40L**. La production d'**IFN- $\alpha$**  par les **pDC** et celle d'**IL-12** par les **mDC** induisent la **polarisation TH1** des LT CD4<sup>+</sup> helpers activés et leur production d'**IFN- $\gamma$** . Cette cytokine entretient l'inflammation et participe à l'activation des **CTL** qui **quittent** les organes lymphoïdes pour rejoindre le **site de la tumeur**. La **lyse spécifique de la cellule tumorale** par des **CTL** est la phase effectrice d'une réponse immunitaire « idéale ».

## 1.5. Les pDC en contexte tumoral

En 2004, le cancer est devenu la **première cause de mortalité en France** devant les maladies cardiovasculaires, dont la mortalité a baissé de moitié depuis le début des années 1980 (Aouba *et al.* 2007).

Cancer est le nom générique donné aux **tumeurs malignes**. Ces tumeurs s'étendent rapidement et ont tendance à **métastaser**. On admet que le cancer se développe quand l'**équilibre** est **rompu** entre les mécanismes de **stimulation** et d'**inhibition** de la **prolifération cellulaire**. Les étiologies sont **multiples** et encore imparfaitement connues : terrain héréditaire, facteurs environnementaux divers, radiations, virus, habitudes alimentaires, tabac... Tout au long de la vie, l'accumulation d'erreurs génétiques peut générer des cellules tumorales à partir de cellules saines. Ces cellules sont normalement détruites par le système immunitaire, c'est l'**immunosurveillance**, mais certaines échappent. On distingue les cancers « liquides » ou cancers du sang, des cancers « solides ». On répertorie les cancers solides selon leur type histologique en **carcinomes** ou **cancers épithéliaux** et en **sarcomes**, lesquels sont **d'origine conjonctive**. Leur traitement fait appel à la **chirurgie**, à la **radiothérapie**, à la **chimiothérapie** et à l'**hormonothérapie**.

L'histoire naturelle des cancers se divise en trois phases : **initiation**, **promotion** et **progression** (Hennings *et al.* 1993). La phase d'**initiation** aboutit à une cellule immortelle, caractérisée par des **oncogènes activés**, des **gènes suppresseurs de tumeurs inhibés** et une **instabilité caryotypique, génomique et phénotypique**. À ce stade, l'interaction entre immunité et tumeur peut entrer dans une phase d'**équilibre**, de **latence** où le développement des cellules tumorales est contrôlé par le système immunitaire. Lorsque que la tumeur, sous la pression du système immunitaire, acquiert une résistance à ce contrôle, il y a **échappement tumoral** et **développement** des phases de **promotion** et de **progression** conduisant à l'**invasion locale, lymphatique** et enfin **métastatique**.

La destruction des cellules tumorales par le système immunitaire nécessite la **capture**, l'**apprêtement** et la **présentation d'antigènes tumoraux** par des **CPA**, telles que les DC, la génération de **TH1** et de **CTL spécifiques**. De plus l'**IFN- $\alpha$**  sécrété par les pDC activées participe à l'immunité anti-tumorale par sa capacité à

**activer l'immunité cytotoxique, à augmenter l'immunogénicité des tumeurs et à ralentir la division des cellules tumorales.**

Néanmoins les DC, notamment en contexte tumoral, ont également la capacité d'induire non pas une réponse immunitaire forte, mais au contraire une **tolérance**. Elles sont alors nommées **DC suppressives** ou **tolérogènes** et sont capables d'inhiber les réponses immunitaires innées et adaptatives, dont la réponse **T** (Thomson 2010).

Les cancers du **sein**, de l'**ovaire** et de la **peau** constituent les modèles actuels privilégiés de recherche pour l'étude des pDC en contexte tumoral.

### 1.5.1. Cancer du sein

En France, le cancer du sein se classe **deuxième** par **ordre d'incidence** parmi l'ensemble des cancers et **premier** en terme de **nombre de décès par cancer chez la femme** (Belot *et al.* 2008). 42 000 nouveaux cas de cancer du sein et 11 600 décès dus à cette maladie sont enregistrés chaque année en France.

La plupart des recherches qui se sont intéressées au rôle des DC dans la progression du cancer du sein se sont portées sur l'analyse des **mDC**. Ces études ont établi qu'il existe une défaillance de la maturation des DC suggérant une **tolérance immune** vis-à-vis de la tumeur par **ignorance** ou **anergie** (Lenahan & Avigan 2006 ; DeNardo & Coussens 2007). Une étude chez la souris humanisée montre aussi que les cellules tumorales conduisent les **mDC** à induire des **TH2** sécréteurs d'**IL-13**, favorisant le développement du **cancer du sein** (Aspord *et al.* 2007).

À propos des **pDC**, des études ont montré que le nombre de **pDC circulantes** est **diminué** et que leur **maturation** est **altérée** chez les patientes atteintes d'un cancer du sein (Della Bella *et al.* 2003 ; Pinzon-Charry *et al.* 2007). Autre constat, la présence de pDC dans les tumeurs du sein primaires est corrélée à un **mauvais pronostic**, ce qui suggère leur contribution au développement du **cancer du sein** (Treilleux *et al.* 2004).

Plus récemment, il a été mis en évidence la présence de **Treg** dans l'**infiltrat lymphoïde de tumeurs du sein** (Gobert *et al.* 2009). Le mode de recrutement de ces Treg activés et qui prolifèrent, suggère un engagement de leur TCR et donc une présentation spécifique d'antigènes tumoraux par des **DC**. Il reste maintenant à définir si les pDC ont un rôle **direct** ou **indirect** dans l'induction de la polarisation **Treg** rencontrée dans le contexte du cancer du sein.

### 1.5.2. Cancer de l'ovaire

Le cancer de l'ovaire se situe au **septième** rang des **cancers féminins** avec un taux d'incidence de 8,1 pour 100 000 personnes. Le taux de mortalité est de 4,6/100 000, le plaçant au **cinquième rang des décès par cancer chez la femme** (Belot *et al.* 2008).

Une étude montre que, comme pour le cancer du sein, les patientes porteuses d'un cancer de l'ovaire présentent une **altération fonctionnelle des DC *in situ*** (Zou 2005). Les **pDC** retrouvées au niveau de la tumeur stimulent la production d'**IL-10** par les LT CD4<sup>+</sup>, ce qui **supprime les fonctions effectrices** des **LT** spécifiques d'antigènes tumoraux induits par les **mDC** (Zou *et al.* 2001).

Ici, les pDC semblent avoir une fonction **tolérogène**. Reste à définir si cette propriété est **intrinsèque** aux pDC ou **induite** par l'environnement tumoral.

### 1.5.3. Cancers de la peau

Les cancers de la peau, tous types confondus, se classent **premiers** par **ordre d'incidence** en France. Ils totalisent environ 100 000 nouveaux cas chaque année.

Il existe deux types principaux de cancer de la peau, les **carcinomes**, qui se développent aux dépens de **kératinocytes** de l'épiderme, et les **mélanomes malins cutanés** qui se développent aux dépens des **mélanocytes**, cellules pigmentaires de la peau.

En fonction de la localisation des cellules tumorales du **carcinome**, on distingue le **carcinome basocellulaire** qui s'établit à partir des **kératinocytes**, et le **carcinome spinocellulaire** qui se développe principalement à partir de lésions précancéreuses

comme les **kératoses séniles**. L'exérèse chirurgicale d'un **carcinome** est un traitement efficace, d'où une **très faible mortalité** induite.

En revanche, le **mélanome malin** est la tumeur cutanée qui présente le **plus grand potentiel métastatique**. Il se situe, par sa fréquence, au 12<sup>ème</sup> rang des cancers chez l'homme avec un taux d'incidence de 7,6/100 000 et au 8<sup>ème</sup> rang chez la femme avec un taux d'incidence de 8,8/100 000. Les taux de mortalité sont de 1,6/100 000 chez l'homme et 1,1/100 000 chez la femme. En 2005, ce cancer se situait au 18<sup>ème</sup> rang des décès par cancer soit 1% de l'ensemble des décès par cancer. Le mélanome de la peau est donc un cancer **peu fréquent** mais dont l'incidence a fortement augmenté depuis 1980. Dans le monde, son **incidence double tous les 10 ans** (Belot *et al.* 2008).

Lorsque l'exérèse complète de la tumeur n'est pas efficace, notamment lors de la présence de **métastases ganglionnaires** ou **viscérales**, un traitement par **chimiothérapie** et / ou **immunothérapie** est proposé. L'**injection d'IFN-α** est un traitement adjuvant éventuel.

Plusieurs études ont montré la présence de **pDC** dans l'infiltrat leucocytaire de lésions de mélanome cutané (Salio *et al.* 2003 ; Vermi *et al.* 2003 ; Wenzel *et al.* 2005). De plus, une étude a montré que les cas de **régression spontanée** de mélanome cutané sont notamment associés à la **présence de pDC** (Wenzel *et al.* 2005). Les pDC sont également recrutées au niveau des ganglions lymphatiques sentinelles envahis par des métastases de mélanome et constituent la population de **DC majoritaire** (Lee *et al.* 2003 ; Gerlini *et al.* 2007). Néanmoins, la présence de ces cellules dans les ganglions lymphatiques sentinelles est associée à l'**échappement tumoral**. En effet, certaines études immunohistochimiques chez l'homme et *ex vivo* dans des modèles murins montrent que les pDC présentes dans les ganglions lymphatiques sentinelles en contexte de mélanome génèrent des **Treg** de façon spécifique conduisant à l'induction d'une **tolérance tumorale** (Lee *et al.* 2003 ; Munn *et al.* 2004; Sharma *et al.* 2007). L'**immunité anti-tumorale** induite en contexte de mélanome par les **pDC** semble donc **faible voire nulle**.

L'une des hypothèses avancée pour expliquer ce constat est l'**absence de signaux d'activation** médiés par les **TLR** dans le **microenvironnement tumoral**, ainsi les DC **ignorerait** la tumeur. Des études étayent cette hypothèse en montrant que les

pDC **activées** par des **ligands** de **TLR** sont capables dans un modèle murin d'activer des **cellules NK** et des **LT CD8<sup>+</sup> spécifiques** d'antigènes de **mélanome** conduisant à la **régression tumorale** (Salio *et al.* 2003; Liu *et al.* 2008). De plus, il a été montré que l'injection intradermique ou sous-cutanée d'un **ligand** de **TLR9** chez des patients porteurs de mélanome induit l'**activation des pDC** présentes dans les ganglions sentinelles, la **disparition** des **Treg** et l'**augmentation** de l'**activité cytotoxique NK** (Pashenkov *et al.* 2006; Molenkamp *et al.* 2007). Cette immunothérapie a permis, chez certains patients, la **régression complète** de la tumeur (Hofmann *et al.* 2008).

Toutes ces données suggèrent que les **pDC immatures** présentes au sein des **cancers cutanés** n'induisent **pas** d'**immunité cytotoxique**, conduisant à l'**ignorance** des tumeurs mais que ces cellules sont **aptées** à générer une **réponse immune anti-tumorale efficace** lorsqu'elles sont **activées** par des **ligands** de **TLR**. De tels résultats mettent en avant l'**intérêt** de **cibler l'activation** des **pDC** dans le traitement des cancers de la peau.

## 1.6. Les pDC en thérapeutique

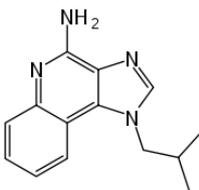
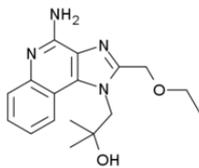
La persistance dans un **état de repos** des **pDC** peut être à l'origine de l'**ignorance immune** vis-à-vis de certaines tumeurs. Certaines stratégies thérapeutiques mises en place pour le traitement de ces pathologies reposent donc sur l'**activation** du **système immunitaire** en ciblant entre autres les pDC par des **agonistes** de **TLR7** et **-9**.

Différents **agonistes** de **TLR7** et **-9** se sont révélés **efficaces** dans le traitement de certains **cancers** ou en tant qu'**adjuvants vaccinaux**. Plusieurs essais cliniques sont en cours. Les agonistes de TLR-7 et -9 permettent d'**activer** le système immunitaire en ciblant principalement les **pDC** et les **lymphocytes B** et d'induire la production d'**immunoglobulines (Ig)**. Or l'**inhibition** de la **progression tumorale** après administration d'un ligand de **TLR7** a notamment été démontrée comme étant **dépendante des pDC** et de la production d'**IFN- $\alpha$**  (Inglefield *et al.* 2008).

### 1.6.1. Agonistes utilisés

Les **agonistes** de **TLR7** sont de petites molécules à base d'imidazoquinolines (imiquimod, gardiquimod, resiquimod) ou analogues de guanosine (loxoribine). La majorité des données cliniques ont été obtenues avec l'**imiquimod**. Les ligands de TLR7 activent directement les **pDC**, les **lymphocytes B** et les **monocytes** et certains sont de puissants inducteurs de la production d'**IFN- $\alpha$**  et de **cytokines pro-inflammatoires** *in vivo* (Schon & Schon 2008).

Les **Séquences Immunostimulatrices (ISS)** de **classe B** sont, à ce jour, les agonistes TLR les plus étudiés. Ce sont des **oligodeoxynucléotides (ODN)** contenant des motifs **Cytosine-phosphate Guanine (CpG)**, qui **ciblent** les **pDC**, les **lymphocytes B** et les **monocytes** exprimant **TLR9**. Au même titre que les agonistes de TLR7, la fixation du ligand TLR9 à son récepteur induit une **polarisation TH1** de l'immunité et l'**activation** de la **prolifération**, de la **production d'Ig** et du **switch isotypique** des **lymphocytes B**, bases de l'immunité adaptative humorale (Kanzler *et al.* 2007) (tableau III).

Nom du ligand	Structure	Récepteur
<b>Imiquimod</b> 3-(2-methylpropyl)-3,5,8-triazatricyclo[7.4.0.0 <sup>2,6</sup> ]trideca-1(9),2(6),4,7,10,12-hexaen-7-amine		<b>TLR7</b>
<b>Resiquimod</b> 1-[4-amino-2-(ethoxymethyl)imidazo[4,5-c]quinolin-1-yl]-2-methylpropan-2-ol		<b>TLR7</b>
<b>CpG A</b> ODN 2216 ODN 2336	5'-GGGGGAC <b>CGATCGTC</b> GGGGG-3'	<b>TLR9</b>
<b>CpG B</b> CpG 7909 PF-3512676 ODN 2006	5'- <b>TCGTCG</b> TTTTGT <b>CG</b> TTTTGT <b>CG</b> TT-3'	<b>TLR9</b>
<b>CpG C</b> ODN 2395 ODN M362	5'- <b>TCGTCG</b> TTTT <b>CGGCGCGCGCCG</b> -3'	<b>TLR9</b>
<b>IRS TTAGGG</b> ODN 2088	5'-TTT <b>AGGG</b> TT <b>AGGG</b> TT <b>AGGG</b> -3'	<b>TLR9</b>
<b>IRS 954</b>	5'-TGCTCCTGG <b>AGGG</b> GTGT-3'	<b>TLR7/9</b>

CG, motif stimulateur ; AGGG, motif inhibiteur

**Tableau III. Exemples d'agonistes de TLR utilisés en immunothérapie.**  
D'après Di Domizio (2009a).

### 1.6.2. Utilisation des ligands TLR7 et -9 en tant qu'adjuvants de vaccination contre des pathogènes

En imitant des motifs pathogènes, ces agonistes délivrent un « **signal de danger** » et permettent d'**augmenter** les réponses immunes.

Un grand nombre d'études cliniques, qui ont mis en œuvre les ligands **TLR7** et **-9** en tant qu'**adjuvant** de **vaccination** ont eu lieu dans des modèles d'**infections virales**. En phase I/II d'essai clinique, le CpG-7909 (CpG B) en association avec le vaccin pour la prévention des infections au virus de l'**hépatite B (VHB) Engerix-B®** permet

d'**augmenter** de façon significative la **réponse humorale spécifique** chez des individus sains et chez des individus non-répondeurs infectés par VIH et leur confère une **séro-protection à long terme** (Cooper *et al.* 2004a; Cooper *et al.* 2005; Cooper *et al.* 2008).

Un vaccin contre le VHB, actuellement en phase III d'essai clinique, combinant l'ISS CpG-1018 avec un antigène de surface du **VHB** a quant à lui prouvé être capable de **maîtriser le déclin de la réponse immunitaire** lié à l'âge normalement rencontré avec les vaccins VHB classiques (Halperin *et al.* 2006).

Par ailleurs, il a été montré que le couplage d'un vaccin peu efficace contre la **malaria** (apical membrane antigen 1 - combinaison 1) avec des **CpG B** permet d'**augmenter fortement la réponse anticorps**. Celle-ci devient alors capable de prévenir le développement du parasite *in vitro* (Mullen *et al.* 2008 ; Ellis *et al.* 2009). Le **CpG B** a également été testé dans une étude clinique de phase Ib en tant qu'**adjuvant** d'un vaccin commercial contre **Flu**. Une dose plus faible de vaccin induit la diminution nette de la réponse TH1 spécifique, l'addition de CpG B a permis de **restaurer** la réponse au niveau de celle normalement attendue avec la dose conventionnelle (Cooper *et al.* 2004b).

Une autre étude clinique s'intéressant à l'utilisation de CpG C (CpG 10109) combiné à un vaccin approuvé contre l'anthrax nommée **BioThrax®** a rapporté obtenir une **réponse anticorps plus forte et plus précoce** chez les individus testés qu'avec l'administration du vaccin seul (Gu *et al.* 2007).

Toutes ces données illustrent la capacité des ligands **TLR7** et **-9** à **augmenter** et à **maintenir** dans le temps l'**immunité des vaccins classiques**, démontrant leur **intérêt** en tant qu'**adjuvant**.

### 1.6.3. Utilisation des ligands TLR7 et -9 dans le cancer

L'intérêt d'utiliser des agonistes synthétiques de **TLR7** et **-9** dans le traitement du cancer repose sur deux postulats :

**1. induire la production d'IFN- $\alpha$  et de cytokines pro-inflammatoires** afin de créer un environnement propice à la mise en place d'une **réponse immunitaire adaptative cytotoxique**.

**2. lever la tolérance** envers les **antigènes tumoraux** qui sont **peu immunogènes**. Ces molécules thérapeutiques peuvent être utilisées **seules**, en tant qu'**adjuvants vaccinaux** ou **en association** avec d'autres traitements.

Dans le contexte de l'utilisation de **molécules seules**, les publications sur les agonistes de TLR7 sont les plus nombreuses. La crème à base d'**imiquimod, Aldara®**, est approuvée pour le traitement des **carcinomes basocellulaires** aux États-Unis et en France. Dans une étude multicentrique européenne de phase III, une **régression tumorale** a été observée chez **80%** des patients traités par l'imiquimod (Schulze *et al.* 2005). Plus récemment, il a été démontré que les pDC recrutées sur les sites tumoraux après application topique d'imiquimod présentent une activité cytotoxique à l'égard des cellules tumorales conduisant dans la majorité des cas à la **régression complète** des carcinomes cellulaires (Stary *et al.* 2007; Wolf *et al.* 2007).

En plus du carcinome basocellulaire, plusieurs « cases reports » indiquent l'efficacité de l'**imiquimod** dans le traitement de tumeurs primaires de la peau dont le **kératoacanthome**, la **kératose actinique**, le **mélanome primaire *in situ*** et le **lymphome T cutané** (Novak *et al.* 2008). Pourtant la crème Aldara® est aujourd'hui uniquement indiquée en France dans le traitement des **verrues** génitales et périanales externes ; des **carcinomes basocellulaires** superficiels et des **kératoses actiniques** de l'adulte. Pour ces dernières, l'indication se restreint encore aux kératoses non hypertrophiques, non hyperkératosiques de l'adulte immunocompétent lorsque la taille ou le nombre des lésions limite l'efficacité et / ou la tolérance de la cryothérapie et si les autres traitements topiques sont contre-indiqués ou moins appropriés.

Par ailleurs, une étude clinique multicentrique récente de phase II a testé l'injection intraveineuse d'un **agoniste de TLR7**, le 852A, chez des patients porteurs de **mélanome métastatique de stade IV** réfractaires à la chimiothérapie. Les auteurs

démontrent que cette thérapie **bien tolérée** permet de **stabiliser la maladie** de façon **prolongée** (Dummer *et al.* 2008).

Alors qu'aucune spécialité à base d'agonistes de TLR9 n'est actuellement sur le marché, certains résultats obtenus dans des essais cliniques sont encourageants. En effet, une étude en phase II sur des patients porteurs de **carcinomes pulmonaires non à petites cellules** traités par chimiothérapie à base de platine-taxane en combinaison avec le ligand de **TLR9**, PF-3512676, administré en sous-cutané a montré une **augmentation de la médiane de survie** de ces patients de **6 mois** en comparaison avec des patients ayant reçu une chimiothérapie seule (Manegold *et al.* 2008). Cette étude se poursuit actuellement en phase III.

La vaccination de patients cancéreux utilisant les ODN-ISS en tant qu'**adjuvants** a également fait l'objet d'essais cliniques. Des dizaines d'autres études sont en cours sur l'efficacité des ODN-ISS en thérapie anti-tumorale sous forme de **vaccins**, de **monothérapies** ou **combinés** à la chimiothérapie (Tableau IV).

L'imiquimod, agoniste TLR7, a montré son efficacité biologique en tant qu'**adjuvant** chez des patients porteurs de **mélanome** dans l'induction de réponses immunes humorales et cellulaires dans le cadre d'un **vaccin immunothérapeutique** (Adams *et al.* 2008).

Traitement	TLR dont la molécule est agoniste	Type de cancer	Phase de l'étude (nombre de patients)
<b>Vaccins</b>			
CpG 7909 + peptide MAGE-3.A1	TLR9	Mélanome	Phase I/II (14)
CpG 7909 + peptide naturel MART1 + peptide tyrosinase + Montanide ISA-51	TLR9	Mélanome	Phase I (27)
Resiquimod + peptide NY-ESO-1 + Montanide ISA-51	TLR7	Mélanome	Phase I (26)
CPG 7909 + cyclophosphamide + fludarabine + PBMC autologues + MART1 dans IFA	TLR9	Mélanome	Phase I (12)
CPG 7909 (dans l'adjuvant AS15) + protéine fusion MAGE-3 His	TLR9	Mélanome	Phase II (68)
CPG 7909 (dans l'adjuvant AS15) + protéine recombinante HER2	TLR9	Cancer du sein	Phase I/II (40)
<b>Monothérapie</b>			
PF-3512676	TLR9	LLC, leucémie lymphoïde chronique (2ème ligne)	Phase I (48)
IMO-2055	TLR9	Cancer du rein (1ère et 2ème ligne)	Phase I (92)
Imiquimod	TLR7	Cancer du sein avec métastases cutanées	Phase II (29)
<b>Thérapies combinées</b>			
ISS-1018 + rituximab (anti-CD20)	TLR9	LNH, Lymphome non-hodgkinien (2ème ligne)	Phase II (30)
PF-3512676 + irradiation locale	TLR9	LNH	Phase I/II (30)
PF-3512676 ± Paclitaxel/carboplatine	TLR9	NSCLC (1ère ligne)	Phase III (800)
PF-3512676 ± Gemcitabine/cisplatine	TLR9	NSCLC (1ère ligne)	Phase III (800)
PF-3512676 ± Paclitaxel /carboplatine /bevacizumab	TLR9	NSCLC (1ère ligne)	Phase II (140)
PF-3512676 ± Erlotinib	TLR9	NSCLC (2ème ligne)	Phase II (130)
PF-3512676 ± Pemetrexed	TLR9	NSCLC (2ème ligne)	Phase II (130)
PF-3512676 + KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin)	TLR9	Leucémie/lymphome après greffe de moelle osseuse	Phase I (25)
ISS-1018 + irinotecane + cetuximab (anti-EGFR)	TLR9	Cancer colorectal (2ème ligne)	Phase I (15)
IMO-2055 + gemcitabine + carboplatine	TLR9	Tumeurs solides refractaires	Phase I/II

**Tableau IV. Essais cliniques récents sur l'utilisation de ligands TLR7 et -9 en immunothérapie anti-tumorale.**  
D'après Di Domizio (2009a).

#### 1.6.4. Immunothérapie active du cancer et pDC

Le développement d'un cancer chez un patient est dû, entre autres, à l'**inefficacité** d'une **immunité spécifique de la tumeur**. Afin de palier cette déficience du système

immunitaire, des stratégies immunothérapeutiques ont été mises en place pour **stimuler une réponse immune anti-tumorale**.

L'**immunothérapie active** repose sur le principe de **vaccination**. Elle est supposée être plus efficace dans le temps qu'une stratégie passive par l'induction d'effecteurs **T** et **B** et la mise en place d'une **immunité mémoire**. Ces stratégies utilisent l'**injection directe d'antigènes** (lysats tumoraux, peptide, ADN...) ou de **DC chargées** avec des **antigènes**. Les vaccins à base de DC actuellement en essai clinique utilisent des **mDC** générées **ex vivo** à partir de monocytes ou de précurseurs CD34<sup>+</sup> issus du sang du patient. Ces DC sont chargées avec des **antigènes tumoraux** et sont activées par des **cytokines pro-inflammatoires** ou des **agonistes de TLR**. Néanmoins, le bilan des vaccinations par **mDC** est globalement **décevant**.

L'utilisation des **pDC** dans une telle stratégie immunothérapeutique semble intéressante au vu de leur capacité à produire de l'**IFN- $\alpha$**  et à induire efficacement des **réponses anti-tumorales**, notamment dans le cancer du **sein** ou des **ovaires** (Schreibelt *et al.* 2010). L'équipe du Pr Fidgor a mis en place un essai clinique de phase I/II qui teste un **vaccin** à base de **pDC**. Après **cytaphérèse**, les pDC sont **chargées** avec des **antigènes de mélanome** exprimés par la **tumeur du patient**, **activées** par le virus de la méningo-encéphalite à tique, approuvées pour la thérapie et **réinjectées** au patient. Les résultats de cet essai clinique ne sont pas encore publiés.

Néanmoins, le développement à large échelle d'un vaccin standardisé à base de **pDC** est **limité** par la **fréquence** de ces cellules chez le patient, la **variabilité fonctionnelle interindividuelle**, le **temps** et le **coût de préparation** de vaccins individuels. Utiliser des cellules provenant d'une source déjà disponible et **illimitée** telle qu'une **lignée cellulaire** présente de nombreux avantages. Notre laboratoire étudie donc la possibilité d'utiliser la **lignée GEN 2.2** en tant que nouvelle stratégie immunothérapeutique pour le traitement des cancers. Dénommé **GENiusVac** ce projet consiste à induire des **réponses T spécifiques d'antigènes** en injectant au patient la lignée de pDC irradiée et chargée par des **peptides tumoraux**.

Le Dr. Aspod et le Dr. Charles ont montré que GENiusVac permet d'induire **ex vivo** de **fortes fréquences** de **LT CD8<sup>+</sup> spécifiques** et **fonctionnels** à partir de **PBMC** ou de **TIL** de patients porteurs de **mélanome** en stade I-IV. L'induction de **LT CD8<sup>+</sup>**

par GENiusVac est **plus efficace** que celle obtenue avec des **mDC autologues** ou **semi-allogéniques**. De plus, la vaccination par GENiusVac de souris immunodéficientes humanisées avec des PBMC humaines a démontré la possibilité d'induire de telles réponses *in vivo*. L'inhibition du développement tumoral chez ces souris humanisées a établi l'**efficacité thérapeutique** de cette stratégie. Toutes ces données forment la preuve de concept d'une **nouvelle stratégie immunothérapeutique prometteuse** (Aspord *et al.* 2010).

## 1.7. Projet d'étude



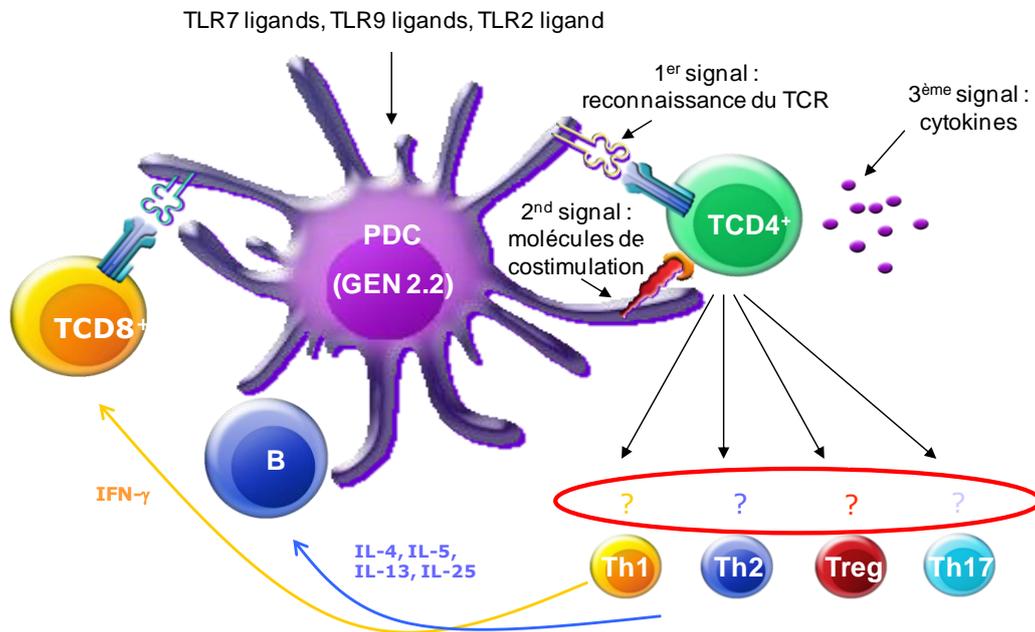
### **INCA, ACI2007: Plasmacytoid dendritic cells in immunity against cancer** **Work package 3.2: Nature of T cell response induced by TLR activated PDC**

Parmi les stratégies thérapeutiques innovantes dans la prise en charge du cancer, certains traitements ciblent les **TLR**, notamment **-7** et **-9**, par l'utilisation d'**agonistes** synthétiques. Ces TLR sont exprimés de façon prédominante par les **pDC**. Les pDC sont des cellules clés dans la réponse immune précoce puisqu'elles permettent de faire le **lien entre immunité innée et adaptative**. En effet, les pDC sont des CPA dites « professionnelles », elles **apprêtent** des peptides antigéniques et les **présentent** au niveau des **organes lymphoïdes** aux **LT** afin de les activer. Dans des conditions optimales d'**activation** des **pDC** d'abord, puis d'**activation** et de **polarisation** des **LT CD4<sup>+</sup>** : la réponse immunitaire aboutit à la **lyse spécifique** des **cellules tumorales** par des **CTL**. Les **pDC** constituent donc un sujet d'investigation majeur pour le développement de nouvelles immunothérapies anticancéreuses dans des modèles aussi variés que les cancers du **sein**, de l'**ovaire** ou de la **peau**.

L'objectif de ce projet, financé par l'**Institut National du cancer (INCA)** est de déterminer la **nature de la polarisation des LT CD4<sup>+</sup> induite par des pDC activées par différents ligands de TLR** : **virus**, ligands **TLR7 (R837, CL097)**, ligands **TLR9 (CpG A, CpG B)** et ligand **TLR2 (HKPG)**.

Pour cela, le profil de la réponse induite par la lignée GEN 2.2 activée mise au contact de **LT CD4<sup>+</sup> naïfs allogéniques** est analysé. La **polarisation des LT CD4<sup>+</sup>**

**activés** : TH1, TH2, TH17 ou Treg (figure 6) est évaluée par **phénotypage** et par dosage de leur production de **cytokines**.



**Figure 6. Natures possibles de la réponse T induite par des pDC activées par leurs TLR.**

Cette étude nous donnera les connaissances nécessaires pour le **choix** d'un **adjuvant, agoniste de TLR**, dans le cadre d'un **vaccin immunothérapeutique anti-tumoral** à base de **pDC**. L'efficacité d'un tel vaccin, comme il a été déjà décrit dans le cas du mélanome (Banchereau *et al.* 2004), nécessite d'induire une **polarisation TH1** des **LT CD4<sup>+</sup>** et de générer des **CTL** spécifiques de la tumeur.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Milieux

- Milieu complet : RPMI 1640 avec Glutamax-1 (GIBCO™ Invitrogen Corporation, Paisley, UK) supplémenté de pyruvate de sodium (1 mM), d'acides aminés non essentiels dilués au 1/100 (GIBCO™) et de gentamycine (20 µg/ml).
- SVF (Sérum de Veau Fœtal, GIBCO™) décomplémenté 30 min à 56°C.
- HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (GIBCO™).

### 2.2. Cellules

- La lignée de cellules stromales murines MS-5 (fournie par R. Berthier, Commissariat à l'Énergie Atomique, Grenoble, France) est cultivée dans du milieu complet + 10% de SVF. La lignée est trypsinée et réensemencée toutes les semaines.
- La lignée GEN 2.2 a été obtenue à partir de cellules dendritiques plasmacytoïdes leucémiques du sang périphérique d'un patient porteur d'une leucémie à pDC. Elles sont cultivées sur les MS-5 irradiées (30 Gy), dans du milieu complet + 10% de SVF. Les cellules sont diluées tous les deux jours et réensemencées dans des boîtes de culture contenant 75 cm<sup>2</sup> de milieu dans une étuve à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> et saturée en humidité.
- Les LT CD4<sup>+</sup> naïfs ont été isolés à partir de sang de cordon ombilical humain par un tri immuno-magnétique CD45RA<sup>+</sup> (Easysep, Stemcell, Vancouver, Canada). Une pureté de 97,4% a été obtenue. Le sang de cordon ombilical humain est fourni par l'Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire, Grenoble, France.

### 2.3. Conditions de culture d'activation des cellules GEN 2.2

Les cellules GEN 2.2 sont cultivées pendant 24h et 48h en plaque 24 puits à 1.10<sup>6</sup> cellules/ml en milieu complet 10% SVF, sans cellules MS-5, en présence des différents activateurs suivants :

- virus de l'*influenza H3N2* (1/250<sup>ème</sup>, Sanofi-aventis, Paris, France) ;

- R837 (ligand TLR7, 1 µg/ml, InvivoGen, San Diego, CA USA) ;
- CL097 (ligand TLR7/8, 1 µg/ml, InvivoGen, San Diego, CA USA) ;
- CpG A (ligand TLR9, 10 µg/ml, Coley Pharma, Ottawa, Canada) ;
- CpG B (ligand TLR9, 10 µg/ml, Coley Pharma, Ottawa, Canada) ;
- HKPG (ligand TLR2, 10<sup>9</sup> U/ml, InvivoGen, San Diego, CA USA).

## 2.4. Culture mixte leucocytaire et activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par PMA/iono

Les cellules GEN 2.2 sont récupérées après activation, irradiées (30 Gy) et mises en culture en présence de LT CD4<sup>+</sup> naïfs allogéniques issus de sang de cordon humain. 20 000 cellules GEN 2.2 et 100 000 LT CD4<sup>+</sup> sont cultivés dans 200 µl de milieu, composé de 50% de surnageant des GEN 2.2 activées.

Après 6 jours de culture mixte leucocytaire, les LT CD4<sup>+</sup> sont stimulés par un traitement mitogène PMA 5 ng/ml (Sigma, Isle d'Abeau, France) et ionomycine 500 ng/ml (Sigma, Isle d'Abeau, France). La PMA est un activateur de la protéine kinase C. La ionomycine est un ionophore qui active la libération des stocks de calcium. PMA et ionomycine agissent en synergie afin d'activer les voies de signalisation dépendantes du calcium (PKC - Ca<sup>2+</sup>/Calmoduline) et conduisent à l'augmentation de la transcription et de la traduction et donc à l'augmentation de la production de cytokines.

Après 1h de stimulation, de la monensine (Golgi stop, Becton Dickinson, Mountain View, CA USA) est ajoutée. La monensine est un inhibiteur du trafic vésiculaire d'exocytose. Ce traitement a pour objectif d'accroître la concentration intracellulaire de cytokines pro-inflammatoires. L'immunomarquage a lieu après 5h.

## 2.5. Phénotypage

L'immunophénotype a été étudié par cytométrie en flux avec l'appareil FACScanto II (Becton Dickinson, Mountain View, CA USA). Les seuils de positivité ont été fixés grâce à des anticorps irrelevantes contrôles.

L'acquisition et l'analyse des données de cytométrie ont été réalisées avec le logiciel Diva® (Becton Dickinson, Mountain View, CA USA).

#### **Anticorps utilisés :**

- anti-CD80-FITC, anti-CD40-PE, 5 µl/test (Beckman Coulter, Marseille, France) ;
- anti-CD4-APC, anti-CD25-PC7, anti-IL-4-PE, anti-IL-17-PE, anti-FoxP3-PE, 2 µl/test (eBiosciences, San Diego, CA USA) ;
- anti-IFN $\gamma$ -FITC, 2 µl/test (Becton Dickinson, Mountain View, CA USA).

**Immunomarquage membranaire :** Les cellules sont incubées sous 200 µL de HBSS 2% SVF avec les anticorps marqués pendant 20 min à 4°C puis lavées (5 min à 600 G) en HBSS 2% SVF. Cette méthode est valable pour les anticorps suivants : anti-CD80, anti-CD40, anti-CD4 et anti-CD25.

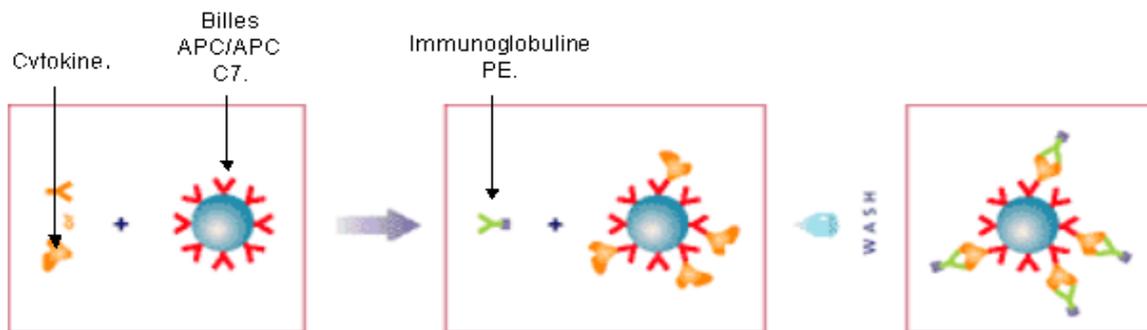
**Immunomarquage intracytoplasmique :** Après l'immunomarquage membranaire, les cellules sont fixées et perméabilisées par addition de 100 µl d'une solution contenant du paraformaldéhyde (Perm/Fix, Becton Dickinson, Mountain View, CA USA) pendant 10 min à température ambiante et dans l'obscurité. Les cellules sont lavées par une solution de Perm wash (Becton Dickinson, Mountain View, CA USA), resuspendues dans 50 µl d'une solution de Perm wash, et incubées avec les anticorps pendant 20 min à 4°C puis lavées au Perm wash. Cette méthode est valable pour les anticorps anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL-4, anti-IL-17 et anti-FoxP3.

## **2.6. Analyse CBA : Cytometric Bead Array**

- Les cytokines pro-inflammatoires : IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$  sont dosées par un kit inflammation (Human Inflammation Kit, Becton Dickinson Cytometric Bead Array, Mountain View, CA USA).
- Les cytokines IL-5, IL-10, IL-13 et IFN- $\gamma$  sont dosés par un kit multiplex (Human Soluble Protein Master Buffer Kit, Becton Dickinson Cytometric Bead Array, Mountain View, CA USA).

Le protocole du test est proche de celui de l'ELISA sandwich. Des billes fluorescentes en APC et en APC-Cy7 sont coatées avec des anticorps spécifiques

des cytokines à doser, ces complexes sont appelés « billes de capture ». Les billes de capture sont mises en présence de l'échantillon à doser, elles vont alors fixer les cytokines par leurs anticorps. Un second anticorps couplé à la PE et spécifique de la même cytokine est ajouté. Les billes sont acquises au cytomètre en flux, l'intensité de la fluorescence PE est alors proportionnelle à la quantité de cytokine capturée par la bille (figure 7).



**Figure 7. Principe du test CBA.**

D'après Becton Dickinson, Mountain View, CA USA.

Une gamme de concentrations est effectuée avec des cytokines recombinantes afin d'établir les courbes étalons pour le dosage de chaque échantillon. Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel FCAP Array (Becton Dickinson, Mountain View, CA USA).

## 2.7. ELISA IFN- $\alpha$

L'IFN- $\alpha$  est dosé par un kit ELISA (Verikine™ Human Interferon Alpha ELISA KIT, PBL InterferonSource, Piscataway, New Jersey, USA).

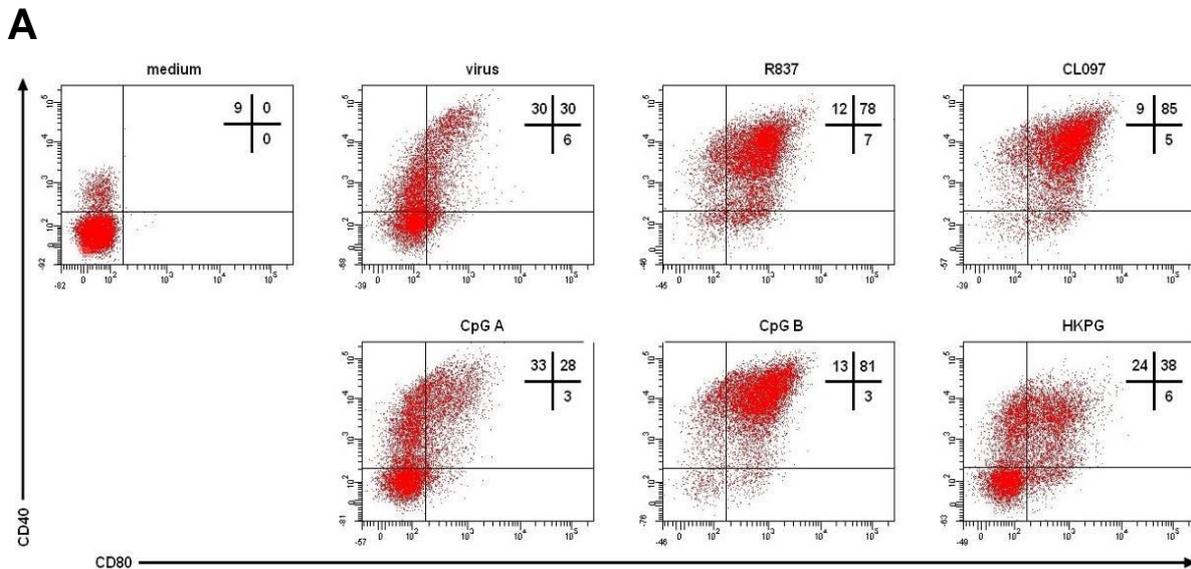
## 2.8. Test d'incorporation de la thymidine tritiée

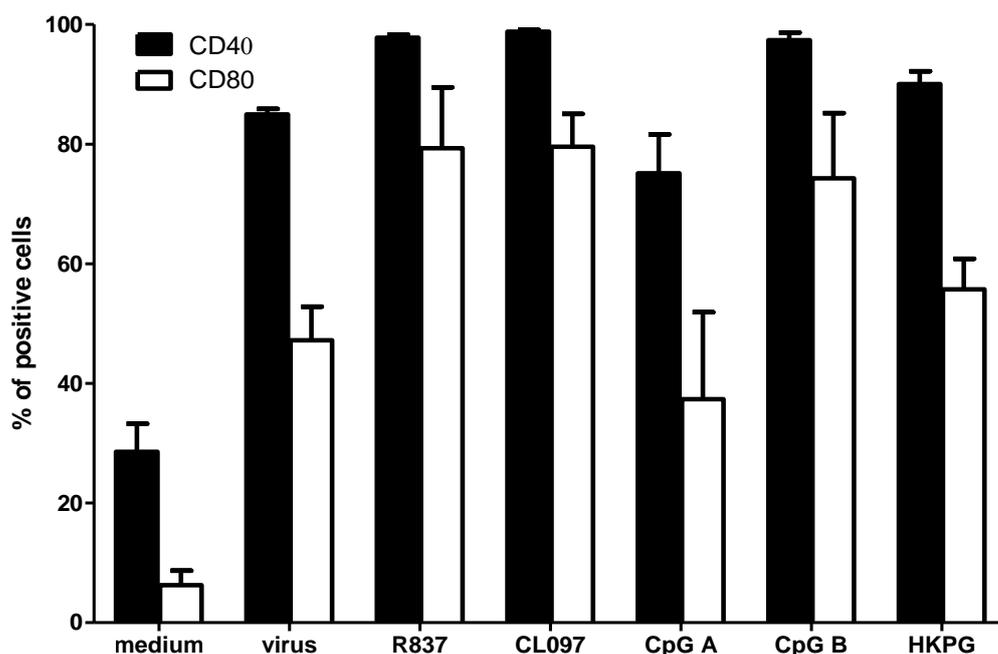
Après 5 jours de culture, de la thymidine tritiée (PerkinElmer, Waltham, Massachussets, USA) est ajoutée aux cultures (3,3  $\mu$ Ci/ml). Au bout de 24h, la radioactivité incorporée dans les cellules est mesurée au Top Count NTX (PerkinElmer, Waltham, Massachussets, USA). La radioactivité mesurée est proportionnelle à la prolifération cellulaire.

### 3. Résultats

#### 3.1. Activation des cellules GEN 2.2

Afin de pouvoir stimuler les LT CD4<sup>+</sup> naïfs, les cellules GEN 2.2 sont cultivées en présence de virus *influenza*, de deux ligands TLR7 : le R837 (imiquimod) et le CL097, de deux ligands TLR9 : CpG A et CpG B et d'une bactérie Gram- : Heat Killed *Porphyromonas gingivalis* (HKPG), ligand TLR2. Après 24h d'activation des GEN, le taux d'expression des molécules de co-stimulation CD40 et CD80 est analysé par cytométrie en flux (figure 8.A).



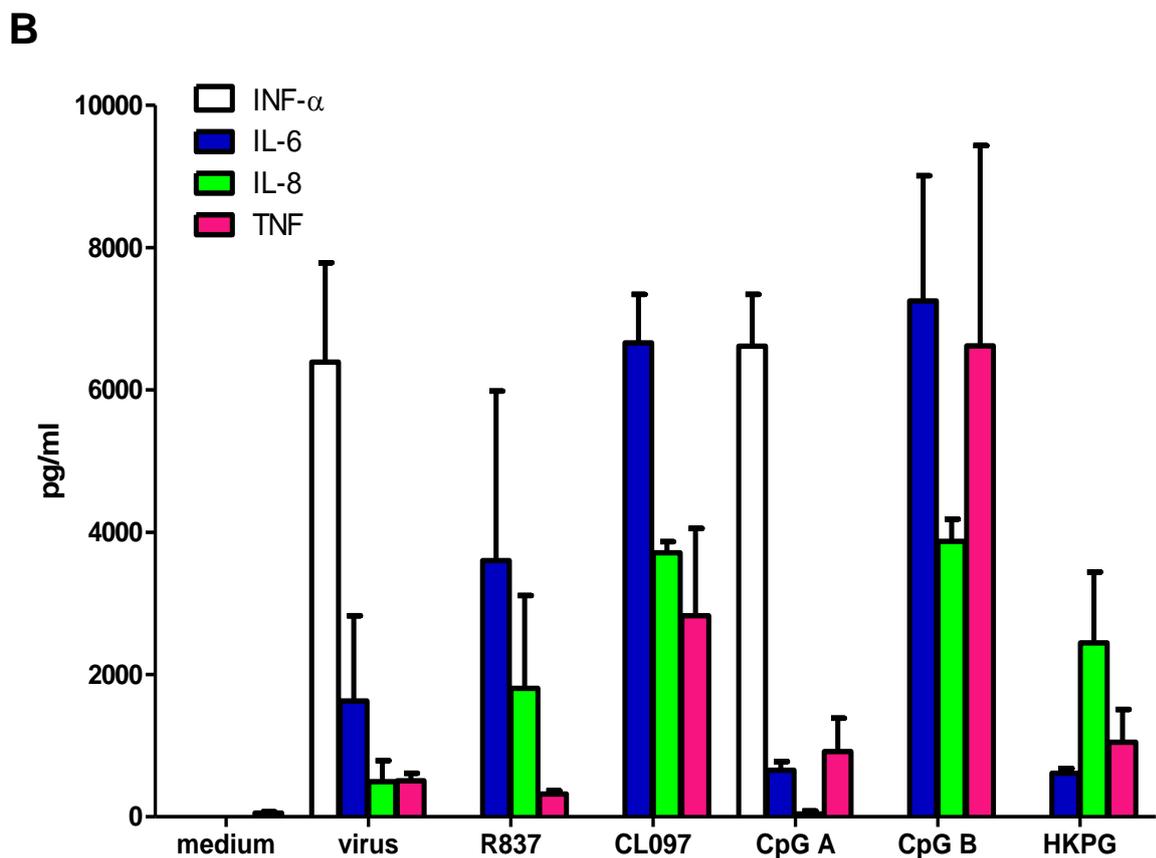
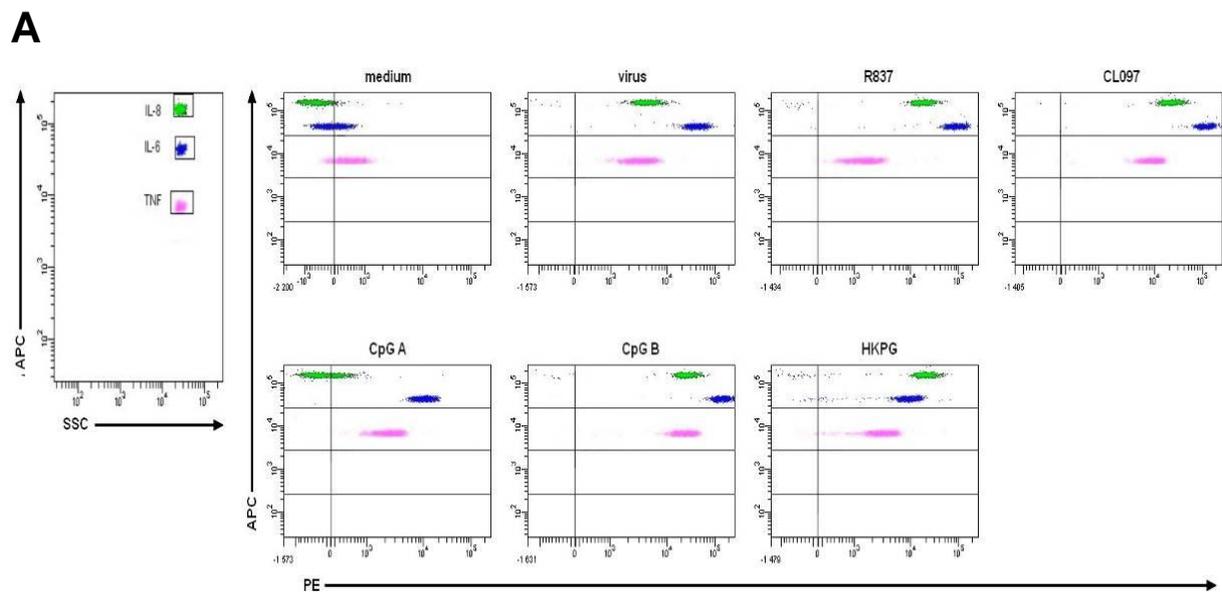
**B**

**Figure 8. Expression des molécules de co-stimulation CD40 et CD80 par les cellules GEN 2.2 après 24h de culture en présence de milieu (medium), de virus de l'influenza, de R837, de CL097, de CpG A, de CpG B et de HKPG.**

**A.** Détermination des pourcentages de cellules positives pour les marqueurs CD80 et CD40 par cytométrie en flux, représentation en dot-plot. **B.** Pourcentages de cellules positives pour CD80 et CD40, histogramme des moyennes et leur écart type de 3 expérimentations indépendantes.

L'activation des GEN par des ligands de TLR induit une augmentation significative de l'expression de **CD40** et **CD80** (>50% de cellules positives pour les deux marqueurs). Les plus forts taux d'activation des GEN sont observés pour les conditions d'activation **R837**, **CL097** et **CpG B** (figure 8.B).

Après 24h d'activation des GEN par les ligands de TLR, le surnageant de culture est récupéré pour analyser la production de cytokines pro-inflammatoires. L'IFN- $\alpha$  est dosé par un test ELISA. Les cytokines IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$  sont dosées par un test CBA : trois billes de capture sont utilisées et se distinguent par leur différence d'intensité en APC. L'analyse de la fluorescence PE de ces billes permet de déterminer les concentrations en cytokine pour chaque échantillon (figure 9.A).



**Figure 9. Production des cytokines pro-inflammatoires IFN- $\alpha$ , IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$  par les cellules GEN 2.2 après 24h de culture en présence de milieu (medium), de virus de l'*influenza*, de R837, de CL097, de CpG A, de CpG B et de HKPG.**

**A.** Dosage par CBA des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$  en fonction de l'intensité moyenne de la fluorescence (MFI) PE des billes (illustration technique d'une manipulation). **B.** Concentrations des cytokines dosées par ELISA et CBA, histogramme des moyennes et leur écart type de 3 expérimentations indépendantes.

On vérifie que les cellules GEN 2.2 non activées (**medium**) ne produisent **aucune** cytokine (figure 9.B).

L'activation des cellules par le **R837** et **HKPG** induit relativement **peu** de production de cytokines pro-inflammatoires : **IL-6**, **IL-8** et **TNF- $\alpha$**  (figures 9.B).

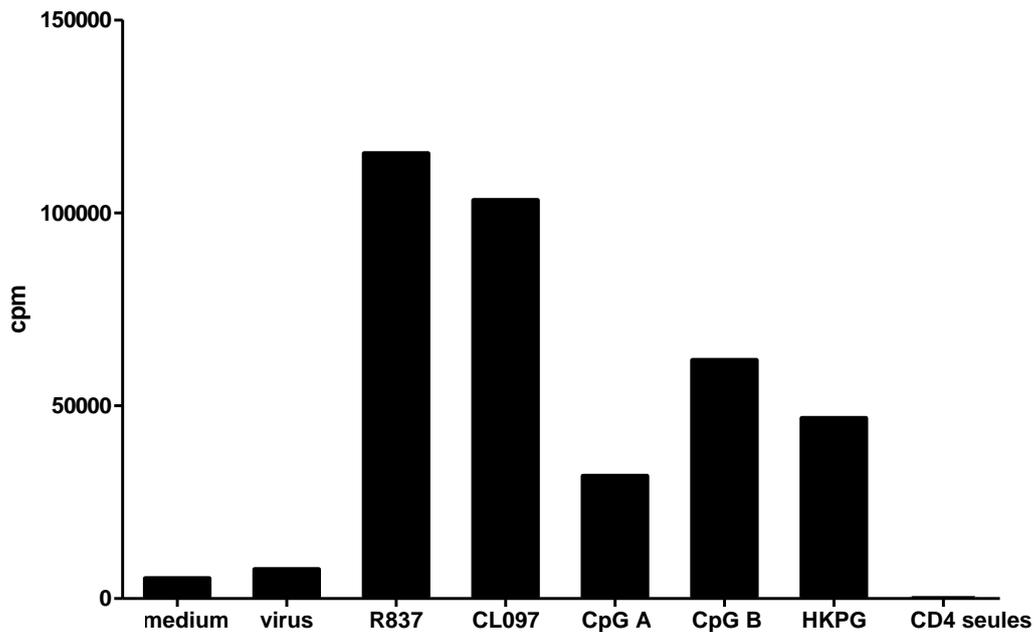
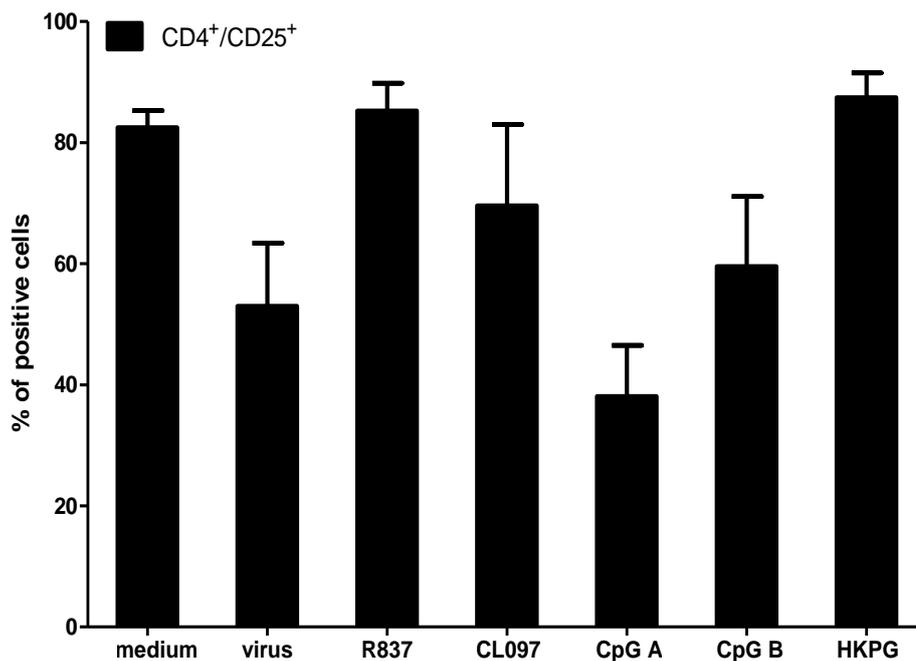
L'**IFN- $\alpha$**  est produit par les cellules GEN activées par le **virus** et le **CpG A** (figure 9.B).

Les GEN activées par le **CL097** et le **CpG B** produisent de l'**IL-6**, de l'**IL-8** et du **TNF- $\alpha$**  en grande quantité, mais pas d'**IFN- $\alpha$**  (figure 9.B). Elles expriment donc un profil de synthèse de cytokines différent des GEN activées par le **virus** et le **CpG A**.

### **3.2. Prolifération et activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

Après 6 jours de culture mixte des cellules GEN 2.2 activées ou non et des LT CD4<sup>+</sup> naïfs, la prolifération cellulaire des LT CD4<sup>+</sup> est évaluée par un test d'incorporation de la thymidine tritiée.

La thymidine tritiée est un nucléotide radioactif, incorporé dans l'ADN lors de la réplication. Un test d'incorporation de la thymidine tritiée permet donc d'évaluer la **prolifération cellulaire**.

**A****B**

**Figure 10. Degrés de prolifération et d'activation des LT CD4<sup>+</sup> stimulés par des cellules GEN 2.2 activées.**

Les cellules GEN 2.2 ont été activées en présence de milieu (medium), de virus de l'*influenza*, de R837, de CL097, de CpG A, de CpG B et de HKPG pendant 24h puis mises en culture en présence ou non de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> pendant 6 jours. **A.** Prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. L'incorporation de thymidine tritiée pendant le dernier jour de culture a été quantifiée par mesure de la radioactivité, histogramme d'une expérimentation. cpm = coups par minute. **B.** Pourcentages de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> activés, histogramme des moyennes et leur écart type de 3 expérimentations indépendantes.

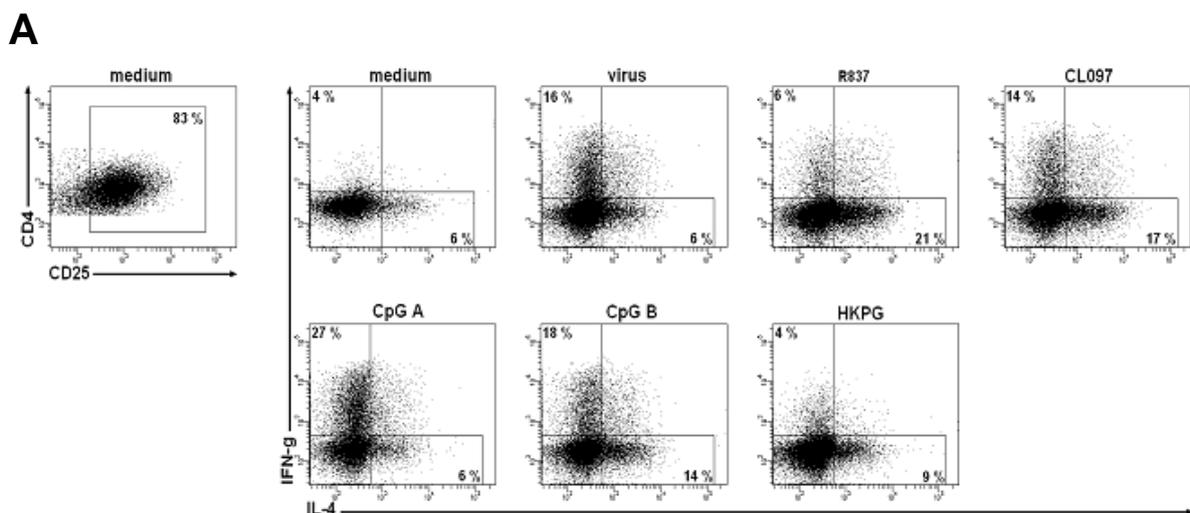
On observe que la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> est plus importante en présence des GEN 2.2 activées par des ligands synthétiques de TLR7 : **R837** et **CL097**. À contrario, les LT CD4<sup>+</sup> au contact des GEN en condition **milieu**, **virus** et **CpG A** prolifèrent peu (figure 10.A).

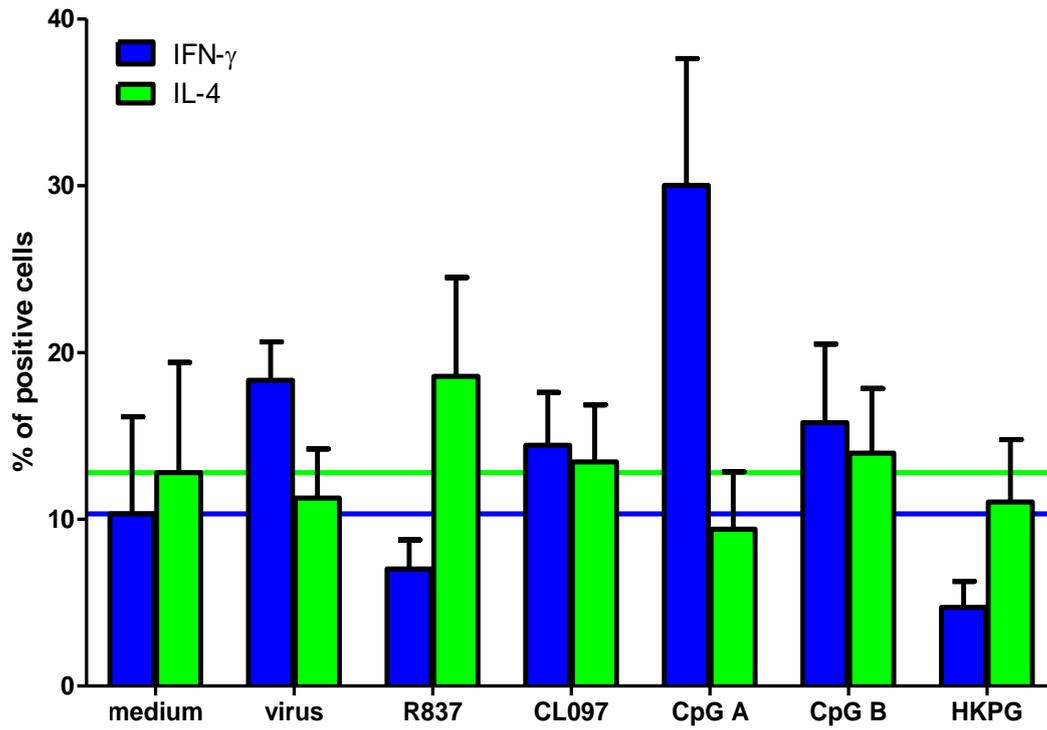
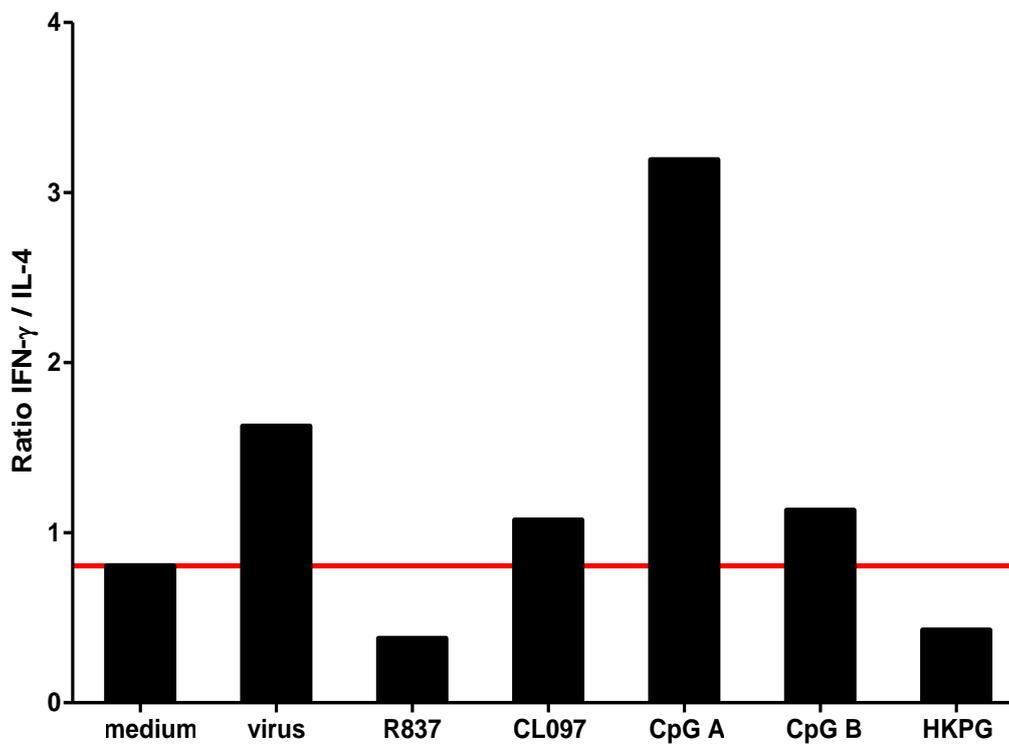
Dans toutes les conditions, il y a **activation** des LT CD4<sup>+</sup> sur la base de l'expression de CD25 (figure 10.B).

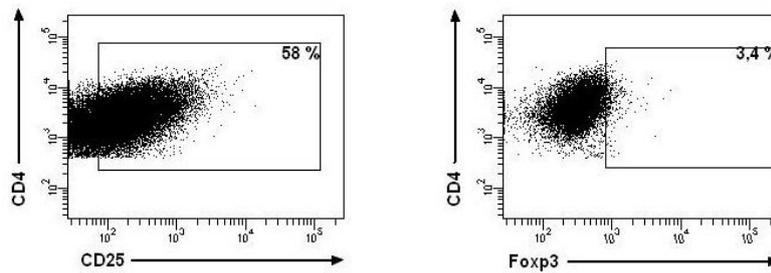
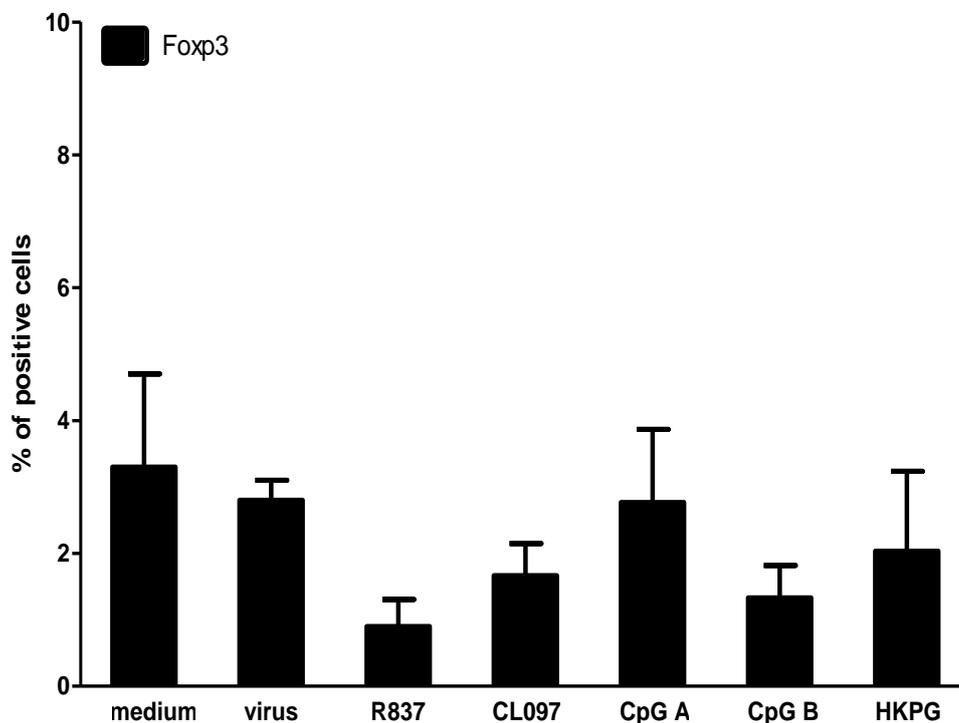
Les conditions d'activation **R837**, **CL097**, **CpG B** et **HKPG** ont induit les plus forts taux d'**activation** des GEN et les plus forts taux de **prolifération** des LT CD4<sup>+</sup>. Néanmoins on observe que la **prolifération** des LT CD4<sup>+</sup> et leur **activation** en LT CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> ne sont **pas corrélées** (figures 10.A et 10.B).

### 3.3. Polarisation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Après 6 jours de culture, les fréquences de LT CD4<sup>+</sup> polarisés dans les voies TH1, TH2, TH17 ou Treg sont évaluées par cytométrie en flux. L'analyse réalisée sur les cellules activées CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, du pourcentage de cellules produisant l'IFN- $\gamma$ , l'IL-4, l'IL-17 ou exprimant Foxp3 nous donne les fréquences respectives de lymphocytes TH1, TH2, TH17 et Treg (figure 11.A).



**B****C**

**D****E**

**Figure 11. Fréquences de lymphocytes TH1, TH2 et Treg induits par des cellules GEN 2.2 activées.**

Les cellules GEN 2.2 ont été activées en présence de milieu (medium), de virus de l'*influenza*, de R837, de CL097, de CpG A, de CpG B et de HKPG pendant 24h puis mises en culture en présence ou non de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> pendant 6 jours. **A.** Exemple de détermination des fréquences de lymphocytes TH1 (cellules positives pour l'IFN- $\gamma$ ), de lymphocytes TH2 (cellules positives pour l'IL-4) parmi les lymphocytes T activés CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> par cytométrie en flux, représentation en dot-plot. **B.** Pourcentages de lymphocytes TH1 et TH2, histogramme des moyennes et leur écart type de 3 expérimentations indépendantes. **C.** Rapport des pourcentages de lymphocytes TH1 / TH2, histogramme des moyennes de 3 expérimentations indépendantes. **D.** Exemple de détermination des fréquences de lymphocytes Treg (cellules positives pour Foxp3) parmi les lymphocytes T activés CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> par cytométrie en flux, représentation en dot-plot. **E.** Pourcentages de lymphocytes Treg, histogramme des moyennes et leur écart type de 2 expérimentations indépendantes.

La réaction allogénique des LT envers des GEN 2.2 non activées (**medium**) induit à la fois une **polarisation TH1 et TH2** (ratio TH1 / TH2 : 0,81) (figure 11.C). Les activations par le **CL097** et le **CpG B** induisent également des fréquences similaires de LT IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ( $14,4 \pm 3,1\%$  et  $15,8 \pm 4,7\%$  respectivement) et IL-4<sup>+</sup> ( $13,4 \pm 3,4\%$  et  $13,9 \pm 3,9\%$  respectivement), synonyme d'une **double polarisation TH1 et TH2** (figure 11.C).

Par rapport à la condition medium, l'activation des GEN 2.2 par le **virus** et le **CpG A** induisent des fréquences importantes de LT IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ( $18,3 \pm 2,3\%$  et  $30,0 \pm 7,6\%$  respectivement) et des fréquences de LT IL-4<sup>+</sup> proches de celles observées en condition medium, résultats synonymes d'une **polarisation TH1** (figure 11.C).

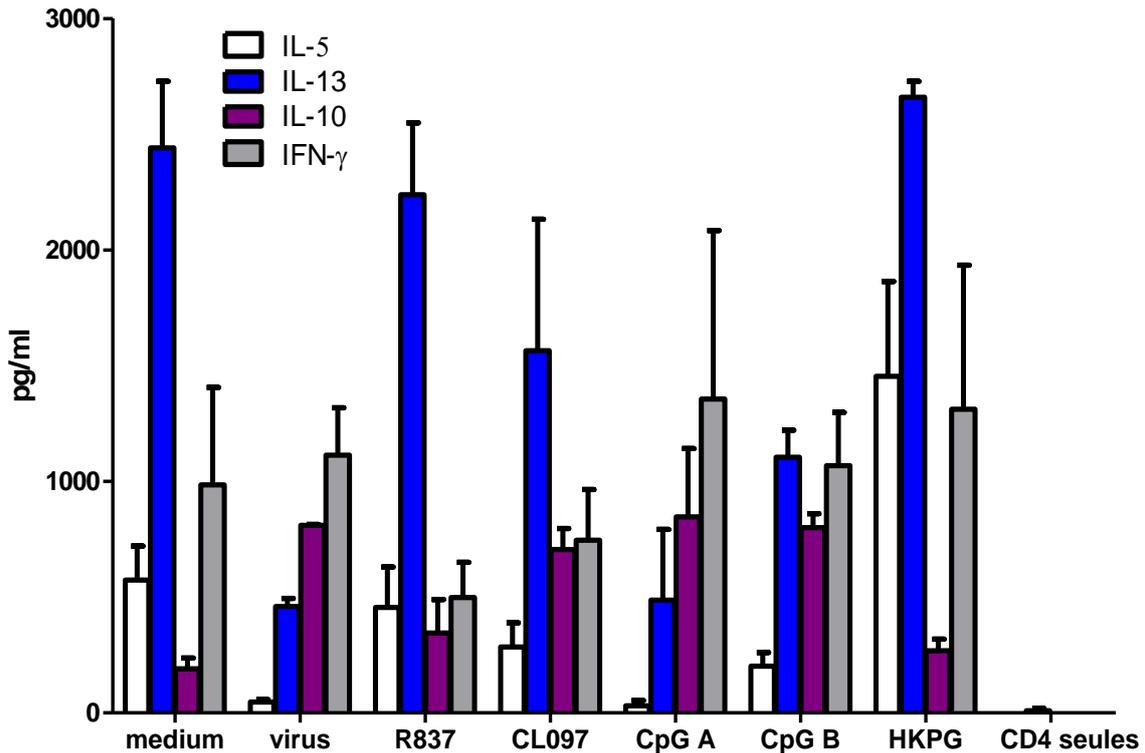
En revanche, les GEN 2.2 activées par le **R837** et le **HKPG** induisent aux LT l'expression d'**IL-4** ( $18,6 \pm 5,9\%$  et  $11,0 \pm 3,7\%$  respectivement) et peu d'IFN- $\gamma$ , résultats synonymes d'une **polarisation TH2** (figure 11.C).

Le ratio IFN- $\gamma$  / IL-4, c'est-à-dire le ratio TH1 / TH2 le plus fort est exprimé pour la condition d'activation CpG A : 3,19. Le ratio TH1 / TH2 le plus faible est exprimé pour R837 : 0,38 (figure 11.C).

Quel que soit le ligand TLR utilisé pour l'activation des GEN 2.2, l'induction de LT **Foxp3<sup>+</sup>**, donc de **Treg** est de faible fréquence (<4%) (figure 11.E), l'anticorps utilisé étant validé par ailleurs.

L'induction de LT **IL-17<sup>+</sup>**, donc de **TH17**, n'est volontairement pas représentée. En effet, celle-ci n'a jamais dépassé 3% et aucun contrôle positif n'a été réalisé pour valider ces résultats.

Après 6 jours de culture mixte leucocytaire, les surnageants sont récupérés pour analyser la production de cytokines par CBA. Le dosage des cytokines produites par les LT CD4<sup>+</sup> est un moyen supplémentaire d'évaluer la polarisation TH1 / TH2.



**Figure 12. Production des cytokines IL-5, IL-13, IL-10 et IFN- $\gamma$  par les LT CD4<sup>+</sup> après 6 jours de culture en présence de GEN 2.2 activées.**

Les cellules GEN 2.2 ont été activées en présence de milieu (medium), de virus de l'*influenza*, de R837, de CL097, de CpG A, de CpG B et de HKPG pendant 24h puis mises en culture en présence ou non de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> pendant 6 jours. Les cytokines ont été dosées par CBA, histogramme des moyennes et leur écart type de 3 expérimentations indépendantes.

Les cytokines **IFN- $\gamma$**  et **IL-10** sont produites dans les conditions d'activation **virus** et **CpG A** (figure 12), synonymes d'une **polarisation TH1**.

Les cytokines **IL-5** et **IL-13** sont produites dans les conditions d'activation **R837** et **HKPG** (figure 12), synonymes d'une **polarisation TH2**.

Les conditions d'activation **CL097** et **CpG B** induisent la production d'**IL5**, d'**IL13** et d'**IFN- $\gamma$**  (figure 12), synonymes à la fois d'une **polarisation TH1 et TH2**.

En fonction des différents ligands TLR utilisés : la nature de la réponse T induite étudiée par phénotypage est corrélée à celle explorée par le dosage des cytokines présentes dans le milieu.

## 4. Discussion

Nous avons évalué la **polarisation des LT CD4<sup>+</sup> induite par des pDC activées par différents ligands de TLR** : ligands **TLR7**, **TLR9** et ligand **TLR2**. Et ce, afin de déterminer le **potentiel** de la pDC dans la mise en œuvre d'une réponse immunitaire adaptative et de sélectionner un **candidat adjuvant au vaccin immunothérapeutique anti-tumoral**.

L'**activation** des **cellules GEN 2.2** est satisfaisante pour l'ensemble des ligands utilisés : la majorité des cellules sont positives pour les deux marqueurs de co-stimulation **CD40** et **CD80**.

Les cellules GEN 2.2 activées par le **virus** et le **CpG A** produisent de l'**IFN- $\alpha$** . Activées par le **CpG B**, **R837**, **CL097** et **HKPG**, elles produisent des cytokines pro-inflammatoires : **IL-6**, **IL-8** et **TNF- $\alpha$** .

La production d'**IFN- $\alpha$**  par des pDC activées par le virus de l'*influenza* a été décrite depuis plus d'une dizaine d'années (Cella *et al.* 1999 ; Siegal *et al.* 1999). Les **CpG A** comme le **virus** induisent principalement la production **massive** d'**IFN- $\alpha$**  et une faible expression des molécules de co-stimulation alors que les **CpG B** induisent la maturation des pDC et une production **faible voire nulle** d'**IFN- $\alpha$**  (Krug *et al.* 2001 ; Gray *et al.* 2007). Les ligands TLR7, tels que **R837** et **CL097**, induisent l'**activation** des pDC et la production de **cytokines pro-inflammatoires** (Hemmi *et al.* 2002). L'une des originalités de notre étude réside dans l'activation des pDC par le ligand TLR2 : **HKPG**, jusqu'alors non réalisée. Ce dernier induit l'**activation** des GEN 2.2 mais une **faible** production de **cytokines pro-inflammatoires**.

La **prolifération** des **LT CD4<sup>+</sup>** en condition **medium** est **nulle**. En effet, l'absence de maturation des cellules GEN 2.2 interdit l'activation des lymphocytes. La prolifération des LT CD4<sup>+</sup> est plus importante en présence des GEN 2.2 activées par des ligands synthétiques de **TLR7** : **R837** et **CL097**. En revanche, la prolifération est plus faible en condition **CpG B** et **HKPG**. Elle est plus faible encore pour les conditions d'activation **virus** et **CpG A**. La production d'**IFN- $\alpha$**  par les GEN 2.2 est corrélée à une **faible prolifération** des LT CD4<sup>+</sup> (Curreli *et al.* 2001).

Quelles que soient les conditions, l'**activation des LT CD4<sup>+</sup>** évaluée par l'expression de **CD25** est très forte. **Prolifération** et **activation** des lymphocytes ne sont **pas corrélées**.

**Aucune polarisation TH17** des **LT CD4<sup>+</sup> naïfs** n'a pu être mise en évidence après activation des cellules GEN 2.2 par les différents ligands. Néanmoins aucun contrôle positif n'a été effectué. L'induction d'une polarisation TH17 pourrait être obtenue notamment par l'addition d'**IL-23**. Plusieurs études ont établi que les **DC** produisant de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6, de l'IL-23, du TNF- $\alpha$  et/ou du TGF- $\beta$  induisent la **différenciation de TH17** (Acosta-Rodriguez *et al.* 2007a ; Acosta-Rodriguez *et al.* 2007b ; Wilson *et al.* 2007 ; Korn *et al.* 2009). Une équipe a même démontré que des **pDC activées** par un ligand synthétique de TLR7 induisent la différenciation de LT CD4<sup>+</sup> naïfs en TH produisant séquentiellement de l'IL-10, de l'IFN- $\gamma$  et de l'**IL-17** (Lombardi *et al.* 2009). Nous devons réaliser de nouvelles manipulations de mise au point pour étudier plus en avant cette question.

Une **polarisation Treg** des **LT CD4<sup>+</sup> naïfs** n'a pas non plus été mise en évidence après activation des cellules GEN 2.2 par les différents ligands de TLR, notre marquage étant validé par ailleurs. Pourtant une étude a montré que des **pDC activées** par différentes classes d'ODN CpG peuvent induire des **Treg** produisant de l'**IL-10**, du TGF- $\beta$ , de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-6 ; néanmoins **aucune** production d'**IL-10** ou de **TGF- $\beta$**  par les pDC activées par ces CpG n'a pu être détectée (Moseman *et al.* 2004). Ces résultats indiquent que les **pDC** sont capables d'induire des **Treg** mais selon un **mécanisme différent** de celui utilisé par les mDC (Gilliet & Liu 2002 ; Kuwana 2002). Ce n'est que récemment qu'une équipe a démontré que les pDC humaines convertissent des LT CD4<sup>+</sup> naïfs en Treg grâce à l'expression intracellulaire de l'enzyme **indoleamine 2,3-dioxygénase**, une enzyme qui catabolise la dégradation du **tryptophane** (Chen *et al.* 2008). La **pauvreté** du milieu en cet **acide aminé essentiel** est à la base du développement des **Treg** (Mellor & Munn 2004).

Dans nos mains, les GEN 2.2 ne polarisent pas vers **Treg**. Ce résultat est **favorable** pour leur utilisation en thérapie cellulaire.

Les cellules GEN 2.2 activées par le **CL097** et le **CpG B** induisent à la fois une **polarisation TH1 et TH2** des **LT CD4<sup>+</sup> naïfs** avec la production d'**IL-5**, d'**IL-13**, d'**IL-10** et d'**IFN-γ**. Bien que les LT CD4<sup>+</sup> ne prolifèrent pas en condition **medium**, leur profil de polarisation est similaire à celui observé pour les conditions **CL097** et **CpG B**. L'absence de production d'IFN-α par les pDC réduit la production d'IFN-γ par les LT activés et n'augmente pas la production d'IL-4 (Kapsenberg 2003). Ce **défaut** de production de cytokines de polarisation TH1 ou TH2 semble responsable de l'**absence d'orientation** observée.

Par rapport à la condition **medium**, les cellules GEN 2.2 activées par le **virus** et le **CpG A** induisent la **polarisation TH1** des **LT CD4<sup>+</sup> naïfs** avec la production d'**IFN-γ** et d'**IL-10**. Ce profil cytokinique est caractéristique d'une polarisation TH1 (Liu *et al.* 2007). Il a été montré que c'est la production d'**IFN-α** par les **pDC** qui induit cette polarisation (Ito *et al.* 2002).

Les cellules GEN 2.2 activées par le **R837** et le **HKPG** induisent la **polarisation TH2** des **LT CD4<sup>+</sup> naïfs** avec production d'**IL-5** et d'**IL-13**. La polarisation TH2 induite pourrait s'expliquer par la production de cytokines de polarisation TH2, comme **CCL2** ou **PGE2** (De Jong *et al.* 2002). Or le dosage de telles cytokines n'a pas été réalisé, ce qui constitue l'une des limites de notre étude.

Une éventuelle **polarisation TH9** ou **TH22** des **LT CD4<sup>+</sup> naïfs** n'a pas été recherchée au cours de cette étude. Ces deux sous-populations de TH sont impliquées dans le développement de **processus inflammatoires** et **auto-immuns**. La différenciation de **TH22** à partir de LT CD4<sup>+</sup> naïfs a été démontrée comme étant **médiée** par les **pDC** de façon dépendante de l'**IL-6** et du **TNF-α** (Duhon *et al.* 2009). Or notre étude a montré une **sécrétion significative** d'**IL-6**, d'**IL-8** et de **TNF-α** pour les conditions d'activation **CL097** et **CpG B** : il se pourrait donc que des TH22 soient induits. Le rôle de chacune de ces cytokines pro-inflammatoires dans la polarisation de la réponse T doit donc être précisé par l'utilisation de protéines recombinantes et d'anticorps bloquants.

Ces résultats et la bibliographie suggèrent la capacité des pDC à induire **tous les profils de polarisation connus des LT CD4<sup>+</sup>**. Il est donc nécessaire de poursuivre

l'exploration de l'activité des cytokines sécrétées par les cellules GEN 2.2. D'autres cytokines ou chimiokines susceptibles d'induire une polarisation TH1 des LT CD4<sup>+</sup> restent notamment à explorer : IL-12, IL-18, IL-23, IL-27 (Trinchieri *et al.* 2003)...

Nos résultats obtenus pour le **ligand TLR9, CpG A**, sont conformes aux exigences d'un **candidat adjuvant au vaccin immunothérapeutique anti-tumoral** : les pDC activées par ce ligand produisent de l'**IFN- $\alpha$** , induisent la **polarisation TH1 des LT CD4<sup>+</sup> naïfs** et donc leur production d'**IFN- $\gamma$**  et d'**IL-10**. Ces résultats intéressants concordent avec ceux obtenus lors de son utilisation dans un essai clinique chez des patients atteints de mélanome : l'utilisation de ce ligand en tant qu'**adjuvant** a **augmenté jusqu'à 3 fois la fréquence de CTL spécifiques de l'antigène de mélanome administré** (Speiser *et al.* 2005). L'**imiquimod**, ligand **TLR7** de synthèse, a déjà été utilisé comme **adjuvant** d'un **vaccin immunothérapeutique** contre le **mélanome**. L'étude d'Adams *et al.* 2008 démontre l'efficacité de la vaccination par un peptide tumoral associé à ce ligand, avec la mise en place d'une immunité cellulaire.

La caractérisation de la **nature de la polarisation des LT CD4<sup>+</sup>** en fonction de l'**activation TLR-7** ou **-9** de la **pDC** nous permettra de mieux appréhender le rôle de ces cellules dans la mise en place de réponses immunes anti-tumorales.

THÈSE présentée et soutenue par : **Bruno REVOL**

TITRE :

**Potentiel des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans l'immunité anti-tumorale : nature de la réponse T induite par des pDC activées par différents ligands TLR**

*Étude de candidats adjuvants au vaccin immunothérapeutique*

## Conclusion

Les **cellules dendritiques** sont des **cellules présentatrices d'antigènes** dites « **professionnelles** », elles jouent un rôle central dans la régulation des réponses immunes innée et adaptative. Parmi elles, les **cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)** offrent de nouvelles perspectives dans le domaine de l'**immunothérapie anti-tumorale**, explorées par l'unité INSERM U823 équipe 9 Immunobiologie et Immunothérapie des cancers. À ce titre, le **mélanome** constitue le modèle de recherche le plus abouti.

L'**immunothérapie anti-tumorale active** repose sur le principe de **vaccination** : elle **mobilise** et **renforce** les ressources du système immunitaire du patient. Cette stratégie pourrait être plus efficace sur le long terme qu'une **stratégie passive** (injection d'IFN- $\alpha$ , d'IL-2, d'anticorps ou de CTL générées *ex vivo*) car elle permet à la fois la mise en place d'une **immunité thérapeutique** et d'une **immunité protectrice** par l'intermédiaire des **lymphocytes T (LT) mémoires**.

Par ailleurs, des essais cliniques en cours dans le traitement du cancer ciblent les **Toll Like Récepteurs (TLR)** par l'utilisation d'**agonistes synthétiques** comme **adjuvants**. Différents ligands de TLR activeront différemment les pDC, avec pour conséquence l'induction par ces dernières de réponses immunes différentes. En effet, après activation via les **TLR7** et **-9**, les **pDC** **apprêtent** des peptides antigéniques et les **présentent** en association aux molécules **HLA de classe II** afin d'activer les **LT CD4<sup>+</sup>**, véritables chefs d'orchestre de la réponse immune. Les pDC activées par certains ligands de TLR sont plus particulièrement capables de sécréter

de grandes quantités d'**interféron- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )** et de délivrer un **signal de co-stimulation** autorisant l'**activation** et la **polarisation** optimales des LT CD4<sup>+</sup>.

Afin de sélectionner un **candidat adjuvant**, qui pourrait être associé à un **vaccin immunothérapeutique anti-tumoral** basé sur des **pDC**, nous avons cherché à déterminer la **nature de la réponse T induite par des pDC activées par différents ligands des TLR7 et -9**. L'efficacité d'un tel vaccin nécessite d'induire une **polarisation T helper 1 (TH1)** des **LT CD4<sup>+</sup>** afin de générer des **lymphocytes T cytotoxiques spécifiques** de la tumeur, effecteurs de l'immunité anti-tumorale.

Nos résultats obtenus pour le **ligand TLR9, CpG A**, sont conformes aux exigences retenues : les pDC activées par ce ligand produisent de l'**IFN- $\alpha$**  et induisent la **polarisation TH1** des **LT CD4<sup>+</sup> naïfs** (production d'**IFN- $\gamma$**  et d'**IL-10**).

Poursuivre la caractérisation de la **nature de la polarisation des LT CD4<sup>+</sup>** en fonction de l'**activation TLR7** ou **-9** de la **pDC** et de ses conséquences pour l'induction des **réponses T cytotoxiques CD8<sup>+</sup>** nous permettra de mieux appréhender le **potentiel** de ces cellules dans la mise en place de réponses immunes anti-tumorales.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 19/5/2011

LE DOYEN

Professeur Christophe RIBUOT



LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Docteur Benoit ALLENET



## Références

- Acosta-Rodriguez, E.V., Napolitani, G. et al.** Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8, 942-9 (2007a).
- Acosta-Rodriguez, E.V., Rivino, L. et al.** Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8, 639-46 (2007b).
- Adams, S., O'Neill, D.W. et al.** Immunization of malignant melanoma patients with full-length NY-ESO-1 protein using TLR7 agonist imiquimod as vaccine adjuvant. *J Immunol* 181, 776-84 (2008).
- Amigorena, S. & Savina, A.** Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Current Opinion in Immunology* 22, 109-17 (2010).
- Annunziato, F., Cosmi, L. et al.** Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 204, 1849-61 (2007).
- Aouba, A., Pequignot, F. et al.** Les causes médicales de décès en France en 2004 et leur évolution 1980-2004. *INVS - BEH* 35-36, 308-14 (2007).
- Ardavin, C.** Thymic dendritic cells. *Immunol Today* 18, 350-61 (1997).
- Aspord, C., Pedroza-Gonzalez, A. et al.** Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. *J Exp Med* 204, 1037-47 (2007).
- Aspord, C., Charles, J. et al.** A novel cancer vaccine strategy based on HLA-A\*0201 matched allogeneic plasmacytoid dendritic cells. *J PLoS ONE* 5, 5e10458 (2010).
- Asselin-Paturel, C., Boonstra, A. et al.** Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2, 1144-50 (2001).
- Atkins, M.B., Robertson, M.J. et al.** Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 3, 409-17 (1997).
- Banchereau, J., Briere, F. et al.** Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811 (2000).
- Banchereau, J., Fay, J. et al.** Dendritic cells as melanoma vaccines. *Dev Biol (Basel)* 116, 147-56; discussion 179-86 (2004).
- Banchereau, J. & Palucka, A.K.** Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 5, 296-306 (2005).

- Belot, A., Grosclaude, P. et al.** Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* 56, 159-75 (2008).
- Bendriss-Vermare, N., Barthelemy, C. et al.** Human thymus contains IFN $\alpha$ -producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. *J Clin Invest* 107, 835-44 (2001).
- Bukowski, R.M., Goodman, P. et al.** Phase II trial of high-dose intermittent interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma: a Southwest Oncology Group study. *J Natl Cancer Inst* 82, 143-6 (1990).
- Cella, M., Jarrossay, D. et al.** Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5, 919-23 (1999).
- Chaperot, L., Bendriss, N. et al.** Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 97, 3210-7 (2001).
- Chaperot, L., Blum, A. et al.** Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 176, 248-55 (2006).
- Chen, W., Liang, X. et al.** The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol* 181, 5396-404 (2008).
- Coley, W.B.** The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of then original cases. *Am J Med Assoc* 105, 487-511 (1893).
- Colonna, M., Trinchieri, G. & Liu, Y.J.** Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 5, 1219-26 (2004).
- Cooper, C.L., Angel, J.B. et al.** CPG 7909 adjuvant plus hepatitis B virus vaccination in HIV-infected adults achieves long-term seroprotection for up to 5 years. *Clin Infect Dis* 46, 1310-4 (2008).
- Cooper, C.L., Davis, H.L. et al.** CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antiretroviral-treated HIV-infected adults. *Aids* 19, 1473-9 (2005).
- Cooper, C.L., Davis, H.L. et al.** CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Egenerix-B HBV vaccine in 212 healthy adults: a double-blind phase I/II study. *J Clin Immunol* 24, 693-701 (2004a).
- Cooper, C.L., Davis, H.L. et al.** Safety and immunogenicity of CPG 7909 injection as an adjuvant to Fluarix *influenza* vaccine. *Vaccine* 22, 3136-43 (2004b).
- Creagan, E.T., Frytak, S. et al.** Phase I study of recombinant leukocyte A interferon (IFN- $\alpha$  2A, Roferon-A) with doxorubicin in advanced malignant disease. *Cancer* 64, 1034-7 (1989).

- Curreli, S., Romerio, F. et al.** Human primary CD4+ T cells activated in the presence of IFN- $\alpha$  2b express functional indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Interferon Cytokine Res* 21, 431-7 (2001).
- De Jong, E.C., Vieira, P.L. et al.** Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J Immunol* 168, 1704-9 (2002).
- Della Bella, S., Gennaro, M. et al.** Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 89, 1463-72 (2003).
- DeNardo, D.G. & Coussens, L.M.** Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 9, 212 (2007).
- Di Domizio, J.** Place des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans l'immunité innée anti-tumorale, de leur activation par des ligands de TLR à leur fonctionnalité en contexte de mélanome. Thèse de l'école doctorale Chimie et Sciences du Vivant Grenoble I (2009a).
- Di Domizio, J., Blum, A. et al.** TLR7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type I IFN. *Blood* 114, 1794-802 (2009b).
- Dreno, B., Nguyen, J.M. et al.** Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 51, 539-45 (2002).
- Dudley, M.E., Wunderlich, J.R. et al.** Cancer regression and autoimmunity following clonal repopulation with anti-tumor lymphocytes and non-myeloablative conditioning. *Science* 298, 850-4 (2002).
- Duhen, T., Geiger, R. et al.** Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 10, 857-63 (2009).
- Dummer, R., Hauschild, A. et al.** An Exploratory Study of Systemic Administration of the Toll-like Receptor-7 Agonist 852A in Patients with Refractory Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res* 14, 856-64 (2008).
- Dumont, F.J.** Alemtuzumab (Millennium/ILEX). *Curr Opin Investig Drugs* 2, 139-60 (2001).
- Dzionek, A., Fuchs, A. et al.** BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 165, 6037-46 (2000).
- Ellis, R.D., Mullen, G.E. et al.** A Phase 1 study of the blood-stage malaria vaccine candidate AMA1-C1/Alhydrogel with CPG 7909, using two different formulations and dosing intervals. *Vaccine* 27, 4104-9 (2009).

- Fedele, G., Stefanelli, P. et al.** Bordetella pertussis-infected human monocyte-derived dendritic cells undergo maturation and induce Th1 polarization and interleukin-23 expression. *Infect Immun* 73, 1590-7 (2005).
- Gerlini, G., Urso, C. et al.** Plasmacytoid dendritic cells represent a major dendritic cell subset in sentinel lymph nodes of melanoma patients and accumulate in metastatic nodes. *Clin Immunol* 125, 184-93 (2007).
- Gilliet, M. & Liu, Y.J.** Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells. *Hum Immunol* 63, 1149-55 (2002).
- Gobert, M., Treilleux, I. et al.** Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res* 69, 2000-9 (2009).
- Gray, R.C., Kuchtey, J. et al.** CpG-B ODNs potently induce low levels of IFN- $\alpha$  and induce IFN- $\alpha$ -dependent MHC-I cross-presentation in DCs as effectively as CpG-A and CpG-C ODNs. *J Leukoc Biol* 81, 1075-85 (2007).
- Gresser, I. & Bourali, C.** Antitumor effects of interferon preparations in mice. *J Natl Cancer Inst* 45, 365-76 (1970).
- Grouard, G., Risoan, M.C. et al.** The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 185, 1101-11 (1997).
- Gu, M., Hine, P.M. et al.** Increased potency of BioThrax anthraxvaccine with the addition of the C-class CpG oligonucleotide adjuvant CPG 10109. *Vaccine* 25, 526-34 (2007).
- Haeryfar, S.M.** The importance of being a pDC in antiviral immunity: the IFN mission versus Ag presentation? *Trends Immunol* 26, 311-7 (2005).
- Halperin, S.A., Dobson, S. et al.** Comparison of the safety and immunogenicity of hepatitis B virus surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide and a licensed hepatitis B vaccine in healthy young adults. *Vaccine* 24, 20-6 (2006).
- Happel, K.I., Dubin, P.J. et al.** Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med* 202, 761-9 (2005).
- Heil, F., Hemmi, M. et al.** Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526-9 (2004).
- Hemmi, H., Kaisho, T. et al.** Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3, 196-200 (2002).

- Hennings, H., Glick, A.B. et al.** Critical aspects of initiation, promotion, and progression in multistage epidermal carcinogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 202, 1-8 (1993).
- Hernberg, M., Pyrhonen, S. et al.** Regimens with or without interferon-alpha as treatment for metastatic melanoma and renal cell carcinoma: an overview of randomized trials. *J Immunother* 22, 145-54 (1999).
- Hofmann, M.A., Kors, C. et al.** Phase 1 evaluation of intralesionally injected TLR9-agonist PF-3512676 in patients with basal cell carcinoma or metastatic melanoma. *J Immunother* 31, 520-7 (2008).
- Hoshino, K., Takeuchi, O. et al.** Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162, 3749-52 (1999).
- Huang, A.Y., Golumbek, P. et al.** Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 264, 961-5 (1994).
- Hunder, N.N., Wallen, H. et al.** Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med* 358, 2698-703 (2008).
- Infante-Duarte, C., Horton, H.F. et al.** Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 165, 6107-15 (2000).
- Inglefield, J.R., Dumitru, C.D. et al.** TLR7 agonist 852A inhibition of tumor cell proliferation is dependent on plasmacytoid dendritic cells and type I IFN. *J Interferon Cytokine Res* 28, 253-63 (2008).
- Ishikawa, F., Niino, H. et al.** The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways. *Blood* 110, 3591-660 (2007).
- Ito, T., Amakawa, R. et al.** Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* 195, 1507-12 (2002).
- Ito, T., Liu, Y.J. & Kadowaki, N.** Functional diversity and plasticity of human dendritic cell subsets. *Int J Hematol* 81, 188-96 (2005a).
- Ito, T., Wang, Y.H. & Liu, Y.J.** Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin Immunopathol* 26, 221-9 (2005b).
- Jameson, B., Baribaud, F. et al.** Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques. *J Virol* 76, 1866-75 (2002).
- Kadowaki, N., Antonenko, S. et al.** Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 192, 219-26 (2000).

- Kadowaki, N., Ho, S. et al.** Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 194, 863-9 (2001).
- Kanzler, H., Barrat, F.J. et al.** Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 13, 552-9 (2007).
- Kapsenberg, M.L.** Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3, 984-93 (2003).
- Karsunky, H., Merad, M. et al.** Developmental origin of interferon-alpha-producing dendritic cells from hematopoietic precursors. *Exp Hematol* 33, 173-81 (2005).
- Kelsall, B.L. & 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* 183, 237-47 (1996).
- Kennedy, R. & Celis, E.** Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol Rev* 222, 129-44 (2008).
- Korn, T., Bettelli, E. et al.** IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27, 485-517 (2009).
- Krug, A., Rothenfusser, S. et al.** Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 31, 2154-63 (2001).
- Kurts, C., Kosaka, H. et al.** Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* 186, 239-45 (1997).
- Kuwana, M.** Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum Immunol* 63, 1156-63 (2002).
- Labarriere, N., Pandolfino, M.C. et al.** Therapeutic efficacy of melanoma-reactive TIL injected in stage III melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 51, 532-8 (2002).
- Langerhans, P.** Ueber die Nerven der Menschlichen Haut. *Virchows Arch* 44, 325-3 (1868).
- Langrish, C.L., Chen, Y. et al.** IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201, 233-40 (2005).
- Lee, J.R., Dalton, R.R. et al.** Pattern of recruitment of immunoregulatory antigen-presenting cells in malignant melanoma. *Lab Invest* 83, 1457-66 (2003).
- Lenahan, C. & Avigan, D.** Dendritic cell defects in patients with cancer: mechanisms and significance. *Breast Cancer Res* 8, 101 (2006).

- Leonard, J.P., Sherman, M.L. et al.** Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood* 90, 2541-8 (1997).
- Liu, Y.J.** IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23, 275-306 (2005).
- Liu, C., Lou, Y. et al.** Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *J Clin Invest* 118, 1165-75 (2008).
- Liu, Y.J., Soumelis, V. et al.** TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu Rev Immunol* 25, 193-219 (2007).
- Lombardi, V., Van Overtvelt, L. et al.** Human dendritic cells stimulated via TLR7 and/or TLR8 induce the sequential production of Il-10, IFN $\gamma$ , and IL-17A by naive CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 182, 3372-9 (2009).
- Lonial, S., Torre, C. et al.** Regulation of alloimmune responses by dendritic cell subsets. *Exp Hematol* 36, 1309-17 (2008).
- Majstoravich, S., Zhang, J. et al.** Lymphocyte microvilli are dynamic, actin-dependent structures that do not require Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) for their morphology. *Blood* 104, 1396-1403 (2004).
- Manches, O., Lui, G. et al.** In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 101, 949-54 (2003).
- Manegold, C., Gravenor, D. et al.** Randomized phase II trial of a tolllike receptor 9 agonist oligodeoxynucleotide, PF-3512676, in 229 combination with first-line taxane plus platinum chemotherapy for advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 26, 3979-86 (2008).
- Mangan, P.R., Harrington, L.E. et al.** Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441, 231-4 (2006).
- Masten, B.J., Olson, G.K. et al.** Characterization of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in human lung. *J Immunol* 177, 7784-93 (2006).
- McLaughlin, P., Grillo-Lopez, A.J. et al.** Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 16, 2825-33 (1998).
- McWilliam, A.S., Nelson, D.J. et al.** The biology of airway dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 73, 405-13 (1995).
- Mellor, A.L. & Munn, D.H.**IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4, 762-74 (2004).

- Merad, M. & Manz, M.G.** Dendritic cell homeostasis. *Blood* 113, 3418-27 (2009).
- Molenkamp, B.G., van Leeuwen, P.A. et al.** Intradermal CpG-B activates both plasmacytoid and myeloid dendritic cells in the sentinel lymph node of melanoma patients. *Clin Cancer Res* 13, 2961-9 (2007).
- Montoya, M.C., Sancho, D. et al.** Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunol Rev* 186, 68-82 (2002).
- Morgan, D.A., Ruscetti, F.W. et al.** Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193, 1007-8 (1976).
- Morton, D., Eilber, F.R. et al.** Immunological factors which influence response to immunotherapy in malignant melanoma. *Surgery* 68, 158-63; discussion 163-4 (1970).
- Moseman, E.A., Liang, X. et al.** Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 173, 4433-42 (2004).
- Mosmann, T.R. & Coffman, R.L.** TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-73 (1989).
- Mullen, G.E., Ellis R.D. et al.** Phase 1 trial of AMA1-C1/Alhydrogel plus CPG 7909: an asexual blood-stage vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS One* 3, e2940 (2008).
- Munn, D.H., Sharma, M.D. et al.** Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest* 114, 280-90 (2004).
- Murphy, K.M. & Reiner, S.L.** The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2, 933-44 (2002).
- Novak, N., Yu, C.F. et al.** Toll-like receptor 7 agonists and skin. *Drug News Perspect* 21, 158-65 (2008).
- O'Doherty, U., Peng, M. et al.** Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 82, 487-93 (1994).
- Pagès, F., Kirilovsky, A. et al.** In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27, 5944-51 (2009).
- Parkinson, D.R., Abrams, J.S. et al.** Interleukin-2 therapy in patients with metastatic malignant melanoma: a phase II study. *J Clin Oncol* 8, 1650-6 (1990).

- Pashenkov, M., Goess, G. et al.** Phase II trial of a toll-like receptor 9-activating oligonucleotide in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 24, 5716-24 (2006).
- Pinzon-Charry, A., Ho, C.S. et al.** Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer. *Br J Cancer* 97, 1251-9 (2007).
- Poltorak, A., He, X. et al.** Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-8 (1998).
- Robbins, P.F., Morgan, R.A. et al.** Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol* 29, 917-924 (2010).
- Robertson, M.J., Cameron, C. et al.** Immunological effects of interleukin 12 administered by bolus intravenous injection to patients with cancer. *Clin Cancer Res* 5, 9-16 (1999).
- Robinson, W.A., Mughal, T.I. et al.** Treatment of metastatic malignant melanoma with recombinant interferon alpha 2. *Immunobiology* 172, 275-82 (1986).
- Rock, K.L., Gamble, S. et al.** Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science* 249, 918-21 (1990).
- Rodriguez, A., Regnault, A. et al.** Selective transport of internalized antigens to the cytosol for HMC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* 1, 362-8 (1999).
- Rosenberg, S.A., Lotze, M.T. et al.** Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann Surg* 210, 474-84; discussion 484-5 (1989).
- Sakaguchi, S.** Regulatory T cells: key controllers of immunologic selftolerance. *Cell* 101, 455-8 (2000).
- Salio, M., Cella, M. et al.** Plasmacytoid dendritic cells prime IFNgamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. *Eur J Immunol* 33, 1052-62 (2003).
- Schon, M.P. & Schon, M.** TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene* 27, 190-9 (2008).
- Schreibelt G., Tel, J. et al.** Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 59, 1573-1582 (2010).
- Schulze, H.J., Cribier, B. et al.** Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from a randomized vehiclecontrolled phase III study in Europe. *Br J Dermatol* 152, 939-47 (2005).

- Schwartz, O.** Cell of the month. Dendritic cell sensing a lymphocyte. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 175 (2004).
- Sharma, M.D., Baban, B. et al.** Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117, 2570-82 (2007).
- Shigematsu, H., Reizis, B. et al.** Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin. *Immunity* 21, 43-53 (2004).
- Siegal, F.P., Kadowaki, N. et al.** The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835-7 (1999).
- Sigal, L.J., Crotty, S. et al.** Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* 398, 77-80 (1999).
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B. et al.** Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344, 783-92 (2001).
- Sorg, R.V., Kogler, G. et al.** Identification of cord blood dendritic cells as an immature CD11c<sup>+</sup> population. *Blood* 93, 2302-7 (1999).
- Speiser, D.E., Liénard, D. et al.** Rapid and strong human CD8<sup>+</sup> T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest* 115, 739-46 (2005).
- Stary, G., Bangert, C. et al.** Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 204, 1441-51 (2007).
- Steiniger, B., Klempnauer, J. et al.** Phenotype and histological distribution of interstitial dendritic cells in the rat pancreas, liver, heart, and kidney. *Transplantation* 38, 169-74 (1984).
- Steinman, R.M.** The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9, 271-96 (1991).
- Steinman, R.M. & Cohn, Z.A.** Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med* 137, 1142-62 (1973).
- Takeda, K. & Akira, S.** TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 16, 3-9 (2004).
- Thomson, A.W.** Tolerogenic dendritic cells: all present and correct? *Am J Transplant* 10, 214-219 (2010).
- Thomson, A.W., Drakes, M.L. et al.** Hepatic dendritic cells: immunobiology and role in liver transplantation. *J Leukoc Biol* 66, 322-30 (1999).

- Treilleux, I., Blay, J.Y. et al.** Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 10, 7466-74 (2004).
- Trinchieri, G.** Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 133-46 (2003).
- Van der Bruggen, P., Traversi, C. et al.** A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-7 (1991).
- Vermi, W., Bonecchi, R. et al.** Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J Pathol* 200, 255-68 (2003).
- Vremec, D., Pooley, J. et al.** CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 164, 2978-86 (2000).
- Wenzel, J., Bekisch, B. et al.** Type I interferon-associated recruitment of cytotoxic lymphocytes: a common mechanism in regressive melanocytic lesions. *Am J Clin Pathol* 124, 37-48 (2005).
- Wilson, N.J., Boniface, K. et al.** Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8, 950-7 (2007).
- Wolf, I.H., Kodama, K. et al.** Nature of inflammatory infiltrate in superficial cutaneous malignancies during topical imiquimod treatment. *Am J Dermatopathol* 29, 237-41 (2007).
- Workman, C.J., Szymczak-Workman, A.L. et al.** The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci* 66, 2603-2 (2009).
- Xing, J., Wu, Y. et al.** Th9: a new player in asthma pathogenesis? *J Asthma* 48, 115-25 (2011).
- Yee, C., Thompson, J.A. et al.** Adoptive T cell therapy using antigen specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: *in vivo* persistence, migration and anti-tumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 16168-73 (2002).
- Zhang, N., Pan, H.F. et al.** Th22 in inflammatory and autoimmune disease: prospects for therapeutic intervention. *Mol Cell Biochem*, in press (2011).
- Zou, W.** Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 5, 263-74 (2005).
- Zou, W., Machelon, V. et al.** Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 7, 1339-46 (2001).

## Serment des Apothicaires

Faculté de Pharmacie de Grenoble



# Serment des Apothicaires



Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

# Potentiel des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans l'immunité anti-tumorale : nature de la réponse T induite par des pDC activées par différents ligands TLR

*Étude de candidats adjuvants au vaccin immunothérapeutique*

**THÈSE** présentée et soutenue par : **Bruno REVOL**

Devant le jury composé de :

**Président :**

**Dr Benoit ALLENET** (UJF-CNRS UMR 5525, Grenoble)

**Membres :**

**Dr Laurence CHAPEROT** (UJF-INSERM U823, EFS, Grenoble)

**Pr Emmanuel DROUET** (UJF-EMBL-CNRS UMR 5233, Grenoble)

**Dr Benoit BUSSER** (UJF-INSERM U823, IAB, Grenoble)

---

## Résumé

Les **cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)** offrent de nouvelles perspectives dans le domaine de l'**immunothérapie anti-tumorale**. À ce titre, les cancers du **sein**, de l'**ovaire** ou de la **peau** constituent les modèles privilégiés de recherche.

Les pDC sont des **cellules présentatrices d'antigène (CPA)** dites « **professionnelles** ». Elles expriment de façon prédominante les **Toll-like récepteurs (TLR) -7** et **-9**. Après activation, les pDC **apprêtent** des peptides antigéniques et les **présentent** en association aux molécules **HLA de classe II** du **Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH)** afin d'activer les **lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (LT CD4<sup>+</sup>)**. Les pDC sont capables de sécréter de grandes quantités d'**interféron- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )**, de délivrer un **signal de co-stimulation** et autorisent l'**activation** et la **polarisation** optimales des LT CD4<sup>+</sup>. Les pDC permettent ainsi le **lien entre immunité innée et adaptative**.

Plusieurs essais cliniques ont montré que l'utilisation de **ligands de TLR7** et **-9** en tant qu'**adjuvants vaccinaux** constitue une stratégie efficace dans la prise en charge du cancer. L'efficacité d'un **vaccin immunothérapeutique anti-tumoral** nécessite d'induire une **polarisation T helper 1 (TH1)** des **LT CD4<sup>+</sup>** afin de générer des **lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques** de la tumeur, effecteurs de l'immunité anti-tumorale.

Afin de sélectionner un **candidat adjuvant** au vaccin immunothérapeutique anti-tumoral, nous avons cherché à déterminer la **nature de la réponse T induite par des pDC activées par différents ligands TLR**. Nos résultats obtenus pour le **ligand TLR9, CpG A**, sont conformes aux exigences retenues : les pDC activées par ce ligand produisent de l'**IFN- $\alpha$**  et induisent la **polarisation TH1** des **LT CD4<sup>+</sup> naïfs**, donc la production d'**interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )** et d'**interleukine-10 (IL-10)** par ces derniers.

---

**Mots clés :** immunité anti-tumorale ; immunothérapie active ; cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) ; toll-like récepteurs (TLR) ; polarisation T.