



UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
UFR de Médecine

Ecole Doctorale Sciences Technologie Santé

Année 2008
Bibliothèque

N°

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Spécialité : Oncologie, Immunologie et Thérapeutiques Innovantes

Soutenue publiquement le 03 décembre 2008

par

Jean-Christophe EYMARD

**Innovation thérapeutique dans le cancer du sein et de la prostate :
de la tentative d'optimisation d'une stratégie thérapeutique conventionnelle
à l'exploration d'un nouveau concept d'immunothérapie cellulaire.**

*Laboratoire de Thérapie Cellulaire, Institut Jean Godinot
1 rue du Général Koenig, REIMS*

Membres du Jury :

Pr. Marc Zerbib : Président
Pr. Jacky Bernard : Directeur de Thèse
Pr. Stéphane Oudard : Rapporteur
Pr. Thierry Petit : Rapporteur
Pr. Pierre Jeannesson : Examineur

REMERCIEMENTS

Je tiens tout particulièrement à remercier les membres du jury :

Le Professeur Marc Zerbib qui me fait le grand honneur et le plaisir d'avoir accepté la présidence de cette thèse. Ses compétences et ses nombreux travaux s'associent à un grand sens de la communication. Qu'il soit assuré de toute ma reconnaissance pour sa présence.

Le Professeur Stéphane Oudard qui m'a fait l'amitié de bien vouloir être rapporteur de ce mémoire. Ses multiples études reconnues dans le domaine du cancer de la prostate forcent mon admiration.

Le Professeur Thierry Petit dont j'apprécie vivement la compétence en particulier dans le cancer du sein. Notre amitié de longue date nous rapproche, il a bien voulu juger ce travail et je l'en remercie chaleureusement.

Le Professeur Jacky Bernard, chercheur passionné, qui a accepté de diriger ce travail et sans lequel cette tâche n'aurait pu être menée à son terme. Je le remercie sincèrement pour sa disponibilité, son esprit vif, critique et constructif. D'autres projets nous attendent...

Le Professeur Pierre Jeannesson, témoignant un engagement permanent dans la recherche et dont la collaboration chaleureuse est toujours appréciée.

Mais je tiens également à remercier :

Le Professeur Hervé Curé, qui a permis et soutenu ce projet. Son énergie et son intérêt sans faille porté à la recherche au service des patients sont des moteurs pour l'Institut Jean Godinot.

Le Docteur Alban Gervais, mon co-équipier, pour son travail et son aide technique toujours sympathique.

Les laboratoires Pfizer et GlaxoSmithKline pour leur soutien.

Tous ceux qui m'ont accompagné professionnellement, mes amis et mes confrères de l'Institut, et également Véronique, Catia et Marie-Hélène,... les équipes des services...

Gwen pour ses lectures et sa disponibilité toujours souriante.

Enfin, Catherine et nos trois enfants, ma famille au grand complet, leur présence m'est indispensable et je n'ai pas de mots assez forts pour leur dire mon affection et mon merci d'avoir supporté mon manque de disponibilité.

RESUME

La chimiothérapie des cancers au stade métastatique reste largement non curative malgré l'amélioration de la survie globale des patients. Ce constat justifie la recherche de progrès thérapeutiques par l'optimisation de traitements standard et l'exploration de nouvelles stratégies. Dans cet esprit, ce travail regroupe les résultats de quatre études menées sur le plan de la pathologie auprès de patients porteurs d'un cancer de la prostate ou du sein.

L'étude de phase II conduite chez des patients avec un cancer prostatique hormono-résistant a évalué l'addition d'estramustine sur l'efficacité de la chimiothérapie standard par docetaxel. Une réponse biologique nettement augmentée a été objectivée avec l'association, sans bénéfice apparent sur la survie globale.

Par ailleurs, les travaux entrepris pour améliorer les performances vaccinales des cellules dendritiques à visée thérapeutique ont établi clairement des conditions de culture et de maturation qui favorisent leurs propriétés invasives, facilitant de la sorte leur migration chez le patient après injection. Ces cellules ont été utilisées pour explorer *ex vivo* une stratégie innovante visant à potentialiser la fonction adjuvante des cellules dendritiques et à amplifier ainsi la réponse immune anti-tumorale qu'elles induisent. Le principe consiste à activer la réponse lymphocytaire d'un patient par des cellules dendritiques allogéniques provenant d'un donneur sain. Les résultats démontrent pour la première fois la supériorité du contexte allogénique qui se traduit par une forte amplification des réponses anti-tumorales. Ces données nouvelles ouvrent de multiples perspectives sur le plan fondamental comme au niveau clinique.

Mots-clés : cancer du sein ; cancer de la prostate ; chimiothérapie ; immunothérapie ; thérapie cellulaire ; cellules dendritiques ; alloréactivité ; réponse T spécifique ; immunité anti-tumorale.

TABLE DES MATIERES

	Page
Abréviations	7
Avant-propos	8
I. Introduction	10
1. Problématique	11
2. Cancers du sein et de la prostate : convergences	12
3. Chimiothérapie et cancer de la prostate : limites actuelles	15
4. Immunité anti-tumorale.....	18
4.1. Théorie de l'immunosurveillance des cancers	
4.2. Concept d' <i>immunoediting</i>	
4.3. Bases de la réponse immune anti-tumorale	
4.3.1. Organisation des défenses immunes	
4.3.2. Rôle clé des cellules dendritiques	
4.3.3. Effecteurs lymphocytaires	
5. Thérapies cellulaires du cancer	24
5.1. Immunothérapie cellulaire passive	
5.1.1. Stratégies basées sur les lymphocytes	
5.1.2. Stratégies basées sur les macrophages	
5.2. Immunothérapie cellulaire active	
5.2.1. Stratégies basées sur les cellules tumorales	
5.2.2. Stratégies basées sur les cellules dendritiques	
6. Thérapie cellulaire dendritique et cancer de la prostate : bilan actuel...	30
7. Alloréactivité.....	32
8. Présentation du travail.....	34
II. Résultats.....	36

1. Tentative d'optimisation d'une thérapie standard dans le cancer de la prostate hormono-résistant	37
1.1. Randomized phase II study of docetaxel plus estramustine and single-agent docetaxel in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. J.C. Eymard, F. Priou, A. Zannetti, A. Ravaud, D. Lepillé, P. Kerbrat, P. Gomez, B. Paule, D. Genet, P. Hérail, E. Ecstein-Fraïssé, F. Joly. Ann Oncol 2007;18:1064-70.	
1.2. Résumé	
2. Production et analyse de cellules dendritiques dotées de propriétés migratoires propices à leur efficacité clinique	46
2.1. Active matrix metalloprotease-9 in and migration pattern of dendritic cells matured in clinical grade culture conditions. P. Hollender, D. Ittelett, F. Villard, J.C. Eymard, P. Jeannesson, J. Bernard. Immunobiology 2002;206:441-58.	
2.2. Résumé	
3. Amplification de l'immunité anti-tumorale par des cellules dendritiques matures allogéniques	66
3.1. Selected Allogeneic Dendritic Cells Markedly Enhance Tumor Antigen-Specific T Cell Response. J.C. Eymard*, A. Gervais*, E. Toulmonde, J. Bernard. *equal co-first authors Cancer Immunol Immunother, accepté	
3.2. Résumé	

4. Individualisation <i>ex vivo</i> des meilleurs candidats cellulaires dendritiques issus de donneurs sains pour une réponse antitumorale performante chez un patient porteur d'un cancer	96
4.1. Ex Vivo Identification of Highly Potent Dendritic Cells from Normal Donors Capable of Improving Antitumor T-Cell Responses from HLA-A2 matched Cancer Patients. J.C. Eymard, A. Gervais, E. Toulmonde, J. Bernard. J of Immunother, finalisation pour soumission	
4.2. Résumé	
III. Discussion et perspectives.....	112
1. Tentative d'optimisation de l'efficacité d'une mono- chimiothérapie de référence par combinaison à un autre agent (article 1)	113
2. Production et analyse de cellules dendritiques dotées de propriétés migratoires propices à leur efficacité clinique (article 2)	116
3. Amplification de l'immunité anti-tumorale de donneurs sains par des DC allogéniques (article 3).....	118
4. Amplification des réponses anti-tumorales de patients par des DC issues de donneurs sains (article 4)	121
IV. Conclusions	124
Références Bibliographiques.....	126
Résumé	136

ABRÉVIATIONS

Ag : antigène

AMM : autorisation de mise sur le marché

CMH I ou CMH II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de Classe I ou II

CTL : lymphocyte T cytotoxique

DC : cellule dendritique

FDA : Food and Drug Administration

GM-CSF : Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor

GMP : Good Manufacturing Practice (Bonnes Pratiques de Fabrication)

HLA : Human Leukocyte Antigen

iDC : cellule dendritique immature

IFN- γ : interféron gamma

IL-n : interleukine-n

IV : intra-veineuse

LAK : Lymphokine Activated Killer Cells

MAC : macrophage activés à visée cytotoxique

mDC : cellule dendritique mature

MMP : métalloprotéinase ou métalloprotéase matricielle

M/P : (chimiothérapie) mitoxantrone/prednisone

NCI : National Cancer Institute

NK : cellule Natural Killer

NKT : cellule Natural Killer T

PAP : phosphatase acide prostatique

PGE2 : prostaglandine E2

PSA : antigène spécifique prostatique

PSMA : antigène spécifique membranaire prostatique

TCR : récepteur spécifique des cellules T

T $\gamma\delta$: lymphocyte exprimant le récepteur $\gamma\delta$

Th1 ou Th2 : lymphocytes T helper de type 1 ou 2

TIL : Tumor Infiltrating Lymphocytes

TIMP : inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases

TNF : tumor necrosis factor

AVANT-PROPOS

AVANT-PROPOS

La fonction de reconnaissance du soi et du non-soi par le système immunitaire permet à l'organisme de repérer les cellules malignes et de mettre en œuvre des réactions de rejet dirigées spécifiquement contre les tumeurs. L'oncologie prouve de fait que cette réponse n'est pas toujours efficace. Sur le plan thérapeutique, si la chirurgie est la méthode idéale d'éradication des cancers localisés, la radiothérapie et la chimiothérapie cytotoxique représentent des armes complémentaires entachées d'un mécanisme d'action peu spécifique responsable d'effets secondaires collatéraux sur des tissus normaux. Ces traitements conventionnels sont complétés actuellement par des thérapies dites ciblées, dirigées contre des cibles moléculaires supposées jouer un rôle clé dans la transformation néoplasique ou la progression tumorale. Cette dernière approche n'est pas récente puisque les traitements hormonaux, dans le cancer du sein ou de la prostate, correspondent à des thérapeutiques ciblées, notamment les anti-œstrogènes ou les anti-androgènes. L'immunothérapie présente l'avantage théorique de cibler des molécules impliquées directement dans le processus néoplasique (exemple des anticorps monoclonaux anti-Her2 ou anti-VEGF dans le cancer du sein) mais aussi toute anomalie associée.

Ce mémoire regroupe un ensemble de travaux réalisés à la jonction recherche clinique-recherche fondamentale, dont l'objectif vise au progrès thérapeutique soit par l'optimisation d'un traitement standard, soit par l'exploration d'une nouvelle stratégie d'immunothérapie. Parallèlement à l'élaboration d'un essai clinique qui visait à optimiser une thérapeutique actuelle de référence représentée par une monochimiothérapie, nous avons développé une étude physiologique avec consentement éclairé pour constituer des collections de cellules immunocompétentes issues de donneurs sains de l'EFS Nord de France et de patients suivis à l'Institut Jean Godinot (des femmes traitées pour un cancer du sein et des hommes porteurs d'un cancer de la prostate hormono-résistant). Au sein de l'équipe du Laboratoire de Thérapie Cellulaire nous avons pu ainsi explorer *ex vivo* une nouvelle piste d'immunothérapie fondée sur l'instrumentalisation de l'alloréactivité au bénéfice de la réponse immune anti-tumorale.

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

1. Problématique

La chimiothérapie des cancers au stade métastatique reste non curative à quelques exceptions près, mais permet pour de nombreux cancers d'améliorer le confort de survie et la survie globale des malades. L'efficacité de la chimiothérapie est ainsi reconnue depuis plus de 20 ans pour le cancer du sein alors que son bénéfice est de démonstration plus récente pour les cancers de la prostate hormono-résistants. De nouveaux cytotoxiques sont apparus mais, même si les taux de réponse s'améliorent, la survie globale de ces hommes et femmes porteurs d'une maladie métastatique hormono-résistante n'a que modérément augmenté. Ce constat justifie les efforts de recherche qui reposent sur l'optimisation des traitements standard, mais aussi sur l'exploration de nouvelles stratégies thérapeutiques, avec une attention légitime pour l'immunothérapie compte tenu de l'évolution actuelle du concept d'immunosurveillance des tumeurs.

La chimiothérapie cytotoxique repose sur l'administration d'agents qui détruisent les cellules tumorales de façon non spécifique en agissant essentiellement sur des macromolécules cellulaires (ADN, protéines), au niveau de leur production ou de leur fonction. Les agents cytotoxiques anticancéreux possèdent donc l'index thérapeutique le plus faible de toutes les classes de médicaments prescrites en médecine. Aussi quand un agent démontre son efficacité dans une nouvelle indication, l'amélioration des résultats passe nécessairement par l'addition d'un agent d'une autre classe, dont les mécanismes d'action sont différents et les toxicités non cumulatives, pour tenter de mieux atteindre la population cellulaire tumorale cible caractérisée par son hétérogénéité.

La démarche actuelle de l'immunothérapie consiste à rompre l'état de tolérance vis-à-vis de la tumeur et à réactiver les défenses de l'hôte pour induire une réponse immune de rejet spécifique. Les cellules dendritiques (DC), adjuvants naturels de l'immunité, jouent un rôle clé dans l'induction des réponses immunitaires et constituent à ce titre l'outil *a priori* idéal d'une stratégie vaccinale potentielle. Cependant le bilan des essais cliniques à base de DC reste limité. Bien qu'une réponse immunologique soit souvent détectée chez les patients traités, démontrant ainsi le bien fondé du concept, la réponse immune générée est trop faible pour induire une efficacité clinique en terme de régression tumorale. Deux paramètres semblent restreindre l'efficacité de ces cellules vaccinales chez le patient : la faible migration des DC du site d'injection vers les organes lymphoïdes secondaires, et l'insuffisance de leur potentiel d'activation compte tenu de la faible immunogénicité des

antigènes (Ag) exprimés par les cellules malignes et des mécanismes d'échappement mis en place par la tumeur. Par voie de conséquence, l'exploration des propriétés migratoires et immunostimulatrices des DC apparaît comme stratégique pour accroître l'efficacité clinique des DC produites pour un usage thérapeutique.

2. Cancers du sein et de la prostate : convergences

Les cancers du sein et de la prostate font partie des cancers hormonodépendants et constituent un problème majeur de santé publique. En effet, ils représentent les cancers les plus fréquents en France chez la femme et chez l'homme avec environ 42 000 nouveaux cas de chaque par an [Belot *et al.*, 2008]. De plus, leur prévalence en France et dans les pays "développés" continue à augmenter, cette augmentation n'étant que partiellement expliquée par l'augmentation de la longévité et du dépistage. Le nombre de cancers du sein et de la prostate a doublé en France dans les vingt dernières années. Cependant, une diminution du nombre de cancers du sein est constatée depuis 2004 [Allemant *et al.*, 2008] : le taux d'incidence a ainsi baissé de 4,3 % en 2004 et 2005, puis de 3,3 % entre 2005 et 2006. Du fait des progrès de la thérapeutique et du dépistage, le taux de mortalité pour le cancer du sein a baissé d'environ 40 %. Mais le nombre total de décès ne diminue que très peu du fait de l'augmentation du nombre de cas. Le cancer du sein reste, en France, la première cause de mortalité par cancer chez la femme. Le cancer de la prostate représente la deuxième cause de décès par cancer chez l'homme (après le cancer broncho-pulmonaire).

Le rôle favorisant des hormones stéroïdes sexuelles dans le développement des cancers du sein est établi depuis plus de cent ans par l'efficacité des castrations et l'étude des modèles animaux [Lacassagne, 1936]. Il a ensuite été confirmé *in vitro* sur des lignées cellulaires humaines et *in vivo* par l'efficacité thérapeutique et préventive des anti-oestrogènes et des anti-aromatases sur les cancers du sein ainsi que par l'effet favorisant des hormones ovariennes sur l'incidence des cancers du sein chez les femmes ménopausées recevant une substitution hormonale [Rapport AFSSAPS, 2006].

Parallèlement, l'influence des androgènes dans la biologie de la prostate et les effets bénéfiques de la déplétion androgénique ou des oestrogènes ont été largement établis dans le traitement des cancers de la prostate [Huggins et Hodges, 1941] bien que l'impact

néfaste des androgènes sur la cancérogénèse prostatique et dans les cancers de la prostate soit parfois controversé [Bosland, 2000]. Les actions des hormones sexuelles sur le cancer du sein et le cancer de la prostate présentent donc des points communs concernant d'une part, les mécanismes généraux de la cancérogénèse hormonale qui passent par l'effet mitogène de ces hormones, principal responsable de leur action comme agents promoteurs de tumeur et d'autre part, la régulation de la transcription par les hormones *via* leurs récepteurs.

Sur le plan clinique, l'hormonothérapie adjuvante a une place reconnue dans ces deux pathologies en fonction de facteurs pronostiques définis. La méta-analyse du "Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group" (EBCTCG) a étudié des données portant sur 37 000 patientes incluses dans 55 études randomisées [EBCTCG, 1998]. Les résultats ont clairement montré un bénéfice significatif d'un traitement adjuvant par tamoxifène (anti-oestrogène), tant en termes de survie sans récurrence que de survie globale chez des patientes porteuses de cancer du sein avec récepteurs hormonaux positifs et ce, quel que soit leur âge ou leur statut ménopausique. Ainsi, jusqu'à fin 2003, le traitement de référence a été le tamoxifène pour 5 ans puis les anti-aromatases ont été disponibles, l'anastrozole ayant été le premier commercialisé. La prescription d'une anti-aromatase pendant 5 ans ou après 5 ans de tamoxifène améliore la survie sans événement par rapport à 5 ans de tamoxifène seul [Goss *et al.*, 2005].

De même, dans les cancers localisés de la prostate à haut risque, le traitement local est complété par une hormonothérapie adjuvante. Après prostatectomie radicale, que ce soit par anti-androgène seul ou par agoniste de la LH-RH, l'hormonothérapie n'améliore pas la survie globale ou la survie spécifique, mais retarde l'apparition de la récurrence biologique et clinique [McLeod *et al.*, 2006 ; Wirth *et al.*, 2004]. En revanche, s'il existe un envahissement ganglionnaire, un traitement hormonal adjuvant précoce améliore la survie globale et la survie spécifique [Messing *et al.*, 1999 ; Messing *et al.*, 2006]. En cas de radiothérapie externe pour des formes localement évoluées, l'hormonothérapie améliore les résultats de la radiothérapie externe [Bolla *et al.*, 2002 ; Pilepich *et al.*, 2005]. La durée de ce traitement a longtemps été discutée, 6 mois *versus* 3 ans. L'étude du RTOG 92-02 [Hanks *et al.*, 2003] montre à 5 ans une amélioration significative, en faveur de l'hormonothérapie longue, de la survie sans récurrence et du taux de métastases, mais sans bénéfice sur la survie globale. Par contre, pour les patients avec un score de Gleason 8-10, le bénéfice de l'hormonothérapie prolongée est majeur avec une survie globale statistiquement améliorée. L'étude récente EORTC 22961 a montré une supériorité du

traitement long avec une amélioration significative à 5 ans de la survie globale et des survies sans progression, clinique et biologique [Bolla *et al.*, 2007].

Enfin, la chimiothérapie occupe une place majeure dans la prise en charge des cancers du sein depuis les années 80 avec plusieurs agents efficaces, les deux classes les plus actives étant les anthracyclines et les taxanes. Cette efficacité en phase métastatique a permis de valider son utilisation au stade adjuvant ou néo-adjuvant. *A contrario*, la chimiothérapie ne s'est développée dans le cancer de la prostate métastatique hormono-résistant que récemment avec une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en 2000 pour la mitoxantrone à titre symptomatique puis en 2004 pour le docetaxel.

Une analyse parallèle de ces deux cancers hormono-dépendants est résumée dans le tableau 1 ci-dessous :

Cancers hormono-dépendants	
● CANCER DU SEIN	● CANCER DE LA PROSTATE
1. Cancer le plus fréquent de la femme : 42 à 45 000	1. Cancer le plus fréquent chez l'homme : 40 000
2. Mortalité : 12 000/an	2. Mortalité : 10 000/an
3. RE et RP dans 65-70% des cas	3. RH aux Androgènes : 100 %
4. Augmentation de l'incidence de l'ordre de 3% par an	4. Augmentation de l'incidence de l'ordre de 2 à 4 % par an
5. Tt adjuvant efficace fonction des facteurs pronostiques	5. Tt adjuvant efficace (HT  survie) fonction des facteurs pronostiques
6. Efficacité importante du TXT qui prend une place majeure en phase métastatique mais aussi en adjuvant, néoadjuvant	6. Efficacité importante du TXT après échec de HT en phase métastatique

4^{èmes} Assises de Cancérologie des Centres de Lutte Contre le Cancer Paris, octobre 2007

Tableau 1 : points de convergence entre le cancer du sein et le cancer de la prostate

(d'après Eymard, 2007 ; communication orale aux 4^{èmes} Assises Nationales des CLCC à Paris le 25 octobre 2007)

Cette comparaison globale fait apparaître de nombreuses similitudes entre ces deux néoplasies, mais souligne un retard dans l'application des thérapeutiques pour le cancer de la prostate, retard d'environ 10 à 15 ans (figure 1). Un rappel du développement de la chimiothérapie dans le cancer de la prostate permettra d'en appréhender les raisons.

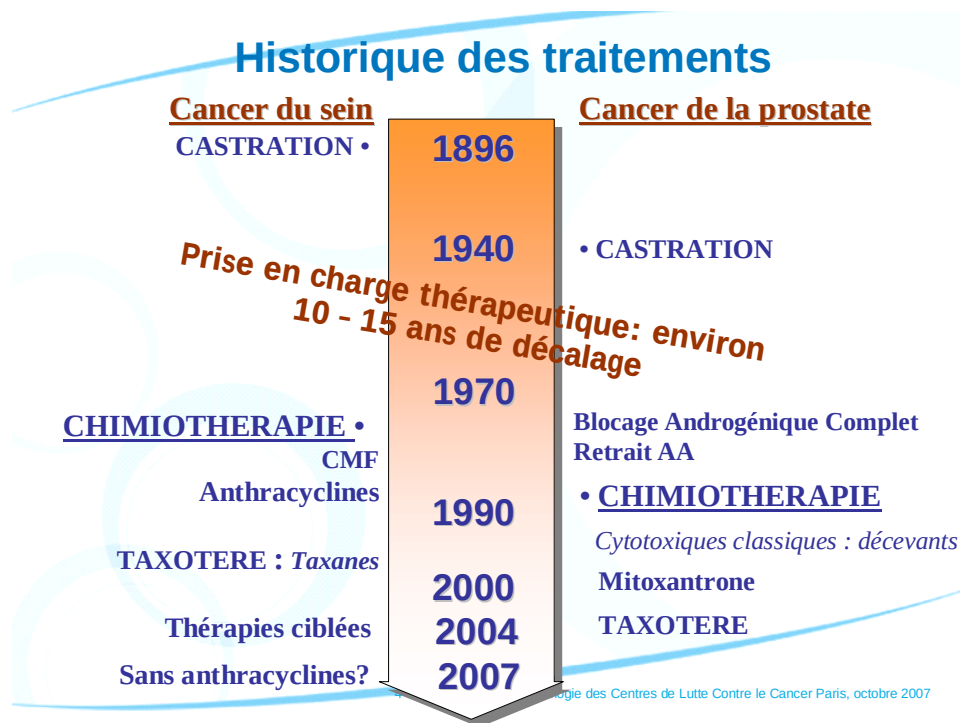


Figure 1 : évolution comparée de la prise en charge thérapeutique des cancers du sein et de la prostate (d'après Eymard, 2007 ; communication orale aux 4èmes Assises Nationales des CLCC à Paris le 25 octobre 2007)

3. Chimiothérapie cytotoxique et cancer de la prostate : limites actuelles

Le cancer de la prostate métastatique hormono-résistant constituait jusqu'en 2005 une impasse thérapeutique, de pronostic redoutable avec une médiane de survie d'environ 12 à 18 mois [Smaletz *et al.*, 2002] et une morbidité osseuse importante dont la prise en charge se réduisait souvent à des traitements purement symptomatiques. La chimiothérapie avait précédemment une place très limitée dans les cancers de la prostate évolués au stade de l'échappement hormonal et un quart de siècle a été nécessaire pour faire évoluer cette perception. L'âge avancé des patients limitant leur tolérance aux drogues cytotoxiques, le faible taux de prolifération cellulaire tumorale et l'absence habituelle de cibles mesurables ou d'identification d'autres critères consensuels d'efficacité dans cette maladie représentaient initialement les trois obstacles principaux [Logothetis et Millikan, 2008]. Ainsi, une analyse rétrospective publiée en 1993 [Yagoda et Petrylak, 1993] regroupant 26 études ayant inclus 3184 patients ne relevait qu'un taux global de réponse objective de 6,5 % avec seulement 6 drogues cytotoxiques capables d'obtenir plus de 10 % de réponses objectives. Les auteurs soulignaient alors le problème de l'évaluation tumorale difficile dans cette population où environ 10 % des patients présentent une maladie mesurable.

Au début des années 1990, deux moyens cliniques ont été développés pour mieux évaluer le bénéfice de la chimiothérapie, la réponse palliative et l'amélioration de la qualité de vie [Moore *et al.*, 1994]. Deux études de phase III comparant l'association mitoxantrone + prednisone (M/P) *versus* la prednisone seule ont permis successivement de mettre en évidence une réponse palliative avec diminution de la symptomatologie douloureuse [Tannock *et al.*, 1996] mais également une amélioration de la qualité de vie [Osoba *et al.*, 1999]. L'intérêt de ces études a été, d'une part de prouver que la chimiothérapie évaluée avec des moyens mieux adaptés apportait un bénéfice par rapport au traitement palliatif standard et, d'autre part de démontrer une toxicité tout à fait acceptable de cette thérapeutique.

A la fin des années 1990, le taux de PSA (Prostatic Specific Antigen) disponible comme marqueur de détection est devenu le critère de jugement internationalement reconnu [Bubley *et al.*, 1999]. La réponse biologique partielle est définie comme une diminution du taux de PSA d'au moins 50 % confirmée par un deuxième dosage au moins 4 semaines plus tard en l'absence de signes de progression clinique ou radiologique. Une corrélation entre la réponse du PSA et l'augmentation de la survie ayant été observée avec certains agents en situation d'hormono-résistance [Smith *et al.*, 1998], l'utilisation de ce critère a permis alors d'inclure dans les protocoles de phase II les patients présentant des localisations osseuses exclusives et de comparer les résultats thérapeutiques. Il est devenu possible de sélectionner rapidement des produits potentiellement intéressants et susceptibles d'être développés en phase III, avec comme objectif principal un bénéfice en terme de survie. Les nouvelles approches thérapeutiques ont concerné surtout les poisons du fuseau, que ce soit les taxanes ou les vinca-alcaloïdes.

L'efficacité des taxanes a permis de faire évoluer le traitement des cancers métastatiques hormono-résistants dont la référence était en l'an 2000 l'association M/P, malgré l'absence d'amélioration objectivée sur la survie. Le docetaxel agit par inhibition de la dépolymérisation des microtubules et une phosphorylation inhibitrice des effets du proto-oncogène anti-apoptotique bcl-2 [Kraus *et al.*, 2003]. Les résultats encourageants du docetaxel dans les études de phase II ont d'abord été démontrés avec le schéma 75 mg/m² toutes les 3 semaines : le taux de réponse biologique partielle était de 38-46 % avec 24-29 % de réponses objectives dans la population de patients présentant des cibles mesurables [Fiedland *et al.*, 1999 ; Picus et Schultz, 1999]. Une efficacité anti-tumorale comparable a été observée avec un schéma hebdomadaire à 36 mg/m²/semaine, 6 semaines/8 mais avec des toxicités hématologiques moins fréquentes, ce qui paraissait très intéressant dans une population de patients âgés avec souvent un faible *performance*

status et des co-morbidités. Les pratiques cliniques ont évolué suite à la présentation au meeting de l'ASCO 2004 des résultats de deux études de phase III ayant pour objectif principal une amélioration de la survie globale. La première étude internationale, la TAX 327 [Tannock *et al.*, 2004], a servi à l'enregistrement du docetaxel par la FDA. Elle comparait, chez des patients présentant un cancer de la prostate hormono-résistant en progression, un bras docetaxel 75 mg/m²/21 jours, un bras docetaxel hebdomadaire 30 mg/m²/5 semaines sur 6, au schéma de référence M/P. Un total de 1006 patients a été randomisé dans cette étude. Avec un suivi médian de 28 mois, la médiane de survie dans le groupe docetaxel tous les 21 jours était significativement augmentée (18,9 mois *versus* 16,4 mois, $p = 0,009$) alors qu'elle ne l'était pas pour le schéma hebdomadaire. Cette amélioration de la survie a été retrouvée dans tous les sous-groupes étudiés, que ce soit en fonction de l'âge (< 65 ans, entre 65 et 75 ans et > 75 ans), de l'état général (IK inférieur ou supérieur à 80 %), de l'existence ou non de douleurs. Le docetaxel améliorait de plus le contrôle des douleurs (35 % *versus* 22 %, $p = 0,01$), la réponse biologique (45 % *versus* 32 %, $p < 0,0005$) et la qualité de vie. L'actualisation des données en mars 2007 avec 310 décès supplémentaires (867 décès au total) a permis de confirmer la supériorité du docetaxel toutes les 3 semaines avec une médiane de survie de 19,2 mois *versus* 16,3 mois pour l'association M/P [Berthold *et al.*, 2008]. La deuxième étude de phase III SWOG 90-16 comparait le docetaxel 60 mg/m² tous les 21 jours associé à l'estramustine 280 mg x 3/jour de J1 à J5 au bras de référence M/P [Petrylak *et al.*, 2004]. Au total, 770 patients ont été inclus et la survie globale était significativement améliorée dans le bras docetaxel + estramustine (18 mois *versus* 16 mois, $p = 0,01$), de même que la réponse sur le PSA (50 % *versus* 27 %, $p < 0,0001$) et la survie sans progression (6 mois *versus* 3 mois, $p < 0,0001$). En d'autres termes, la survie globale était améliorée de 20 % et la survie sans progression de 27 %. Toutefois, il faut noter 15 % de complications cardiovasculaires dans le bras docetaxel + estramustine malgré l'utilisation préventive de coumadine (2 mg/jour) après un amendement en cours d'essai, mais cependant il n'y a pas eu plus de décès toxiques.

Au travers de ces deux études, le docetaxel a été la première chimiothérapie entraînant une amélioration de la survie de ces patients atteints d'un cancer de la prostate très évolué, prouvant ainsi la chimiosensibilité potentielle de cette tumeur. Une AMM européenne du docetaxel 75 mg/m² toutes les 3 semaines associé à la prednisone 5 mg x 2/j chez les patients porteurs d'un cancer de la prostate hormono-résistant a donc été rapidement accordée en février 2005 modifiant la prise en charge de ces patients.

Cependant, ces résultats encourageants avec le docetaxel restent encore insuffisants et, dans ce contexte, la recherche d'une autre approche, peu toxique, s'impose donc particulièrement, comme en atteste le développement actuel des protocoles d'immunothérapie notamment cellulaire.

4. Immunité anti-tumorale

4.1. Théorie de l'immunosurveillance des cancers

La théorie de l'immunosurveillance des cancers a été initialement émise à la fin du 19ème siècle. En 1893, William Coley a observé que l'injection d'extraits bactériens pouvait entraîner la régression de tumeurs chez des patients atteints de cancer [Coley, 1991]. Dès le début du siècle dernier, Paul Ehrlich suggéra que les cellules modifiées ou tumorales de l'organisme pouvaient être considérées comme étrangères et être ainsi éliminées par le système immunitaire. Ce n'est qu'en 1953 que la première mise en évidence de la capacité du système immunitaire à reconnaître et éliminer spécifiquement des cellules tumorales est rapportée dans un modèle murin de sarcomes induits par le méthylcholanthrène [Folay, 1953]. Les bases fondamentales de la théorie ont été établies quelques années plus tard, par Burnet et Thomas, qui ont émis alors l'hypothèse selon laquelle les lymphocytes T joueraient un rôle essentiel dans la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales [Burnet, 1967].

En l'absence de preuve expérimentale formelle, cette théorie est longtemps restée controversée, en particulier suite à la démonstration que des tumeurs murines d'origine spontanée restaient non immunogéniques [Hewitt *et al.*, 1976]. Parallèlement, l'observation en clinique que la prévalence des cancers les plus fréquents n'était pas augmentée chez des patients présentant un déficit immunitaire ou recevant un traitement immunosuppresseur venait invalider cette théorie. Seuls certains cancers (lymphomes, carcinomes spino-cellulaires, cancers du col utérin, ...) au cours desquels le rôle d'un virus est souvent suspecté, ont une prévalence accrue sous traitement immunosuppresseur. Cependant, ce n'est qu'avec le développement de nouvelles technologies telles que le ciblage de gènes et la génération de souris transgéniques que cette hypothèse a réellement pu être validée.

4.2. Concept d'*immunoediting*

Le concept d'*immunoediting* des cancers, ou concept des trois E, a été émis par Dunn *et al.* [2002, 2004] suite aux découvertes révélant que le phénotype immunogène d'une tumeur est constamment façonné par les contraintes immunologiques environnantes, même après l'émergence de variants résistants. Dans ces conditions, la progression tumorale apparaît sous contrôle de trois phases distinctes : l'élimination, l'équilibre et l'échappement (figure 2).

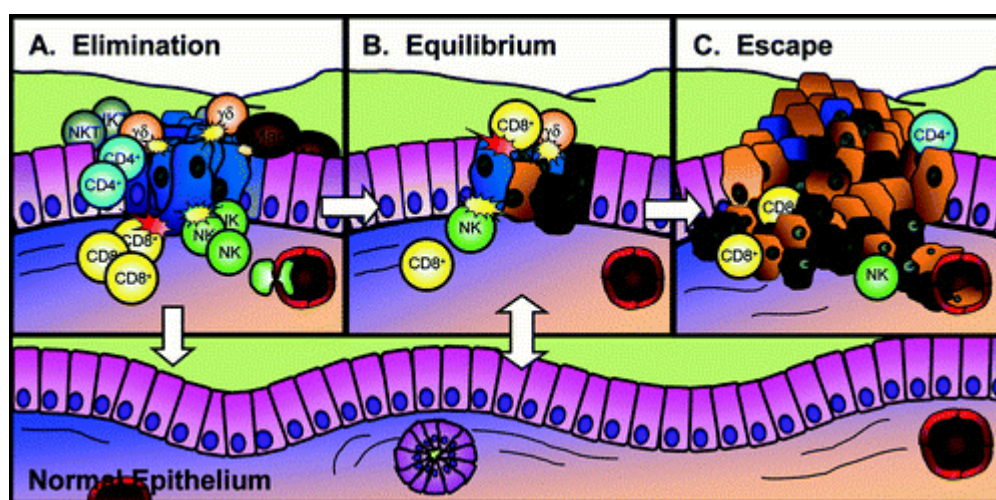


Figure 2 : les trois E du concept d'*immunoediting* : élimination, équilibre, échappement (d'après Dunn *et al.*, 2004). (A) L'immunosurveillance entraîne l'élimination des cellules transformées. (B) Au cours de la phase d'équilibre, le système immunitaire participe à la génération d'un clone résistant de cellules tumorales (noir). (C) Une prolifération incontrôlée de ce clone tumoral résistant est ensuite observée lors de la phase d'échappement à la réponse immune anti-tumorale. Comme indiqué par les flèches, le système immunitaire n'est capable d'éliminer les cellules tumorales qu'au cours des phases d'élimination et d'équilibre, permettant ainsi la restauration d'un tissu normal.

L'*immunoediting* assimile ainsi la théorie de l'immunosurveillance à une première phase de détection et d'éradication des tumeurs appelée phase d'élimination. Elle est suivie par la phase d'équilibre, ou de latence, la plus longue des trois phases, pouvant durer plusieurs années chez l'homme [Loeb *et al.*, 2003]. Les variants émergents portant de nombreuses mutations leur conférant une plus haute résistance aux attaques par le système immunitaire. A l'issue de la période d'équilibre, une tumeur peut échapper à la surveillance et à la pression exercée par le système immunitaire afin d'entrer dans la dernière phase dite d'échappement. Au cours de cette phase, des variants tumoraux résistants se développent dans un environnement immunologiquement intact. Cette faille se produit lorsque les changements génétiques et épigénétiques ont conféré à ces variants tumoraux une résistance suffisante pour échapper à la détection et à l'élimination mais

aussi lorsque la tumeur induit un état de tolérance immunologique favorable à son expansion [Zitvogel *et al.*, 2006].

Une conséquence importante du concept d'*immunoediting* est l'immunorésistance intrinsèque de la plupart des tumeurs se développant chez un individu immunocompétent après acquisition de caractéristiques leur permettant d'échapper à l'immunosurveillance.

4.3. Bases de la réponse immune anti-tumorale

4.3.1. Organisation des défenses immunes

Le développement d'une réponse immunitaire à toute agression antigénique se traduit par l'activation de 2 systèmes de défense : une réponse *innée* ou *naturelle* qui constitue la première ligne de défense et une réponse *spécifique* ou *adaptative* impliquant des réponses humorales et à médiation cellulaire (figure 3) [El Hage *et al.*, 2008].

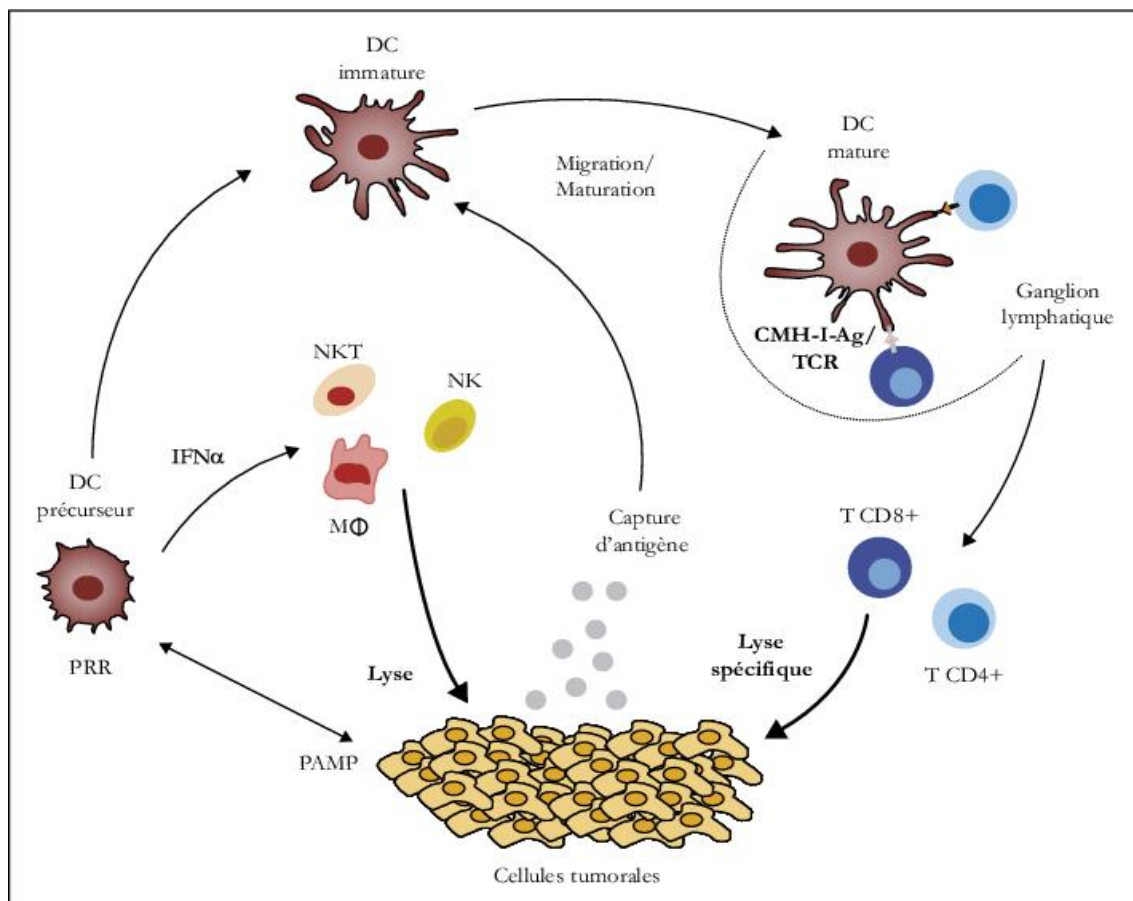


Figure 3 : Réponse immune anti-tumorale. Les cellules de l'immunité innée (macrophages (MΦ), NK, NKT) sont la première ligne de défense contre la progression des cellules cancéreuses. Les précurseurs des DC tout comme les MΦ, NK, NKT reconnaissent les cellules tumorales et sécrètent alors de l'IFNα, qui active les cellules de l'immunité innée. Suite à l'internalisation d'antigènes présents dans le milieu extracellulaire, les DC subissent un processus de maturation essentiel pour l'activation des cellules de l'immunité adaptative. L'activation des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques conduit ainsi à la lyse spécifique (TCR/CMH-I-peptide dépendant) des cellules tumorales (d'après El Hage *et al.*, 2008)

La réponse immunitaire *naturelle* n'implique pas la reconnaissance spécifique de l'antigène et ne nécessite donc pas de sensibilisation préalable. Elle est assurée par plusieurs effecteurs dont les plus importants sont les cellules NK (Natural Killer), les lymphocytes T exprimant le récepteur $\gamma\delta$, les cellules NKT et les cellules phagocytaires capables, par des mécanismes différents, de lyser des cellules tumorales. Les cytokines inflammatoires libérées dans un tissu tumoral souvent nécrotique, activent les phagocytes résidents qui induisent alors la lyse des cellules néoplasiques par stress oxydatif. Dans ce contexte, les chimiokines amplifient le recrutement des leucocytes circulants et concentrent des DC au niveau de la tumeur. Ces cellules capturent les Ag de la tumeur et les apprêtent pour les présenter à leur surface en association avec des molécules du CMH. Dans ce microenvironnement particulièrement stimulant, les DC s'activent et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires [Cumberbatch et Kimber, 1992] où elles alertent les cellules effectrices de l'immunité *adaptative* [Steinman *et al.*, 1993]. Ainsi grâce à leurs propriétés migratoires et leurs caractéristiques professionnelles de présentation, les DC se trouvent à l'interface des deux types d'immunité.

Dans le cadre de cette étroite interaction entre cellules dendritiques et lymphocytes T, véritable "synapse" immunologique, les Ag tumoraux seront reconnus par les récepteurs des lymphocytes spécifiques et les multiples co-signaux échangés induiront une puissante réaction lymphocytaire à l'origine des deux composantes de l'immunité anti-tumorale : la réponse humorale fondée sur les anticorps sécrétés par les lymphocytes B et la réponse cellulaire médiée par les lymphocytes T cytotoxiques capables de détruire les cellules tumorales.

4.3.2. Rôle clé des cellules dendritiques

Les conditions de coopération cellulaire requises pour générer une réponse cytotoxique optimale mettent en évidence le rôle clé des DC dans l'initiation et le contrôle d'un processus complexe que l'on peut aujourd'hui conceptuellement diviser en quatre étapes [Kochman et Bernard, 1999 ; Eymard et Bernard, 2003] (figure 4).

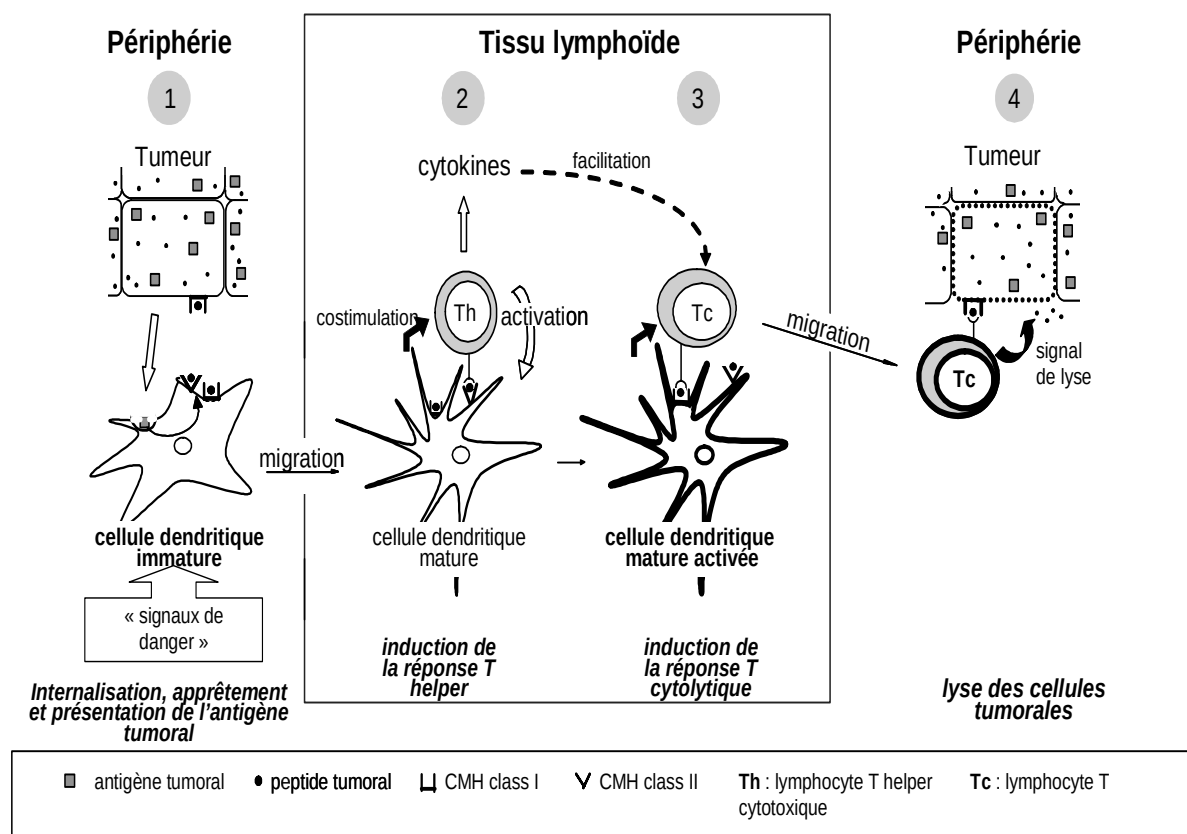


Figure 4 : Principales étapes impliquées dans l'induction d'une réponse immune de rejet tumoral optimal (d'après Eymard et Bernard, 2003)

Dans un premier temps des DC péri- ou intra-tumorales au stade immature peuvent internaliser des Ag associés à la tumeur, les apprêter et les ré-exprimer à leur surface en association avec les molécules HLA de classe I et II (figure 4, étape 1). La maturation de ces cellules sous l'influence de GM-CSF ou de divers signaux de danger [Matzinger, 1997] leur confère des propriétés migratoires nouvelles et un haut potentiel immunostimulant vis-à-vis des lymphocytes T [Banchereau et Steinman, 1998]. Ces DC matures vont alors migrer dans les organes lymphoïdes secondaires où elles développent de longs prolongements cytoplasmiques au contact des lymphocytes T naïfs uniquement présents dans ce compartiment lymphoïde. Les rares lymphocytes Th pourvus de récepteurs spécifiques pour l'antigène tumoral présenté par une molécule HLA de classe II peuvent alors établir un contact membranaire intime avec la DC, et ce dialogue intercellulaire conduira à une activation réciproque des deux cellules (figure 4, étape 2). L'activation du lymphocyte Th induit la prolifération et la génération d'un clone de cellules sécrétrices de cytokines facilitatrices de la réponse T cytotoxique [Keene et Forman, 1982]. L'activation de la DC conditionne sa capacité à activer efficacement le lymphocyte T cytotoxique (CTL) [Ridge *et al.*, 1998 ; Lanzavecchia, 1998 ; Baxevanis *et*

al., 2000]. Ainsi, au cours d'un second dialogue intercellulaire avec les CTL pourvus d'un récepteur capable de reconnaître l'Ag tumoral présenté par une molécule HLA de classe I, la DC conditionnée est alors apte à initier la prolifération et la génération d'un clone de CTL spécifiques (figure 4, étape 3). Au terme de cette réaction, les lymphocytes tueurs ainsi différenciés quittent le compartiment lymphoïde pour circuler dans l'organisme et se fixer dans la tumeur (figure 4, étape 4). La reconnaissance des antigènes exprimés par une tumeur induit alors un signal de lyse et entraîne la destruction des cellules tumorales [Zagury *et al.*, 1979].

4.3.3. Effecteurs lymphocytaires

Les effecteurs de la réponse immunitaire *innée* sont représentés par les cellules NK, les lymphocytes T $\gamma\delta$, les cellules NKT et les cellules phagocytaires. La cytotoxicité NK s'effectue par contact cellulaire direct avec la cellule cible et résulte d'interactions entre des récepteurs activateurs présents sur les cellules NK reconnaissant des ligands exprimés par les cellules cibles, et des récepteurs inhibiteurs reconnaissant des structures présentées par les cellules cibles telles que les molécules HLA de classe I. L'interaction entre les récepteurs inhibiteurs (NKRi) et les molécules HLA classe I bloque l'activation de la cytotoxicité induite par les récepteurs activateurs, CD16, lors de l'ADCC ou par un NCR ou NKG2D lors de la cytotoxicité naturelle. Ainsi, pour qu'une cellule devienne la cible d'une cellule NK, il faut qu'elle exprime des ligands pour les récepteurs activateurs parallèlement à un niveau suffisamment faible de molécule HLA de classe I.

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont des cellules T qui présentent des caractéristiques particulières liées à leur spécificité et à leur phénotype. Il s'agit de lymphocytes effecteurs cytotoxiques capables de détruire spontanément des cellules tumorales *via* une reconnaissance impliquant soit le TCR, soit des récepteurs activateurs de la lyse comme NKG2D, CD16, KIR2DS et CD94/NKG2C.

Les cellules NKT jouent un rôle clé dans la réponse *innée* et dans l'induction de la réponse *adaptative*. Ces lymphocytes expriment un TCR de type $\alpha\beta$, mais se distinguent de la majorité des lymphocytes T par l'expression d'une chaîne TCR- α invariante. La fonction anti-tumorale des lymphocytes NKT semble être liée à la production de cytokines comme l'IL-2 et l'IFN- γ mais ces lymphocytes peuvent être des effecteurs cytotoxiques tout comme les cellules NK puisqu'ils expriment également les récepteurs activateurs de la lyse NKG2D et CD244.

Les cellules phagocytaires, notamment les macrophages, sont activées au cours de l'inflammation. Bien que ces cellules ne puissent pas stimuler les lymphocytes T naïfs et

n'initient pas de réponse immunitaire primaire, elles sont capables de re-stimuler les lymphocytes mémoire et d'initier ainsi des réponses secondaires.

La réponse immunitaire *spécifique* ou *adaptative* se caractérise par l'existence de récepteurs issus de réarrangements de gènes au cours de la différenciation des lymphocytes T et B. Les lymphocytes T CD8⁺ ou CTL interviennent après interaction de leur TCR (récepteur des cellules T) avec le peptide-cible grâce à un signal de co-stimulation et à un signal cytokinique.

Les lymphocytes CD4⁺ participent également à la mise en place de l'immunité anti-tumorale mais de façon indirecte. En effet, ces lymphocytes CD4⁺ reconnaissent des épitopes antigéniques présentés sur les molécules de CMH de classe II. Cette reconnaissance nécessite donc l'intervention de cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. L'activation des lymphocytes CD4⁺ permet leur différenciation en T helper capable d'apporter des signaux de stimulation aux CD8⁺ et d'orienter la réponse T soit vers une voie cellulaire (Th1) ou humorale (Th2), soit vers le développement de T régulateurs.

5. Thérapies cellulaires du cancer

L'immunothérapie a pour but d'activer le système immunitaire d'un individu contre ses propres cellules tumorales jusqu'alors tolérées. Cette stratégie repose donc sur le fait qu'il faut activer les effecteurs de l'immunité et/ou augmenter l'immunogénicité des tumeurs.

Beaucoup de protocoles de vaccination donnent des résultats satisfaisants chez la souris, voire spectaculaires, mais restent très décevants chez l'homme. Cependant, les essais cliniques d'immunothérapie sont souvent menés chez des patients dont les défenses immunitaires sont très affaiblies soit par la maladie elle-même, soit par les traitements déjà administrés comme la chimiothérapie.

Il existe différentes stratégies d'immunothérapie qui consistent soit à injecter des effecteurs de l'immunité (immunothérapie passive), soit à injecter des activateurs de ces effecteurs (immunothérapie active).

5.1. Immunothérapie cellulaire passive

5.1.1. Stratégies basées sur les lymphocytes

L'immunothérapie *passive* ou *adoptive* peut reposer sur l'injection de lymphocytes effecteurs cytotoxiques à un individu incapable de développer une réponse anti-tumorale efficace. Développée en cancérologie au début des années 1980, sur la base de travaux de S. Rosenberg, l'immunothérapie cellulaire adoptive a principalement été appliquée à la génération et à l'expansion *ex vivo* en présence de fortes doses d'interleukine-2 (IL-2) d'effecteurs lymphocytaires issus soit du sang périphérique (Lymphokine Activated Killer cells ou LAK), soit des tumeurs (Tumor Infiltrating Lymphocytes ou TIL) des patients. Les LAK sont des lymphocytes capables d'induire une lyse de cellules tumorales mais non celle de cellules normales. Ils se distinguent des cellules NK présentes dans les préparations lymphocytaires par leur habilité à lyser des cellules tumorales résistantes aux cellules NK [Rosenstein *et al.*, 1984]. L'activité LAK n'est pas restreinte à un type cellulaire, mais correspond plutôt à une population cellulaire hétérogène d'activité cytolytique variable. La plus importante est rattachée à une population de cellules mononucléées circulantes de phénotype CD3-/CD56+ avant activation reproduisant le phénotype des cellules NK et présente en faible quantité (5%) [Phillips et Lanier, 1986]. Du fait des résultats obtenus dans les phases pré-cliniques, l'utilisation de LAK a été entreprise chez des patients porteurs de métastases d'un cancer du rein. Les protocoles thérapeutiques comprenaient l'administration d'IL-2 par voie intraveineuse (IV), des leukaphérèses pour permettre la culture *ex vivo* de LAK qui étaient ensuite administrés aux patients avec de l'IL-2 IV à fortes doses.

Malgré des résultats initiaux encourageants, les essais multicentriques ultérieurs ont mis en évidence un faible taux de réponse de 3 à 33 % dans une population sélectionnée sans bénéfice décelable en termes de rémission complète ou de gain de survie au prix d'une toxicité majeure. L'absence de bénéfice thérapeutique des LAK, associée à la lourdeur de leur préparation et à leur coût, les a fait progressivement abandonner en thérapeutique humaine.

Les TIL ou lymphocytes infiltrant les tumeurs sont supposés être des lymphocytes ayant été au contact des Ag tumoraux mais incapables dans les conditions *in vivo* d'éradiquer la tumeur de l'hôte génératrice de phénomènes immunosuppresseurs. La culture *ex vivo* des TIL devait permettre de contourner l'obstacle de l'inhibition locale en produisant des lymphocytes activés spécifiques ayant déjà été en contact avec les antigènes tumoraux. Chez l'homme, les connaissances sur les TIL ont été apportées essentiellement chez les patients porteurs de mélanome ou de cancer du rein. Les résultats

initiaux de l'équipe de Rosenberg ont laissé espérer un taux de réponses objectives élevé de 25 à 30 % dans le traitement du cancer du rein. Les études ultérieures ont certes retrouvé des rémissions complètes mais le taux de réponses pour l'ensemble de la population restait modeste, proche de celui obtenu avec l'IL-2 seule.

Parmi les hypothèses pour expliquer les limites de l'utilisation des TIL, l'évolution clonale ou oligoclonale des TIL en culture pouvant s'éloigner des TIL initiaux intra-tumoraux, a été proposée [Topalian *et al.*, 1990].

L'infrastructure de production et le coût, associés aux résultats insuffisants, ont limité les études prospectives, renvoyant à l'exploration fondamentale reposant, notamment, sur la reconnaissance des antigènes par les lymphocytes T.

5.1.2. Stratégies basées sur les macrophages

Suite aux travaux montrant la possibilité de produire des cellules immuno-compétentes à visée cytotoxique par culture *ex vivo* comme les LAK ou les TIL mais induisant une toxicité majeure du fait de l'utilisation concomitante d'IL-2 à fortes doses, des équipes se sont intéressées dans les années 90 aux macrophages susceptibles d'entraîner une destruction tumorale pour une moindre toxicité.

Quelques essais thérapeutiques de phase II utilisant des macrophages activés ont été conduits [Eymard *et al.*, 1996 ; Lesimple *et al.*, 2000]. Les macrophages étaient obtenus après culture *ex vivo* de cellules mononucléées périphériques recueillies par cytophérèse et exposées au GM-CSF puis à l'IFN- γ avant réinjection IV.

Les résultats de ces différentes études n'ont pas permis de retenir l'approche de type MAC comme perspective d'avenir.

5.2. Immunothérapie cellulaire active

L'absence de reconnaissance des Ag tumoraux par les lymphocytes T ayant été admise comme l'une des explications aux échecs des traitements par TIL, des axes de recherche se sont récemment développés pour contourner cet obstacle. Cette approche vise à injecter aux patients des agents activateurs du système immunitaire dirigés contre des cibles antigéniques exprimées par les cellules tumorales. Différentes voies peuvent être ainsi explorées : injection de matériel antigénique sous diverses formes ou injection de cellules présentatrices d'antigènes, en particulier les DC.

5.2.1. Stratégies basées sur les cellules tumorales

Les cellules cancéreuses sont utilisées comme source d'Ag dans le but d'augmenter l'immunogénicité de la tumeur. Elles peuvent être réinjectées après avoir été irradiées ou lysées en combinaison ou non avec des adjuvants [Wallack *et al.*, 1992 ; Dillman *et al.*, 2002].

Une deuxième approche consiste à utiliser des peptides anti-tumoraux comme MAGE-3 [Marchand *et al.*, 1999], MART1 [Wang *et al.*, 1999] ou encore gp100 [Slingluff *et al.*, 2001].

Une troisième approche consiste à utiliser les cellules tumorales modifiées génétiquement dans le but d'augmenter leur immunogénicité. Différentes voies ont été étudiées reposant sur l'introduction soit d'un gène codant pour des cytokines telles que GM-CSF [Ward et McNeel, 2007] ou IL-2 [Fearon *et al.*, 1990], des molécules du CMH, ou des molécules de co-stimulation [Townsend et Allison, 1993] soit d'un gène suicide [Moolten *et al.*, 1990].

5.2.2. Stratégies basées sur les cellules dendritiques

Les DC, cellules présentatrices d'antigènes les plus puissantes dont dispose le système immunitaire, jouent un rôle clé dans l'induction et le contrôle de l'ensemble des effecteurs potentiellement dirigés contre la tumeur. Elles constituent ainsi l'outil *a priori* idéal d'une stratégie vaccinale potentielle. La rareté des DC et leur dispersion dans tous les tissus de l'organisme ont longtemps constitué de sévères obstacles à leur étude. Depuis une quinzaine d'années leur différenciation *in vitro* à partir de cellules souches CD34+ [Caux *et al.*, 1992] ou de monocytes circulants en présence de GM-CSF et d'IL-4 [Romani *et al.*, 1994 ; Sallusto et Lanzavecchia, 1994] a donné accès à un matériel cellulaire propice à l'expérimentation, et le principe de leur utilisation chez le patient comme cellules vectrices d'Ag tumoraux pour induire une réponse immunitaire de rejet s'est alors rapidement imposé. L'utilisation d'un concentré cellulaire d'aphérèse comme source de cellules, la purification des monocytes et la culture en poches adaptées à l'usage clinique et limitant l'adhérence cellulaire ont permis de fournir les bases d'une production à grande échelle de DC homogènes, stables et fonctionnelles [Bernard *et al.*, 1998], et la bonne adéquation de ces procédés avec l'usage clinique est maintenant bien documentée [Guyre *et al.*, 2002 ; Peng *et al.*, 2005 ; Dohnal *et al.*, 2008].

De nombreux protocoles ont été évalués en clinique à travers le monde. Il est donc difficile d'être exhaustif mais deux revues permettent d'évaluer cette immunothérapie, la publication de Rosenberg *et al.* qui recense les essais du NCI entre 1995 et 2004, et celle

de Fidgor *et al.* réalisée à la suite du congrès d'Amsterdam qui avait réuni 240 experts en immunothérapie de plusieurs pays [Rosenberg *et al.*, 2004 ; Figdor *et al.*, 2004]. Il apparaît ainsi que les 3 localisations représentant plus de 50 % des protocoles de thérapie dendritique sont, en première position le mélanome, puis le cancer du rein et le cancer de la prostate. Ces essais cliniques reposent sur des procédés de préparations et d'injections des DC très différents. Ainsi, les lysats ou les peptides tumoraux sont les plus souvent utilisés. Au total, les résultats cliniques sont décevants en terme d'efficacité : sur les 198 patients traités par DC dans le cadre des essais du NCI, 14 (7 %) ont présenté une réponse partielle. Cependant une faible réponse immunologique est souvent détectée. Le profil de cette réponse vaccinale anti-tumorale induite reste encore largement méconnu car il exige la mise en œuvre d'une puissante stratégie analytique pour comprendre les processus immuns impliqués *in vivo* [Romero *et al.*, 1998]. Mais à l'évidence, compte tenu de la faible immunogénicité des Ag associés aux tumeurs, les propriétés vaccinales des DC doivent être optimisées pour augmenter leur potentiel d'immunostimulation et contribuer ainsi à l'efficacité clinique. A ce titre, les deux composantes vaccinales, antigénique et adjuvante, doivent être investiguées au niveau des nombreux types de DC qui peuvent être générées à partir des monocytes du fait de leur remarquable plasticité [Chapuis *et al.*, 1997].

La composante vaccinale antigénique des cellules dendritiques

Quelle que soit la formulation antigénique utilisée pour charger les DC (lysats tumoraux, protéine recombinante ou peptide de synthèse), la densité et la stabilité des complexes CMH-peptides membranaires conditionnent leur capacité à activer les lymphocytes T spécifiques. A cet égard, il est bien connu que la maturation des DC en présence de divers stimuli physiologiques ou pharmacologiques induit une haute densité et une stabilité maximale de ces complexes à la surface des cellules [Watts, 1997 ; Cella *et al.*, 1997 ; Pierre *et al.*, 1997], quoique l'absence d'étude comparative interdise toute prédiction concernant l'inducteur de maturation le plus performant. Au total, si l'utilisation de DC au stade mature s'impose dans les préparations vaccinales, les conditions de maturation induisant une présentation antigénique optimale restent encore à déterminer.

La composante vaccinale adjuvante des cellules dendritiques

On entend par "adjuvant" toute substance, cellule ou système capable de faciliter et d'amplifier la réponse immune à un antigène. Au-delà de sa fonction de présentation d'Ag à l'origine de l'immunosélection des clones spécifiques, les DC se dotent au cours de leur

différenciation d'une immunogénicité sans égal dans l'organisme et jouent ainsi le rôle unique d'adjuvant naturel de l'immunité [Moser *et al.*, 1995]. Cette fonction adjuvante des DC repose essentiellement sur trois propriétés fondamentales qui, par voie de conséquence, constituent des cibles privilégiées pour l'optimisation des préparations vaccinales.

Une première propriété adjuvante des DC est fondée sur leur capacité à induire la prolifération de lymphocytes T préalablement activés par l'antigène [Cella *et al.*, 1997]. Ce potentiel de "co-activation" est assuré au travers de multiples molécules membranaires d'adhésion et de co-activation exprimées par les DC au cours de leur maturation terminale. Si on peut aujourd'hui mesurer le niveau d'expression de ces molécules par les DC avant leur intégration dans les préparations vaccinales, on est cependant loin de maîtriser les conditions environnementales de culture induisant la mosaïque moléculaire de co-activation la plus efficace au plan vaccinal.

La seconde propriété adjuvante repose sur la capacité des DC à initier la fonction T helper par leur interaction avec les lymphocytes T CD4+ et à polariser cette fonction grâce aux cytokines qu'elles sécrètent. Il est en effet bien établi que l'induction d'une puissante réponse T cytotoxique de rejet tumoral passe par l'activation conjointe des CTL et Th [Baxevanis *et al.*, 2000]. En outre, la réaction immune de rejet requiert une polarisation de type Th1 induite par des DC sécrétrices d'IL-12 [Rouard *et al.*, 2002] ou de chimiokines [Chang *et al.*, 2000]. Au total, les DC à visée vaccinale anti-tumorale doivent donc être capables à la fois d'activer une réponse T cytotoxique en présentant des épitopes antigéniques tumoraux dans le contexte du CMH de classe I, d'initier une réponse T helper dans le contexte de la restriction du CMH de classe II et d'induire une polarisation de type Th1.

La troisième composante adjuvante des DC repose sur leur aptitude unique à transporter les Ag des tissus périphériques aux organes lymphoïdes pour les présenter aux lymphocytes T naïfs [Banchereau et Steinman, 1998].

Au total, l'amélioration de l'efficacité de ces cellules vaccinales doit passer par l'optimisation de leur potentiel d'activation d'une part, et celle de leur capacité migratoire nécessaire à la mobilité tissulaire et donc à la réalisation de leurs fonctions d'autre part.

6. Thérapie cellulaire dendritique et cancer de la prostate : bilan actuel

En l'absence de standard thérapeutique de rattrapage après docetaxel et les patients étant maintenant souvent pris en charge plus précocement à des stades moins évolués même en situation métastatique, la vaccination thérapeutique par DC représente une nouvelle voie stratégique potentielle. Ainsi de nombreux essais de vaccination par injection de DC autologues ont été menés dans cette pathologie.

Résultats des principaux essais thérapeutiques

- Chargement avec PSMA :

L'addition de protéines *ex vivo* à des DC a été effectuée dans plusieurs essais cliniques depuis la fin des années 90. Nous avons précédemment rapporté les résultats de différents essais menés par l'équipe de Murphy utilisant l'antigène spécifique membranaire prostatique (PSMA) [Eymard et Bernard, 2003]. Des résultats encourageants mais limités avaient été mis en évidence aux stades avancés de la maladie (tableau 2).

Auteur [réf.]	Phase	Nbre de Patients	Produit vaccinal	RO Critères NPCP ou PSA (%)
Murphy [1996]	I	51 en 5 groupes: 11 9 12 9 10	4-5 injections i.v. avec : PSM-P1 PSM-P2 CD non chargées CD + PSM-P1 CD + PSM-P2	4 RP (44 %) 1 RP, 1 NE (11%)
Tjoa [1998]	II	33 prétraités	6 injections i.v. avec : CD + PSM-P1 et PSM-P2	9 RP (27 %)
Murphy [1999]	II	25 non prétraités	6 injections i.v. avec : CD + PSM-P1 et PSM-P2	2 RC + 6 RP (32 %)
Tjoa [1999]	II	37 en récurrence locale	6 injections i.v. avec : CD + PSM-P1 et PSM-P2	11 RP (30 %)
Murphy [2000]	II	11 prétraités 17 non prétraités	1-4 injections i.v. avec : CD + PSM-P1, PSM-P2 et KLH	1 RC, 2 RP (27 %) 1 RC, 3 RP (24 %)

RO / RP / RC : réponse objective / partielle / complète ; NE : non évaluable

Tableau 2 : Etudes publiées de vaccination par cellules dendritiques chargées avec des peptides de PSMA dans le cancer de prostate (d'après Eymard et Bernard, 2003)

- *Chargement avec la protéine de fusion PAP/GM-CSF :*

Le produit cellulaire autologue APC8015 ou sipuleucel-T (Provenge® ; Dendreon, Seattle, WA) est composé de cellules présentatrices d'antigènes chargées *ex vivo* avec la protéine de fusion PA2024 correspondant à la phosphatase acide prostatique (PAP) couplée au GM-CSF.

Dans l'essai de phase I/II initialement rapporté [Small *et al.*, 2000], sur les 31 patients traités par 4 injections IV de sipuleucel-T, une réponse biologique a été constatée chez 10 % d'entre eux ainsi qu'un temps sans progression augmenté (34 *versus* 13 semaines ; $p = 0,03$).

L'étude 9901 de phase III multicentrique a comparé 3 injections bihebdomadaires de sipuleucel-T à un placebo selon une randomisation 2:1 avec possibilité de cross-over pour les patients ayant reçu le placebo. Cent vingt-sept patients hormono-résistants métastatiques mais asymptomatiques ont été inclus sur 19 centres [Small *et al.*, 2006]. Le temps jusqu'à progression, critère principal de jugement, n'a pas été supérieur dans le bras sipuleucel-T (11,7 vs 10 semaines ; $p = 0,52$) mais à 36 mois de suivi, la survie globale était supérieure dans le bras expérimental avec 25,9 *versus* 21,4 mois ($p = 0,01$). Le taux de survie estimé à 3 ans était de 34 % contre 11 % pour le bras placebo ($p = 0,05$) dans lequel 34 patients (75,5 %) ont bénéficié du cross-over. Un suivi immunologique a été effectué dans un sous-groupe de 49 patients et a montré que l'index de stimulation des cellules T en réponse à l'antigène PA2024 après 8 semaines de traitement était 8 fois supérieur dans le bras expérimental par rapport au placebo. La tolérance a été globalement satisfaisante avec essentiellement un syndrome pseudo-grippal de faible intensité lors des injections.

Actualités cliniques

- *Chargement avec la protéine de fusion PAP/GM-CSF :*

Sur la base des résultats encourageants observés avec le produit vaccinal sipuleucel-T ou APC8015, l'approche a été ensuite évaluée aux Etats-Unis dans le cadre d'une large étude de phase III, l'étude D9902B ou étude IMPACT (Immunotherapy for Prostate AdenoCarcinoma Treatment), qui a intégré 500 patients métastatiques hormono-résistants asymptomatiques. Le critère principal de jugement était la survie globale et le critère secondaire le temps jusqu'à progression. Les résultats sont attendus pour fin 2008 et si son efficacité est confirmée, cette thérapeutique vaccinale pourrait se positionner avant la chimiothérapie compte tenu de sa meilleure tolérance.

Parallèlement un essai de phase II, le protocole P-16, a été mené afin d'évaluer l'association de sipuleucel-T à l'anticorps monoclonal anti-VEGF bevacizumab (Avastin®) chez des patients présentant une rechute biologique isolée après traitement local. Les premiers résultats observés sur 21 patients ont été récemment rapportés [Rini *et al.*, 2006]. En terme d'efficacité, un patient a présenté une réponse biologique objective partielle ($\geq 50\%$) et trois une réponse minimale ($\geq 25\%$). Le temps du doublement du PSA pour les 20 patients évaluable était de 6,9 mois avant traitement et de 12,7 mois après traitement ($p = 0,01$). Les patients ont présenté une réponse immune caractérisée par une prolifération T spécifique augmentée vis-à-vis de PA2024. La toxicité principale a été un syndrome pseudo-grippal de grade 1-2 mais 6 toxicités de grade 3 ont été observées ayant nécessité l'arrêt du protocole pour 4 patients : insuffisance cardiaque gauche, hémorragie digestive, ischémie cérébrale, hypertension artérielle et réaction allergique. Malgré ces toxicités limitantes, des données pré-cliniques suggèrent que le blocage de VEGF pourrait stimuler la réponse immune et au regard de la modulation du PSA ainsi que des réponses T spécifiques observées dans ce protocole, les auteurs concluent à la nécessité d'approfondir cette approche. Un essai randomisé avec APC8015 +/- bevacizumab est donc à l'étude chez des patients avec un cancer hormono-résistant.

Enfin, l'essai en double aveugle, P-11, a randomisé 176 patients qui présentaient, après prostatectomie, une augmentation du PSA traitée par blocage androgénique. Les résultats préliminaires montrent un ralentissement de l'augmentation du PSA dans le bras expérimental (30 à 48 % de moins)

Sur le plan clinique, la thérapie vaccinale dendritique à base de sipuleucel-T reste donc prometteuse.

7. Alloréactivité

La violence de la réaction lymphocytaire aux antigènes du CMH présentés par des DC d'un donneur allogénique est un phénomène bien établi dénommé "allo-agression". La puissance de l'alloréaction résulte en effet de la fréquence élevée des précurseurs T capables de reconnaître les antigènes du CMH d'un autre individu. Alors que le nombre de lymphocytes T susceptibles de reconnaître un Ag tumoral est de l'ordre de 1 par million de cellules lymphocytaires, il a été estimé récemment que 7 % des lymphocytes T d'un individu sont potentiellement impliqués dans l'alloréaction [Suchin *et al.*, 2001]. Les bases moléculaires de ce phénomène sont encore incertaines [Bevan, 1984 ; Lechler *et al.*, 1990] mais impliquent clairement une activation directe des cellules T par les molécules intactes

du CMH présentes à la surface des cellules allogéniques présentatrices d'antigènes professionnelles telles que les DC [Reiser *et al.*, 2000]. Ainsi, l'alloréaction représente une réponse "extra-ordinaire" aux antigènes de transplantation qui pourrait être utilisée pour renforcer ou instrumentaliser la réponse immune anti-tumorale où les peptides tumoraux sont présentés par les antigènes HLA (figure 5) [Fabre, 2001]. Les vastes nombres de précurseurs T impliqués dans l'allo-reconnaissance directe permettent d'envisager la possibilité théorique de reconnaissance concomitante de peptides environnementaux portés par les molécules du CMH.

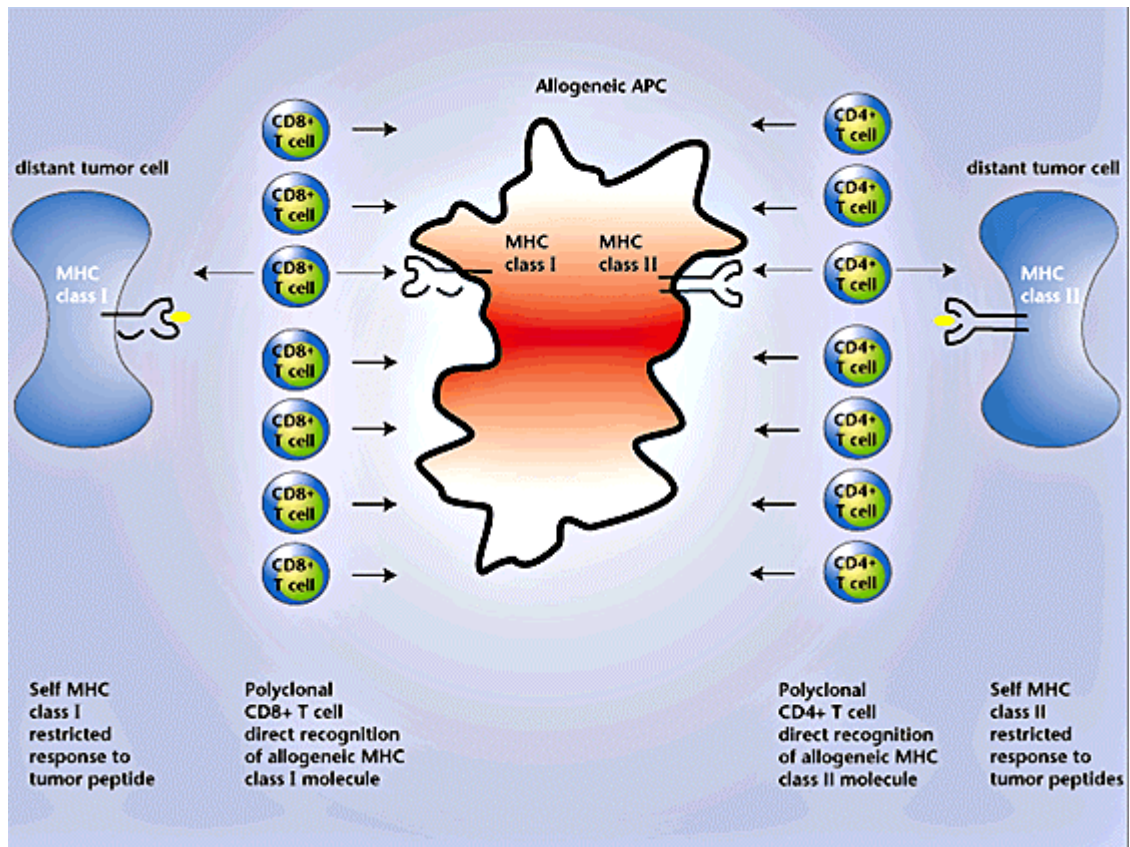


Figure 5 : Possibilités de réaction croisée entre l'alloreconnaissance directe des cellules T et la reconnaissance CMH-restreinte des peptides tumoraux. La cellule allogénique est représentée en rouge, les lymphocytes autologues en bleu et les peptides en jaune (d'après Fabre, 2001).

Cette réactivité croisée a déjà été démontrée pour des peptides viraux [Burrows *et al.*, 1994 ; Gjertsen *et al.*, 1993] mais pourrait aussi s'appliquer à des peptides tumoraux présentés dans le cadre HLA. En outre, la réponse allogénique génère un microenvironnement particulièrement riche en adjuvants de l'immunité à médiation cellulaire (cytokines, molécules d'adhésion et ligands de co-activation) qui peuvent potentialiser les réponses immunes anti-tumorales. Dans cet esprit, notre équipe s'est investie dans un programme de recherches visant à explorer *ex vivo* la faisabilité d'une instrumentalisation de l'alloréactivité et ses incidences potentielles sur les réponses anti-tumorales.

8. Présentation du travail

Au début des années 2000, le docetaxel a fait évoluer le traitement des cancers de la prostate métastatiques hormono-résistants qui constituaient jusqu'alors une impasse thérapeutique au pronostic sombre. Grâce à la publication des résultats très encourageants lors des études de phase II en terme de réponse, deux grandes études internationales de phase III ont été menées avec pour objectif principal une amélioration de la survie globale. L'une comparait le docetaxel au schéma palliatif de référence M/P, tandis que la deuxième comparait l'association docetaxel-estramustine au même traitement de référence. Alors que ces deux études ne permettraient que des comparaisons indirectes des bras expérimentaux, nous avons voulu préciser le bénéfice de l'addition de l'estramustine qui semblait intéressante lors des études antérieures de phase II au moyen d'une analyse parallèle directe. Nous avons donc monté et coordonné une étude multicentrique française de phase II randomisée avec un bras docetaxel seul et un bras combiné docetaxel-estramustine. **Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article 1.**

Parallèlement, nous avons rejoint l'équipe du Laboratoire d'Immunothérapie Cellulaire de l'Institut Jean Godinot pour contribuer à une dynamique de recherche qui a pour objectif d'améliorer les performances vaccinales des DC humaines générées *ex vivo* pour un usage thérapeutique potentiel. En collaboration avec l'Unité MéDIAN de l'UFR Pharmacie de Reims, nous avons d'abord différencié et mûri des DC de grade clinique, à partir de monocytes sanguins, dans des conditions de culture favorisant l'expression de leurs propriétés migratoires. Des analyses vidéomicroscopiques et microphysiologiques ont révélé la très haute mobilité des cellules produites. En outre, une étude zymographique a permis de mettre en évidence un profil enzymatique particulièrement favorable à leur migration au travers des tissus à partir du site d'injection. **Ces travaux font l'objet de l'article 2.**

Un des défis majeurs de l'immunothérapie réside dans la mise en œuvre d'une immuno-intervention susceptible de rompre l'état de tolérance vis-à-vis de la tumeur au stade de l'échappement pour tenter de rétablir un contrôle immunitaire efficace avec un bénéfice patent chez le patient. Satisfaire à ces exigences ne peut se concevoir sans le développement de stratégies adjuvantes nouvelles capables d'induire des réponses immunes anti-tumorales consistantes, favorablement polarisées et persistant dans le temps, sources de nombres élevés d'effecteurs de l'immunité innée et adaptative. Or la réponse immunitaire dirigée contre des Ag de transplantation (ou *alloréaction*) est une réaction "non physiologique" qui associe toutes les caractéristiques de ce cahier des charges. En effet, la violence de la réaction lymphocytaire aux Ag du CMH présentés par

les DC d'un donneur allogénique contraste avec la faiblesse de la réaction des mêmes lymphocytes aux Ag tumoraux présentés par des DC autologues. Ainsi, alors que le nombre de lymphocytes T humains susceptibles de reconnaître un Ag tumoral est de l'ordre de un par million de cellules, près de 10 % des lymphocytes T d'un individu sont impliqués dans l'alloréaction. Par voie de conséquence, l'alloréaction génère un microenvironnement particulièrement riche en adjuvants de l'immunité qui pourrait potentialiser une réponse immune anti-tumorale concomitante. Nous avons participé à l'exploration de cette hypothèse dans le cadre d'un programme de recherches visant à explorer la faisabilité d'une telle instrumentalisation de l'alloréactivité et ses incidences potentielles sur les réponses immunes anti-tumorales. Ces travaux ont été menés *ex vivo* sur une double collection de cellules immunocompétentes constituée à partir de prélèvements réalisés chez des donneurs sains de l'EFS de Reims **dans le cadre d'une étude fondamentale présentée dans l'article 3**, et chez des patients de l'Institut Jean Godinot **dans le cadre d'une étude pré-clinique présentée dans l'article 4**.

RESULTATS

II. RESULTATS

1. Tentative d'optimisation d'une thérapeutique standard dans le cancer de la prostate hormono-résistant.

1.1. Randomized phase II study of docetaxel plus estramustine and single-agent docetaxel in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer.

J.C. Eymard, F. Priou, A. Zannetti, A. Ravaud, D. Lepillé, P. Kerbrat, P. Gomez, B. Paule, D. Genet, P. Hérail, E. Ecstein-Fraïssé, F. Joly.

Ann Oncol 2007;18:1064-70.

L'objectif de ce travail était d'évaluer si l'addition d'estrामustine, anti-néoplasique mixte combinant une chimiothérapie et une hormonothérapie, au docetaxel considéré comme la chimiothérapie actuelle de référence chez les patients porteurs d'un cancer de la prostate évolué hormono-résistant permettait d'améliorer le bénéfice clinique au prix d'une tolérance acceptable.

Randomized phase II study of docetaxel plus estramustine and single-agent docetaxel in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer

J.-C. Eymard^{1*}, F. Priou², A. Zannetti³, A. Ravaut⁴, D. Lepillé⁵, P. Kerbrat⁶, P. Gomez⁷, B. Paule⁸, D. Genet⁹, P. Hérail¹⁰, E. Ecstein-Fraïssé¹¹ & F. Joly¹²

¹Institut Jean-Godinot, Reims; ²Centre Hospitalier Départemental, La Roche-sur-Yon; ³Clinique du Parc, Cholet; ⁴Institut Bergonié, Bordeaux; ⁵Clinique Pasteur, Evreux; ⁶Centre Eugène Marquis, Rennes; ⁷Centre Frédéric Joliot, Rouen; ⁸Hôpital Henri-Mondor, Créteil; ⁹Centre Hospitalier Universitaire Dupuytren, Limoges; ¹⁰Soisy-sous-Montmorency; ¹¹Sanofi-Aventis, Paris; ¹²Centre Jean-François Baclesse, Caen, France

Received 10 September 2006; revised 4 February 2007; accepted 6 February 2007

Background: Docetaxel (Taxotere®)-based regimens are the new standard therapy in advanced hormone-refractory prostate cancer (HRPC). A synergistic activity has been shown with docetaxel in combination with estramustine *in vitro*; however, the benefit of this combination remains controversial in clinical practice. We assessed the activity and safety of docetaxel alone and docetaxel–estramustine in HRPC.

Patients and methods: Patients ($n = 92$) with metastatic HRPC and rising prostate-specific antigen (PSA) while receiving androgen suppression were randomized to 3-weekly treatment with either docetaxel 75 mg/m², day 1 (D), or docetaxel 70 mg/m², day 2, plus oral estramustine 280 mg twice daily, days 1–5 (DE).

Results: Ninety-one patients were treated (DE 47, D 44). A PSA response occurred in 68% (primary endpoint met) and 30% of patients, respectively. Median PSA response duration was 6.0 months in both groups. Median time to progression was 5.7 and 2.9 months, and median survival was 19.3 and 17.8 months in the DE and D arms, respectively. Hematologic and non-hematologic toxic effects were mild and similar in both arms. One patient in each group withdrew due to toxicity. Quality of life was similar in both groups.

Conclusion: Combining estramustine with docetaxel in this schedule is an active and well-tolerated treatment option in HRPC.

Key words: docetaxel, estramustine, hormone-refractory prostate cancer, randomized phase II

Introduction

Prostate cancer is a major health issue, with ~230 000 cases and 29 900 deaths in 2004 in the United States [1]. Treatment options for metastatic hormone-refractory prostate cancer (HRPC) are limited. Until recently, the standard therapy was mitoxantrone plus steroid, which relieves symptoms [2, 3] and improves time to tumor progression (TTP) compared with steroid alone [3, 4] but has no impact on overall survival (OS).

Single-agent docetaxel has reproducible activity against prostate cancer, both in xenograft models [5–7] and in clinical trials [8]. In phase II studies, docetaxel given either weekly or every 3 weeks achieved reductions in prostate-specific antigen (PSA) levels $\geq 50\%$ in 38%–48% of patients [9].

Estramustine interferes with microtubules and has synergistic activity *in vitro* with other microtubule-binding agents including taxanes [5, 6, 10]. Additionally, in some preclinical models of prostate cancer, the activity of docetaxel in

combination with estramustine was higher than with estramustine alone. Noncomparative clinical studies of single-agent estramustine in HRPC demonstrated response rates ranging from 19% to 69%—similar to those achieved by conventional anticancer agents [11]. Estramustine is associated with an increased risk of cardiovascular events; however, this may be prevented by prophylactic anticoagulation therapy [12].

Phase I/II studies of docetaxel in combination with estramustine for HRPC [12–18] have reported relatively high response rates compared with studies of single-agent docetaxel. Overall, 45%–92% and 30%–58% of patients receiving docetaxel–estramustine achieved PSA reductions $>50\%$ and 75%–80%, respectively. Safety was acceptable and 53%–86% of patients had improved symptoms. In two phase III studies conducted concomitantly with the present study, docetaxel combined with either estramustine or prednisone significantly prolonged OS compared with standard mitoxantrone plus prednisone [19, 20]. Docetaxel-based regimens have subsequently become a standard treatment of HRPC.

*Correspondence to: Dr J.-C. Eymard, Institut Jean-Godinot, 51056 Reims, France.
Tel: +33-3-26-50-44-44; Fax: +33-3-26-50-44-49; E-mail: jc.eynard@reims.fndcc.fr

This study was conducted to evaluate the activity and safety of docetaxel alone or in combination with estramustine in HRPC.

patients and methods

eligibility

This was a randomized, multicenter, open-label phase II trial. Eligibility criteria included histologically proven adenocarcinoma of the prostate, progressive metastatic disease despite androgen deprivation [with cessation of antiandrogen treatment by at least 4 weeks (6 weeks for bicalutamide)], World Health Organization (WHO) performance status ≤ 2 , adequate bone marrow, renal, and hepatic function [neutrophils $\geq 1.5 \times 10^9/\text{l}$, platelets $\geq 100 \times 10^9/\text{l}$, hemoglobin $\geq 10 \text{ g/dl}$, serum creatinine $\leq 1.5 \times$ upper normal limit (UNL), bilirubin $\leq$ UNL, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) $\leq 1.5 \times$ UNL], and written informed consent. Prior radiation therapy and surgery were to have been completed at least 4 weeks before study entry. Patients were to have received one previous hormone therapy, on the basis of surgical or medical [luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) agonist] castration with or without antiandrogen therapy. Treatment with an LH-RH agonist was to be continued during the study.

Hormone resistance was defined as tumor progression while on androgen suppression. Tumor progression was defined as clinical or radiologic disease progression or two consecutive increases in PSA values (V2 and V3) of $\geq 5 \text{ ng/ml}$ compared with a reference PSA value (V1, measured 4–6 weeks after antiandrogen withdrawal). If V3 was less than V2, a fourth PSA measurement (V4) was made. Measurements of PSA were conducted at ≥ 7 -day interval. The last value was required to be $\geq 20 \text{ ng/ml}$ and measured within 14 days of study treatment initiation.

Ineligibility criteria were prior chemotherapy, isotope treatment (e.g. strontium, samarium), or radiation therapy involving $>25\%$ of bone marrow; history of another cancer (except adequately treated basal- or spindle-cell skin cancer or other cancer treated with a curative intent by surgery and/or radiation therapy >5 years previously); brain or meningeal metastases; National Cancer Institute–Common Toxicity Criteria (NCI–CTC) grade ≥ 2 peripheral neuropathy; severe concomitant medical conditions; participation in another clinical trial within 30 days before study entry; and allergy to polysorbate 80. Concomitant treatment with other investigational products, other antitumor agents (except LH-RH agonists), bisphosphonates, angiotensin-converting enzyme inhibitors, and corticosteroids [except premedication for docetaxel (Taxotere[®], sanofi-aventis, Paris, France) infusion] was not permitted. The study was approved by the Comité de Protection des Personnes dans la Recherche Bio-Médicale de Champagne-Ardenne.

assessment and treatment plan

Patients were assigned by a centralized randomization to receive docetaxel 75 mg/m^2 (day 1) every 21 days (D), or docetaxel 70 mg/m^2 (day 2) plus estramustine (Estracyt[®], Pfizer, Paris, France) 280 mg orally twice daily for five consecutive days (days 1–5) every 21 days (DE). Docetaxel was administered as a 1-h i.v. infusion with steroid premedication (oral dexamethasone 8 mg once on day 1, three times on day 2, and twice on day 3). The docetaxel dose was to be reduced by 25% in the event of grade 4 neutropenia lasting ≥ 7 days, febrile neutropenia, documented infection during grade 3 or 4 neutropenia, nonrecovery of neutrophil count $\geq 1.5 \times 10^9/\text{l}$ or platelet count $\geq 100 \times 10^9/\text{l}$ on day 1, grade 3 or 4 non-hematologic toxicity (except nausea or vomiting without appropriate premedication and skin reactions), grade 2 peripheral neuropathy, AST/ALT $>1.5 \times$ UNL, or bilirubin $>$ UNL. The patient was

to be withdrawn from the study if toxicity persisted despite two dose reductions or did not resolve within 2 weeks. Blood cell counts were taken every 3 weeks and more frequently in the event of toxicity. Nadir values were not collected. Warfarin 1 mg/day was administered orally as prophylaxis for estramustine-related thromboembolism. In the event of thromboembolism, estramustine was to be stopped and docetaxel treatment alone continued.

Treatment was continued until documented progression, patient request, unacceptable toxicity, lack of toxicity recovery by day 35, or completion of six cycles. More than six cycles were permitted in patients considered to be benefiting from treatment at the investigator's discretion. Levels of PSA were determined at baseline (within 14 days before treatment initiation), every 3 weeks (before the start of each cycle), at treatment discontinuation, and every month until documentation of tumor progression or start of another chemotherapy. All PSA measurements in a given patient were to be performed in the same laboratory.

study endpoints

A PSA response (primary endpoint) was defined as a decrease in the serum PSA level of $\geq 50\%$ from baseline that was maintained for ≥ 3 weeks in accordance with the consensus guidelines of the PSA Working Group [21]. Secondary endpoints were PSA response duration, objective tumor response rate, TTP, OS, pain control, quality of life (QoL), and safety. The PSA response duration was the time between the first and last evaluations during which criteria for a PSA response were met. If the PSA response and progression criteria were not met, a patient was considered to have stable PSA.

When the protocol was initially written, measurable disease response was determined according to the WHO guidelines for complete response (CR), partial response (PR), stable disease, and progressive disease. Objective responses were confirmed by two measurements (≥ 4 weeks apart). Lesions were to be evaluated by the same radiologic technique every three cycles and then every 3 months until documented progression. Lesions were categorized as bidimensionally measurable (all target lesions $\geq 20 \times 10 \text{ mm}$ with well-delimited outlines) or unidimensionally measurable ($\geq 20 \text{ mm}$ with only one measurable diameter). Briefly, a CR required complete disappearance of all measurable sites of disease. The PR consisted of a 50% greater reduction in the sum of the products of the two largest diameters of bidimensionally measurable lesions, or in the sum of the largest diameter of unidimensionally lesions.

Progression was defined as anyone of the following events: (i) an increase in the PSA level $\geq 50\%$ for responding patients or $\geq 25\%$ for nonresponding patients (and an absolute increase $\geq 5 \text{ ng/ml}$), confirmed by a second measurement; (ii) an increase $\geq 25\%$ in the sum of the products of the two largest diameters of bidimensionally measurable lesions or of the largest diameter of one unidimensionally measurable lesion; (iii) progression of a nonmeasurable lesion (except bone); and (iv) development of new lesions, including new suspicious lesions on bone scan. Measurements were compared with the lowest value achieved by the patient during the study.

Adverse events and laboratory variables were assessed according to NCI–CTC version 2. Pain was assessed at baseline and at the end of each cycle/beginning of the following cycle using multidimensional verbal scales ranging from 0 (no pain) to 4 (extreme pain) and from 0 (no analgesics) to 4 (use of morphine analgesics). A positive pain response was defined as decreased (by at least one point) pain and analgesic consumption, decreased pain and stable analgesic consumption, or stable pain and decreased analgesic consumption. QoL was assessed using the Functional Assessment of Cancer Therapy–Prostate (FACT–P) questionnaire [22].

adapted to prostate cancer, which was completed by patients before randomization, before each treatment cycle, and monthly after study treatment discontinuation.

statistical analysis

Randomization was performed centrally using a permuted-block design, with stratification by center. The number of patients to be included was calculated using a Simon's two-step minimax design. The statistical hypotheses were α risk = 0.05, β risk = 0.20, maximum inefficacy response rate (P_0 = 30%), and maximum efficacy response rate (P_1 = 50%). Consequently, a total of 19 patients per arm were to be enrolled in the first step. PSA response was determined as a descriptive primary endpoint. If ≤ 6 of the 19 patients were responders, the study was to be stopped for lack of efficacy; if > 6 were responders, 20 additional patients were to be entered. Treatment would be considered effective if > 16 out of the total 39 patients responded. Assuming 15% of patients would be nonevaluable, a total of 90 patients were required.

Statistical analyses were descriptive. No statistical comparison between the two arms was planned for PSA response. Time-to-event data were estimated by the Kaplan-Meier method. The FACT-P scores were compared between treatment arms at baseline and at cycles 2, 4, and 6. Changes in QoL from baseline were analyzed by covariance analysis with repeated measures of trial outcome index. Global pain response was determined by (i) decreased pain plus decreased or stable analgesic consumption or (ii) stable pain plus decreased analgesic consumption.

results

patients and treatment administered

Between 9 February 2001 and 1 April 2003, 92 patients (DE: 48, D: 44) were randomized at 12 centers in France. One patient in the DE group did not receive study treatment due to phlebitis. Therefore, efficacy and safety analyses were performed in the modified intent-to-treat (ITT) population (Table 1). Patient characteristics at baseline were generally well balanced, although patients in the DE group had a shorter time from diagnosis to randomization (28.7 versus 38.5 months), a higher baseline PSA level, and more involved organs (Table 1). Twenty-three percent of patients had anemia and 18% had low serum albumin at study entry. In the DE and D groups, respectively, 38% and 37% of patients were using morphine analgesics and 29% and 24% of patients were not taking any analgesics at baseline. In addition to the DE patient who did not receive study treatment, a further 14 patients (DE: 5, D: 9) were not eligible: mainly owing to inadequate documentation of PSA progression or baseline PSA < 20 ng/ml (Table 2). Of the 91 treated patients, 69 (76%) completed six or more cycles. Eight (9%) patients received more than six cycles, five of whom had a PSA response.

clinical efficacy

In the ITT population, a PSA response was observed in 68% [95% confidence interval (CI) 55% to 81%] and 30% (95% CI 16% to 43%) of patients in the DE and D groups, respectively (Table 3). According to the initial hypothesis, treatment would be considered effective if $> 16/39$ patients (41%) had a PSA response. Hence, the primary endpoint was met in the DE group but not in the D group. The proportion of patients with a PSA response $\geq 75\%$ was 36% and 16%, respectively. Of the

Table 1. Patient characteristics (ITT population)

	DE (n = 47)	D (n = 44)
Age		
Median (years)	67.4	69.0
Range (years)	46.2–79.8	57.3–86.3
≥ 70 years, n (%)	15 (32)	18 (41)
WHO PS, n (%)		
0	18 (38)	14 (32)
1	25 (53)	25 (57)
2	4 (9)	5 (11)
Time from diagnosis to randomization, months		
Median	28.7	38.5
Range	6.8–152.0	1.9–113.1
Gleason score		
Median	7	7
Range	3–9	4–10
Previous therapy		
Radical prostatectomy, n (%)	7 (15)	8 (18)
Radiation, n (%)	22 (47)	23 (52)
Median PSA at study entry, ng/ml [range]	127.8 [0.3 ^a –1145]	79.7 [10.5 ^a –1585]
Measurable lesions, n (%)	22 (47)	18 (41)
Organs involved		
Median	2	1
Range	0–4	0–3
Type of organ involved, n (%)		
Bone	42 (89)	40 (91)
Lymph nodes	22 (47)	12 (27)
Liver	3 (6)	9 (20)
Lung	4 (9)	2 (5)
Other ^b	11 (23)	6 (14)
Patients with pain, n (%)	33 (70)	31 (70)

D, docetaxel; DE, docetaxel-estramustine; ITT, intent-to-treat;

PS, performance status; PSA, prostate-specific antigen; WHO, World Health Organization.

^aThe most frequent major protocol violations were inadequate documentation of PSA progression on two consecutive measurements or baseline PSA < 20 ng/ml.

^bProstate, 5; adrenal gland, 3; pelvis (locoregional), 3; muscle, 2; epidural involvement, 2; paravertebral, 1; and ascitis, 1.

patients who were eligible and evaluable for a PSA response, a response occurred in 74% and 38% of patients in the DE and D groups, respectively. After a median follow-up of 17.7 months (range 0.4–37.4), the median PSA response duration was 6.0 months in both groups (Table 3).

Among the 40 patients with measurable lesions, four DE patients (18%) had durable objective tumor responses lasting 6.9, 7.5, 8.3, and 12.7 months and three D patients (17%) had responses lasting 5.9, 7.5, and 9.3 months (all responses were partial). One patient in each group had an objective tumor response without a concomitant PSA response.

The median TTP was 5.7 months (95% CI: 4.7–6.8) in the DE group and 2.9 months (95% CI: 2.0–6.9) in the D group (Table 3 and Figure 1). The probability of being progression free at 6 months was 45% and 31% in the DE and D groups, respectively. Twenty-nine patients were alive at the cut-off date

Table 2. Patient disposition

	DE	D
Randomized	48	44
Treated (ITT)	47	44
Eligible	43	35
Not eligible ^a	5	9
Evaluable for PSA response	43	36
Eligible and evaluable for PSA response	42	34
Cycles administered		
Total	272	240
Median [range]	6 [1–9]	6 [1–12]
Dose reductions and delays	<i>n</i> = 47	<i>n</i> = 44
Patients completing ≥6 cycles (%) ^b	41 (87)	28 (64)
Patients receiving >6 cycles (%)	3 (6)	5 (11)
Patients with ≥1 dose reduced (%) ^c	2 (4)	2 (5)
Patients with ≥1 cycle delay >7 days (%)	7 (15)	5 (11)
Median docetaxel dose per cycle, mg/m ² [range]	69.6 [55–75]	74.7 [60–82]
Docetaxel median relative dose intensity [range]	0.97 [0.81–1.04]	0.99 [0.71–1.08]
Estramustine given according to protocol, cycles (%) ^d	231 (85)	–

D, docetaxel; DE, docetaxel–estramustine; ITT, intent-to-treat; PSA, prostate-specific antigen.

^aThe most frequent major protocol violations were inadequate documentation of PSA progression on two consecutive measurements or baseline PSA <20 ng/ml.

^b26 patients (DE: 8, D:18) completed six cycles despite previous PSA or objective tumor progression.

^cAll dose reductions were owing to non-hematologic toxicity.

^dWithout planned dose reduction. Note: no formal evaluation of estramustine exposure was performed.

(DE: 17, D: 12). The median survival was 19.3 months (95% CI: 14.6–25.9) in the DE group and 17.8 months (95% CI: 11.8–20.9) in the D group (Table 3 and Figure 2). One-year survival was >60% in both arms. At cycle 1, 54% and 46% of patients, in the DE and D groups, respectively, had a positive pain response.

toxicity

The incidence of treatment-related grade 3 or 4 adverse events was low in both groups (Table 4). One patient (2%) in each group experienced febrile neutropenia, but no cases of neutropenic infection were reported. The most frequent non-hematologic adverse events were fatigue, nausea, and alopecia, with a similar incidence between groups (Table 4). Three patients (6.4%) in the DE group experienced phlebitis, which was possibly attributed to estramustine.

Severe (grade 3 or 4) non-hematologic toxic effects included one case each of functional renal failure secondary to vomiting and diarrhea, hypersensitivity reaction to docetaxel, and fatal acute pulmonary edema (relation to study treatment

Table 3. PSA responses and secondary efficacy endpoints (intent-to-treat population)

	DE (<i>n</i> = 47)	D (<i>n</i> = 44)
Best PSA response, <i>n</i> (%)		
≥50%	32 (68)	13 (30)
≥75%	17 (36)	7 (16)
Stable value	9 (19)	11 (25)
Progression	2 (4)	12 (27)
Nonevaluable	4 (9)	8 (18)
Median PSA response duration, months (95% CI)	6.0 (4.0–6.4)	6.0 (5.9–7.1)
Median TTP ^a , months (95% CI)	5.7 (4.7–6.8)	2.9 (2.0–6.9)
Median OS, months (95% CI)	19.3 (14.6–25.9)	17.8 (11.8–20.9)
Tumor responses		
Patients with measurable lesions, <i>n</i> (%)	22	18
Partial response	4 (18)	3 (17)
Stable disease	9 (41)	9 (50)
Progressive disease	6 (27)	5 (28)
Nonevaluable	3 (14)	1 (6)

CI, confidence interval; D, docetaxel; DE, docetaxel–estramustine; OS, overall survival; PSA, prostate-specific antigen; TTP, time to tumor progression.

^aEither PSA or objective tumor progression was taken into account, whichever occurred first.

uncertain). Five deaths occurred within 30 days of last study treatment: one (D group) due to acute pulmonary edema possibly related to study treatment and four (DE: 1, D: 3) not related to study treatment. Two patients discontinued treatment due to toxicity: one in the D group with previously mentioned pulmonary edema and one in the DE group with prolonged grades 1–2 thrombocytopenia.

quality of life

Seventy-six questionnaires (83% of the randomized population) were collected and evaluable at baseline. The analysis was performed on 72 patients (79% of the ITT population) who had at least one baseline and one post-inclusion evaluable questionnaire. There was a nonsignificant trend toward improved QoL from baseline, and QoL between the two groups was similar.

discussion

In this randomized phase II study in patients with metastatic HRPc, a PSA response ≥50% was achieved by 68% of patients receiving DE and 30% of patients receiving single-agent docetaxel. Median TTP (DE: 5.7 months, D: 2.9 months), median survival (DE: 19.3 months, D: 17.8 months), and the proportion of patients with a PSA response ≥75% (DE: 36%, D: 16%) also favored the DE group. While phase III trials should aim to demonstrate improvements in survival, or in QoL or symptom control, PSA response and PSA TTP are appropriate outcome measures to demonstrate evidence of biologic activity in phase II trials. Therefore, our phase II study was not powered

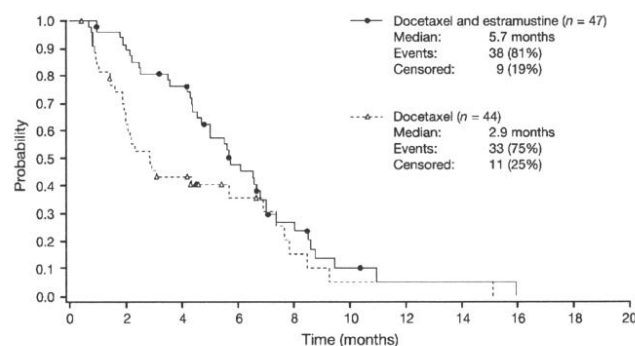


Figure 1. Time to progression (intent-to-treat population).

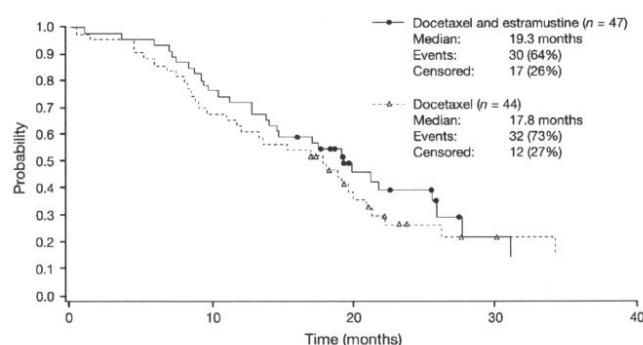


Figure 2. Overall survival.

to detect a statistically significant difference in survival.

Objective response rates, PSA response duration, pain control, and QoL were similar in both groups. Imbalances between the two groups were present at baseline with respect to time from diagnosis, PSA level, and organ involvement; however, these favored the D group and thus do not appear to have changed the study outcome.

The results of our study are consistent with several nonrandomized studies of DE [12–18] and single-agent docetaxel [8], and two large randomized phase III studies of docetaxel combined with either estramustine for the Southwest Oncology Group protocol 9916 (SWOG 9916) [19] or prednisone for the TAX 327 study [20]. In the SWOG 9916 study [19], DE achieved a PSA response rate of 50% and a TTP of 6.3 months. It is notable that, in the SWOG study, the docetaxel dose (60 mg/m²) was lower and the estramustine dose (280 mg three times daily) was higher than in our study. In the TAX 327 study [20], docetaxel–prednisone achieved a PSA response rate of 45% and a median PSA response duration of 7.7 months. It is of interest to note that the PSA response rate in the docetaxel monotherapy arm in our study was lower than the response rate for docetaxel–prednisone in

the TAX 327 study. Patient characteristics were similar in the two studies; therefore, this difference may be related to the lack of continuous administration of prednisone in our study. Importantly, both the SWOG 9916 and TAX 327 studies showed a significant improvement in OS with a docetaxel-based regimen given every 3 weeks compared with standard mitoxantrone plus prednisone. Median OS was 17.5 and 18.9 months for docetaxel combined with either estramustine or prednisone, respectively, compared with 19.3 months for DE in our study. Results consistent with the present study were also reported for a phase II study, in which docetaxel 70 mg/m² every 3 weeks plus estramustine 280 mg three times daily for 5 days and prednisone 10 mg daily achieved a PSA reduction ≥50% in 67% of patients and a median survival of 18.6 months. The TTP (8.8 months) was slightly higher than in our study [23].

Treatment was well tolerated and the incidence of grades 3–4 adverse events was low in both groups. Patients received prophylactic anticoagulation with warfarin and the incidence of cardiovascular events was acceptable (2.1% grades 3–4 phlebitis in the absence of other events). However, no prophylactic anticoagulation therapy was planned in the SWOG 9916 study [19] in which 14.2% of patients had grades 3–4 cardiovascular

Table 4. National Cancer Institute–Common Toxicity Criteria treatment-related adverse events, by patient

Adverse event	No. of patients (%)			
	DE (n = 47)		D (n = 44)	
	All	Grade 3–4	All	Grade 3–4
Any treatment-related event	42 (89)	7 (15)	36 (82)	7 (16)
Neutropenia	19 (40)	12 (26)	21 (48)	12 (27)
Febrile neutropenia	1 (2)	1 (2)	1 (2)	1 (2)
Anemia	41 (87)	5 (11)	37 (84)	1 (2)
Thrombocytopenia	2 (4)	0	2 (5)	1 (2)
Fatigue	20 (43)	1 (2)	24 (55)	1 (2)
Alopecia	19 (40)	NA	21 (48)	NA
Nausea	21 (45)	0	17 (39)	2 (5)
Diarrhea	12 (26)	0	7 (16)	0
Peripheral edema	15 (32)	0	4 (9)	0
Anorexia	7 (15)	0	9 (20)	0
Vomiting	8 (17)	0	7 (16)	1 (2)
Nail changes	10 (21)	0	5 (11)	0
Sensory neuropathy	9 (19)	0	5 (11)	0
Infection (without neutropenia)	9 (19)	1 (2)	4 (9)	0
Stomatitis	5 (11)	0	2 (5)	0
Taste disturbance	3 (6)	0	4 (9)	0
Phlebitis	3 (6)	1 (2)	0	0
Allergic reaction	1 (2)	1 (2)	1 (2)	0
Acute pulmonary edema	3 (6)	0	2 (5)	1 (2)
Renal failure	0	0	1 (2)	1 (2)

D, docetaxel; DE, docetaxel–estramustine; NA, not applicable.

events (including 4.2% thrombosis), leading to a protocol amendment to include warfarin prophylaxis.

Some adverse events characteristic of docetaxel therapy, including diarrhea, nonneutropenic infection, peripheral edema, and nail disorders, occurred more frequently in the DE group—despite the lower docetaxel dose—than in the D group. Hence, estramustine may enhance both the efficacy and toxicity of docetaxel. However, excess grades 3–4 adverse events were not observed in the DE group. In the SWOG 9916 study [19], the incidence of grades 3–4 adverse events with docetaxel–estramustine was markedly higher than in our study (55.8% and 14.9%, respectively). This may be explained by the lack of prophylactic anticoagulation and relatively high estramustine dose in SWOG 9916 (280 mg three times daily) compared with our study (280 mg twice daily). Historical comparisons suggest that estramustine b.i.d. may provide the same activity with better tolerability than a three-times daily regimen; however, in one study, the three-times-a-day regimen was associated with a low incidence of grades 3–4 adverse events [23].

Some patients in our study continued treatment despite PSA or objective tumor progression. This may be beneficial in terms of tumor-related symptom relief and reflects the lack of effective treatment options for patients with HRPC.

Another study has also compared the same treatment regimens as assessed here, and preliminary findings have been reported [24]. In this Italian multicenter phase II study, 95 patients were randomized [24]. The DE combination showed promising efficacy: PSA response rate was 70% and 43% in the DE and D arms, respectively, and PSA TTP was 31 and 20

weeks, respectively. Although it is not possible to compare two randomized phase II studies statistically, the benefit of the DE combination over D alone [24] appears to be consistent with that reported here. The beneficial role of estramustine for HRPC has been supported by a recent meta-analysis [25]. A total of five randomized trials were identified in which 610 patients with HRPC were assigned to chemotherapy with or without estramustine [25]. This systematic review reported that the addition of estramustine to chemotherapy with antimicrotubule agents, including taxanes, vinblastine, and ixabepilone, had a positive and significant effect, resulting in increased OS [hazard ratio = 0.82 (95% CI: 0.69–0.97); $P = 0.02$] [25].

In conclusion, docetaxel 70 mg/m² plus estramustine 280 mg twice daily for 5 days, every 3 weeks, is an active and well-tolerated treatment option for patients with HRPC and increasing PSA levels despite effective castration. The favorable PSA response rate, TTP, and impact on pain palliation support the recommendation of DE as a therapeutic option for metastatic HRPC. A phase III trial would be required to confirm the benefits of docetaxel–estramustine over docetaxel alone.

acknowledgements

We are indebted to the men who participated in this study, to nurses and data managers, and to the study contributors. We thank Véronique Lotz for her helpful assistance. Editorial assistance and study support were provided by sanofi-aventis, Paris, France. Portions of these results have been presented at the Annual meeting of the American Society of Clinical Oncology, New Orleans, USA, 2004.

references

- Jemal A, Tiwari RC, Murray T et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004; 54: 8–29.
- Tannock IF, Osoba D, Stockler MR et al. Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1756–1764.
- Kantoff PW, Halabi S, Conaway M et al. Hydrocortisone with or without mitoxantrone in men with hormone-refractory prostate cancer: results of the cancer and leukaemia group B 9182 study. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2506–2513.
- Berry W, Dakhil S, Modiano M et al. Phase III study of mitoxantrone plus low dose prednisone versus low dose prednisone alone in patients with asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *J Urol* 2002; 168: 2439–2443.
- Williams JF, Muenchen HJ, Kamradt JM et al. Treatment of androgen-independent prostate cancer using antimicrotubule agents docetaxel and estramustine in combination: an experimental study. *Prostate* 2000; 44: 275–278.
- Oudard S, Legrier ME, Boye K et al. Activity of docetaxel with or without estramustine phosphate versus mitoxantrone in androgen dependent and independent human prostate cancer xenografts. *J Urol* 2003; 169: 1729–1734.
- Fizazi K, Sikes CR, Kim J et al. High efficacy of docetaxel with and without androgen deprivation and estramustine in preclinical models of advanced prostate cancer. *Anticancer Res* 2004; 24: 2897–2903.
- Khan MA, Carducci MA, Partin AW. The evolving role of docetaxel in the management of androgen independent prostate cancer. *J Urol* 2003; 170: 1709–1716.

9. Pienta KJ, Smith DC. Advances in prostate cancer chemotherapy: a new era begins. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 300–318.
10. Hamilton A, Muggia F. Estramustine potentiates taxane in prostate and refractory breast cancers. *Oncology* 2001; 15 (5 Suppl 7): 40–43.
11. Perry CM, McTavish D. Estramustine phosphate sodium. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in prostate cancer. *Drugs Aging* 1995; 7: 49–74.
12. Sinibaldi VJ, Carducci MA, Moore-Cooper S et al. Phase II evaluation of docetaxel plus one-day oral estramustine phosphate in the treatment of patients with androgen independent prostate carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 1457–1465.
13. Petrylak DP, Macarthur RB, O'Connor J et al. Phase I trial of docetaxel with estramustine in androgen-independent prostate cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 958–967.
14. Weitzman AL, Shelton G, Zuech N et al. Dexamethasone does not significantly contribute to the response rate of docetaxel and estramustine in androgen independent prostate cancer. *J Urol* 2000; 163: 834–837.
15. Natale RB, Zaretsky S. Phase I/II trial of estramustine and Taxotere in patients with hormone refractory prostate cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999; 18: 348a (Abstr 1343).
16. Savarese DM, Halabi S, Hars V et al. Phase II study of docetaxel, estramustine, and low-dose hydrocortisone in men with hormone-refractory prostate cancer: a final report of CALGB 9780. *Cancer and Leukemia Group B. J Clin Oncol* 2001; 19: 2509–2516.
17. Kreis W, Budman DR, Fetten J et al. Phase I trial of the combination of daily estramustine phosphate and intermittent docetaxel in patients with metastatic hormone refractory prostate carcinoma. *Ann Oncol* 1999; 10: 33–38.
18. Silka Copur M, Ledakis P, Lynch J et al. Weekly docetaxel and estramustine in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Semin Oncol* 2001; 28 (4 Suppl 15): 16–21.
19. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MHA et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 1513–1520.
20. Tannock IF, de Wit R, Berry WR et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 1502–1512.
21. Bubley GJ, Carducci M, Dahut W et al. Eligibility and response guidelines for phase II clinical trials in androgen-independent prostate cancer: recommendations from the Prostate-Specific Antigen Working Group. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3461–3467.
22. Esper P, Mo F, Chodak G et al. Measuring quality of life in men with prostate cancer using the functional assessment of cancer therapy-prostate instrument. *Urology* 1997; 50: 920–928.
23. Oudard S, Banu E, Beuzeboc P et al. Multicenter randomized phase II study of two schedules of docetaxel, estramustine, and prednisone versus mitoxantrone plus prednisone in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *J Clin Oncol* 2005; 20: 3343–3351.
24. Caffo O, Sava T, Comloj E et al. A multicentric phase II randomized trial of docetaxel plus estramustine versus docetaxel as first line chemotherapy for patients with hormone-refractory advanced prostate cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 247s (Abstr 4625).
25. Fizazi K, Hudes GR, Berry WR et al. A meta-analysis of individual patient data from randomized trials assessing chemotherapy with and without estramustine in patients with castration-refractory prostate cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 231s (Abstr 4561).

1.2. Résumé :

Nous avons étudié parallèlement les deux modalités thérapeutiques, soit une monochimiothérapie par docetaxel 75 mg/m² J1 avec reprise à J21 (D), soit l'association docetaxel 70 mg/m² J2 + estramustine 560 mg/j J1 à J5 avec reprise à J21 (D+E), en construisant avec le laboratoire Sanofi-Aventis et coordonnant une étude de phase II randomisée multicentrique française.

Résultats : 91 patients ont été traités dans 12 institutions françaises, 44 dans le bras docetaxel et 47 dans le bras combiné docetaxel + estramustine. Le critère objectif principal pour apprécier l'efficacité était une diminution du PSA d'au moins 50 % pendant une durée minimale de 3 semaines. Le taux de réponse biologique a été de 68 % dans le groupe D+E contre 30 % dans le groupe D. Le temps médian jusqu'à progression biologique a été respectivement de 5,7 et 2,9 mois et la survie médiane de 19,3 et 17,8 mois dans les bras D+E et D. La tolérance a été globalement similaire dans les 2 bras hormis 6,4 % de phlébites dans le bras D+E malgré une prophylaxie anticoagulante systématique par coumadine à faibles doses. La qualité de vie appréciée par les patients au moyen de questionnaires standardisés (FACT-P et QoL) a été jugée similaire.

Conclusion : cette étude française a été la première à tenter d'évaluer l'apport de cette association. Deux autres études de phase II ont depuis été publiées ainsi qu'une méta-analyse. Même s'il est impossible d'en tirer un nouveau standard thérapeutique, cette étude s'intègre dans une démarche de recherche d'optimisation des cytotoxiques classiques par leur association à d'autres chimiothérapies ou de nouveaux traitements ciblés allant jusqu'à l'immunothérapie (anticorps monoclonaux, vaccinations).

2. Production et analyse de cellules dendritiques dotées de propriétés migratoires propices à leur efficacité clinique.

2.1. Active matrix metalloprotease-9 in and migration pattern of dendritic cells matured in clinical grade culture conditions.

P. Hollender, D. Ittelet, F. Villard, J.C. Eymard, P. Jeannesson, J. Bernard.

Immunobiology 2002;206:441-58.

L'objectif de ce travail était d'établir les conditions de culture GMP et de développer des tests d'évaluation pertinents pour produire *ex vivo* à partir de monocytes sanguins des DC de grade clinique dotées de propriétés migratoires plus favorables à leur efficacité clinique.

¹Unité MeDIAN, CNRS UMR 6142, Faculté de Pharmacie, ²Unité de Thérapie Cellulaire et ⁴Unité JADE, Institut Jean Godinot, Reims Cedex, and ³Etablissement Français du Sang Nord de France, Lille, France

Active Matrix Metalloprotease-9 in and Migration Pattern of Dendritic Cells Matured in Clinical Grade Culture Conditions

PATRICK HOLLENDER¹, DANIELLE ITTELET², FLORENCE VILLARD³,
JEAN-CHRISTOPHE EYMARD⁴, PIERRE JEANNESON¹, and JACKY BERNARD³

Received March 15, 2002 · Accepted in revised form June 26, 2002

Abstract

Dendritic cells (DC) represent potent antigen presenting cells (APC) that are capable of generating tumor-specific immunity. In DC-based vaccination the migration of the infused DC from the site of injection to the secondary lymphoid organs might be critical to induce an effective immune response. Therefore we analyzed the migrating properties of maturing DC generated from human blood monocytes under culture conditions in compliance with the good manufacturing practice (GMP) guidelines. Highly purified CD14⁺ monocytes were differentiated into immature DC (iDC), then optimally matured as evidenced by CD83 expression. Time-lapse videomicroscopy and Transwell migration assays performed with or without Matrigel, proved mature DC (mDC) to be highly migrating cells compared to iDC although mDC migratory response varied markedly according to individuals (n=15). Moreover, as shown by gelatin zymography and ELISA, mDC predominantly expressed both the active form of the matrix metalloprotease-9 (MMP-9) and low amounts of its physiological inhibitor, the tissue inhibitor of metalloprotease-1 (TIMP-1) which may explain their high migrating capacity through Matrigel layers. Macrophage inflammatory protein-3 β (MIP-3 β), strongly increased mDC migration through Matrigel by up-regulating the membrane MMP-9 active form suggesting that injected mDC could be selectively guided to T-cell areas of lymph nodes by this chemokine. Taken together, we demonstrate for the first time that mDC, but not iDC, prepared in clinical grade conditions are both physiologically invasive cells expressing chemokine-active and -sensitive MMP-9, which may be critical for their trafficking through tissues after injection. Consequently, we argue that migration characteristics should be included into a gold standard for DC administrated to patients.

Abbreviations: APC = antigen presenting cells; DC = dendritic cells; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; CTL = cytotoxic T lymphocytes; GM-CSF = granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GMP = good manufacturing practice; iDC = immature DC; IL-1 = interleukin-1; IL-4 = interleukin-4; MIP-3 α = macrophage inflammatory protein-3 α ; MIP-3 β = macrophage inflammatory protein-3 β ; MMP-9 = matrix metalloprotease-9; MMP-2 = matrix metalloprotease-2; mDC = mature DC; MCM = monocyte-conditioned medium; PGE₂ = prostaglandin E₂; TIMP-1 = tissue inhibitor of metalloprotease-1; TIMP-2 = tissue inhibitor of metalloprotease-2; TNF- α = tumor necrosis factor- α .

Introduction

The remarkable immunostimulatory properties of dendritic cells (DC) reside in their ability to transport antigens from peripheral tissues to lymphoid organs where they present these antigens to T cells in an optimal costimulatory context (reviewed in Refs. 1–3). Localized in tissues both as immature and antigen-capturing cells, DC mature and migrate to secondary lymphoid organs upon activation, then become APC able to trigger naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells. By polarizing the T helper cell response, DC enhance activation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL). This process accounts for the induction of tumor immunity (4), as demonstrated in animal studies where DC loaded with an appropriate tumor antigen can prime T cells capable of killing tumor cells in an antigen-specific fashion and elicit a protective and therapeutic tumor resistance (5–8).

Investigation of these important cells has been greatly facilitated by empiric approaches that can generate numbers of functional human DC *in vitro* from rare proliferating CD34⁺ progenitors (9) or from more frequent but non-proliferating monocyte precursors (10–12). The first controlled evidence of the immunogenicity of DC in humans has been reported by DHODAPKAR et al. (13) who demonstrated that a single injection of monocyte-derived DC pulsed with antigens rapidly expands broad T cell immunity whereas antigens alone failed to immunize. Antigen-loaded DC used as a tumour vaccine in patients with various malignancies, have shown to induce systemic tumor-directed immune responses consisting of antigen-specific delayed-type hypersensitivity and significant expansion of specific CTL (14, 15). However, not all the treated patients have experienced tumor regression suggesting that such an immunotherapeutic approach has to be improved by optimizing relevant parameters. Thus, fitting the route of administration with the migratory properties of the infused cells, remains one of the critical challenges in DC based vaccination. Because DC presumably must home to secondary lymphoid organs to prime T cells responses, migration pattern of the cultured DC appears as a key for vaccinal efficiency. Recently, human monocyte-derived DC have been shown to spontaneously migrate *in vitro* through 3D-collagen lattices by forming short-lived interactions with collagen fibers (16). DC also demonstrated transendothelial migration capability which can be influenced by type of serum (17), integrins expression (18) and chemokine system (19). However, to our knowledge little is known about migratory properties of DC prepared *ex vivo* in conditions required for cell therapy. Therefore, we aimed at characterizing the migratory pattern of virtually pure maturing DC generated in a one-step culture method performed in conformity with good manufacturing practice (GMP) guidelines for clinical use (20). As a large body of evidence indicate that the cell migratory process can involve a combined action with proteolytic enzymes able to degrade extracellular matrix structures of connective tissue (21), we also investigated the expression of matrix metalloproteases (MMP) and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of matrix metalloproteases (TIMP) (22).

Materials and Methods

Cell separation

Monocytes from healthy blood donors who gave informed consent were collected by leukapheresis using a continuous-flow cell separator (Spectra, COBE Laboratory, Lakewood, CO) and ACD-A

(Maco Pharma, Tourcoing, France). Purification of monocytes was performed by counter current elutriation using the J6 MC centrifuge equipped with the JE 5.0 rotor (Beckman, Roissy, France). Briefly, the rotor was sterilized by autoclaving (20 min, 120 °C) and primed by a solution containing human albumin (Bruneau, Boulogne-Billancourt, France). The initial cell loading rate was set to 40 mL/min (initial rotor speed, 2000 rpm/min at 4 °C) and elutriation was performed by stepwise increments of the flow rate. Size and concentration of elutriated cells were closely monitored by flow cytometry using an APICS XI flow cytometer (Coulter, Villepinte, France). At a flow rate of 45 to 55 mL/min, lymphocytes were elutriated. The flow was progressively slowed to 30 mL/min to reduce the dilution of the elutriated sample. Monocytes were elutriated by progressively decreasing the rotor speed to 1400 rpm and collected on ice. Elutriation was stopped when polynuclear neutrophils were above 3%. Cell viability assessed by trypan blue exclusion test was always above 95% and monocyte purity determined by CD14 expression was > 90%.

Culture of elutriated monocytes

Highly purified monocytes were cultured in Teflon bags under adherence-free conditions (Tech Gen, Les Ulis, France). Procedures for the generation of immature DC (iDC) have been described in details elsewhere (20). Briefly, monocytes (10^6 /mL) were cultured for a minimum of 5 days in RPMI 1640 (Gibco-BRL, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France), 5% human pooled AB serum (Valbiotech, Paris, France), 400 U/mL granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (Schering Plough, Levallois-Perret, France) and 500 U/mL interleukin-4 (IL-4) (R&D Systems, Abingdon, UK). A minimal additional 1-day of culture was carried out in the presence of 33% monocyte-conditioned medium (MCM) (22), or of the following combinations for further generation of mature DC (mDC): tumor necrosis factor- α (TNF- α) (1000 U/mL (R&D Systems)) or prostaglandin E₂ (PGE₂) (3 μ g/mL (Sigma)) *plus* interleukin-1 (IL-1) (10 ng/mL (R&D Systems)), TNF- α *plus* PGE₂ and TNF- α *plus* PGE₂ *plus* IL-1.

Immunophenotyping

For membrane staining, monocyte-derived DC (2×10^5) were incubated for 30 min at 4 °C in phosphate-buffered saline with the phycoerythrin-labeled specific monoclonal antibody to CD83 (Beckman Coulter, Villepinte, France). Isotype-matched control antibody was purchased from Immunotech (Marseille, France). The quantitation of CD83 membrane expression has been performed as previously described for the CD1a marker (20). Flow cytometric analyses were performed using an Epics XL flow cytometer (Beckman Coulter).

Time-lapse videomicroscopy

Time-lapse videomicroscopy was automatically recorded with an inverted IX-70 microscope equipped with a Enkab 901 microscope incubator (Olympus, Rungis, France) and a C4742-95 CCD video camera (Hamamatsu Photonics, Massy, France). Frames were numerized and analyzed using the HIPIC 5.01 program (Hamamatsu Photonics).

Migration assay

The Transwell™ system (Cat N° 3422, Costar, Cambridge, UK) was used for migration and chemotaxis assays. To evaluate active migration, 6.5 mm polycarbonate filters of 8- μ m pore size were coated with 50 μ g Matrigel. After overnight incubation at 37 °C in an humidified atmosphere, the bottom compartment of the chambers was filled with 0.6 mL of UltraCULTURE medium, in absence of serum or any chemoattractants (BioWhittaker, Verviers, Belgium). Monocyte-derived DC (4×10^5) were suspended in 0.2 mL medium, and added to the upper compartment. The chambers were incubated for 3 hr at 37 °C, in 5% CO₂, and then the contents of the lower compartments were collected. Results are expressed as the total number of migrating cells per well. In order to inhibit MMP during the active migration assay, monocyte-derived DC were incubated with Batimastat (1 μ M). At this concentration, cell viability was not affected as assessed by the trypan blue staining. For passive migration, Transwell™

filters were not coated with Matrigel and subsequent procedure was the same as for active migration assay. To study chemoattractant effects, macrophage inflammatory protein-3 α (MIP-3 α) 100 ng/mL and -3 β (MIP-3 β) 300 ng/mL (R&D Systems) were added to the lower compartment of Transwell units.

Gelatin zymography

Gelatinolytic activities in conditioned media, cellular (24) and membrane extracts (25) were performed according to Heussen and Dowdle (26). An appropriate volume of conditioned media, cellular and membrane extract corresponding to 10^4 cells was applied to 10% SDS-polyacrylamide gels containing 1 mg/mL gelatin (Sigma). After electrophoresis, SDS was removed from the gel by two incubations in 2% Triton X-100 for 30 min. After overnight incubation at 37 °C in TCS buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.2 M NaCl and 5 mM CaCl₂), the gels were stained for 90 min with Coomassie Blue. Proteolytic activities were evidenced as clear bands against the blue background of stained gelatin. HT-1080 fibrosarcoma cells treated with 10 ng/mL of 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate was used as an internal control for MMP expression. In some experiments, 10 mM EDTA was added to the TCS buffer in order to assess the MMP nature of the gelatinolytic activities.

Quantification of MMP and TIMP

proMMP-2, proMMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 proteins were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Biotrak™ RPN 2617, RPN 2614, RPN 2611 and RPN 2618 Amersham Pharmacia, Orsay, France) and active MMP-9 was measured in selected studies using an MMP-9 activity assay system (Biotrak™, RPN 2634) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Significance of results was determined by the paired Student *t*-test. The level of significance chosen was 95% ($P < 0.05$).

Results

Optimization of DC final maturation

CD14⁺ blood monocytes were developed into DC under culture conditions in compliance with the code of GMP as described in *Materials and Methods*. Cells were first differentiated into iDC within 6 days in the presence of GM-CSF *plus* IL-4. Then cultured cells were activated using various maturation inducers (reviewed in Ref. 2) and their degree of maturation was investigated by CD83 membrane expression, a marker highly restricted to functionally mDC (27). As shown in Fig. 1, CD83 was virtually not expressed in iDC but MCM, TNF- α *plus* IL-1 or PGE₂ *plus* IL-1 led to CD83 expression in the majority of cells with a fluorescence intensity increased by 10- to 17-fold compared to control iDC. Based on intensity of marker expression/cell, mature cells appeared to be heterogeneous since two cell populations are clearly identified specially after MCM and PGE₂ *plus* IL-1 treatment (Fig. 1). The combination of TNF- α *plus* PGE₂ dramatically increased CD83 expression resulting in the appearance of an homogeneous cell population expressing a high CD83 antigen density. Indeed, 99% of cells were CD83⁺ with a fluorescence intensity 110-fold higher than that of iDC and further quantification of cell surface CD83 molecules revealed that mDC expressed 400,000 antigen sites/cell as compared to 12,500 in control cells (data not shown). Addition of IL-1 to this combination

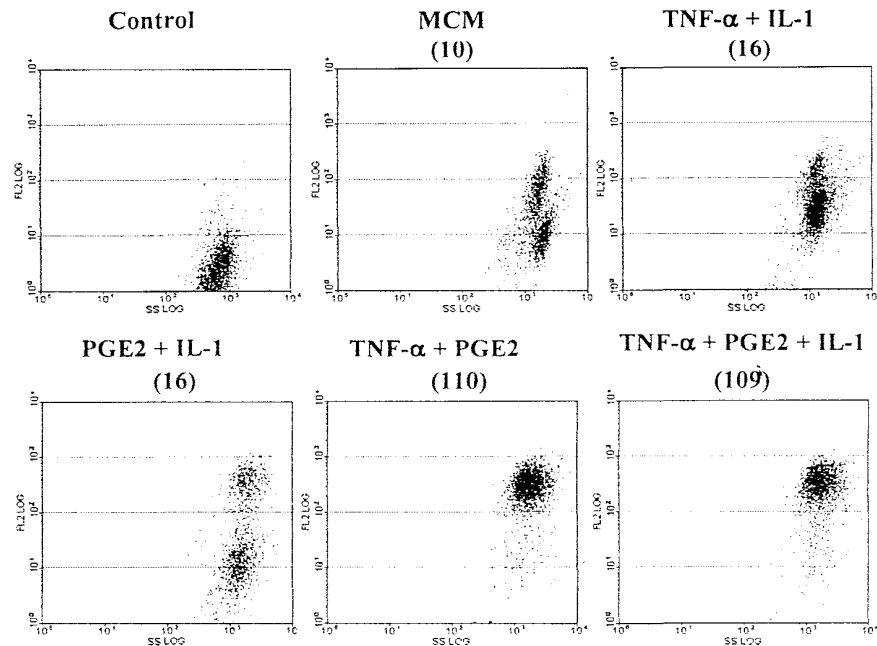


Figure 1. Effect of various maturation inducers on CD83⁺ expression by monocyte-derived DC. Monocytes were cultured with GM-CSF *plus* IL-4 for 6 days, then treated or not (control) with the indicated maturation inducers for 24 hr. Values in parentheses indicate the fold increase in CD83⁺ fluorescence intensity compared to control cells. Similar results were obtained in two other experiments.

did not contribute to enhance CD83 expression. DC matured in these optimized conditions were further found to be highly efficient in presentation of antigen and induction of peptide-specific CTL response¹.

For further examination of the kinetics of the maturation process, we have determined the minimal culture time with GM-CSF *plus* IL-4 necessary for the optimal maturation of DC. In this respect, TNF- α *plus* PGE₂ were added after 1, 2, 3, 4 and 5 days (Fig. 2) and CD83 membrane expression was systematically measured. The CD83 marker, detected on virtually all DC at day 3, was optimally expressed at day 5 with a 107-fold increase of fluorescence intensity compared to control cells. Thus, the combination of TNF- α *plus* PGE₂ added as early as day 5 proved to be the most effective inducer of terminal maturation in our culture system, therefore subsequent experiments were performed in these conditions.

¹ Millard, A. L., Ittelet, D., Schooneman, F. and Bernard J. Dendritic cell KLH loading requirements for efficient CD4⁺ T cell priming presentation and help to peptide-specific cytotoxic T cell response, in view of potential use in cancer vaccines. Vaccine, submitted.

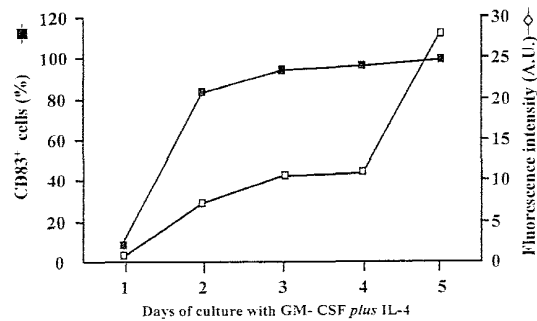


Figure 2. Kinetics of CD83 surface expression according to the time of treatment with GM-CSF *plus* IL-4. Monocytes were cultured with GM-CSF *plus* IL-4 for various incubation times, then treated with TNF- α *plus* PGE₂ for 24 hr. Percentage of CD83⁺ cells and specific mean fluorescence intensities are plotted. Results of one experiment representative of two.

Motility of maturing DC

It is known that the maturation stage of DC plays an important role in their trafficking since upon activation by microbial products, inflammatory cytokines or immune stimuli, DC migrate as veiled cells to the T cells areas of lymph nodes (reviewed in Ref. 28). Because iDC can be optimally matured by TNF- α *plus* PGE₂, we addressed the question of whether this cocktail of pro-inflammatory cytokines could modify the DC migratory properties. In this respect, videomicroscopy analysis of the motility events of DC shows that in contrast to iDC displaying no any active motility, early maturing DC exhibited considerable locomotion (Fig. 3A). In addition, they rapidly formed spontaneous cell clusters that increased in size with time, to reach a maximum at day 6 corresponding to the highest intensity in CD83 expression (Fig. 3B–C). As time-lapse videomicroscopy is not well suited for examination of a large number of specimens and cannot provide quantitative data regarding population of cells, we further used a filter-based assay for scoring DC migration.

Comparative iDC and mDC pattern of migration

The migration ability of iDC was compared with that of mDC in a cohort of 15 healthy donors using polycarbonate filters coated or not with Matrigel, allowing for quantification of active and passive migration. As shown in Figure 4, iDC displayed a very low and homogeneous migratory activity with or without Matrigel. In contrast mDC proved highly mobile since their mean migration value was 8-fold higher than that of iDC with Matrigel and 15-fold without. It is noteworthy that spontaneous mDC migratory response varied dramatically according to individuals since the number of migrating cells per well ranged from 17×10^3 cells for the lowest responder to 155×10^3 cells for the highest one.

In recent *in vitro* studies, chemokines have been shown to play a critical role in the passive migration of monocyte-derived DC generated from adherent blood mononuclear

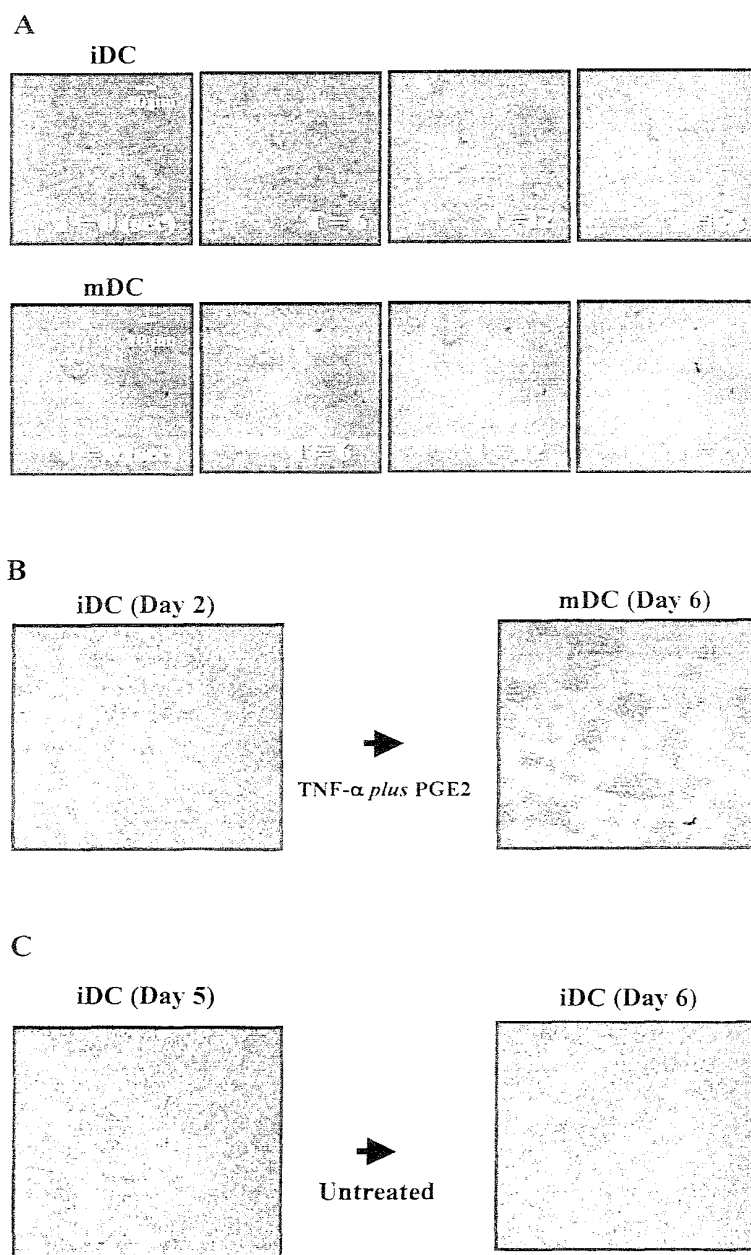


Figure 3. Individual cell locomotion and formation of cell aggregates during DC final maturation. Time-lapse videomicroscopy was used to analyse the spontaneous migration of both individual iDC and mDC (A), and the formation of aggregates during the maturation process induced by TNF- α plus PGE₂ (B). iDC as control cells are shown in (C). Similar results were obtained in two other experiments.

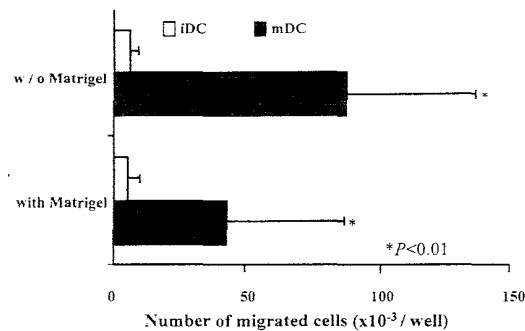


Figure 4. Comparative iDC and mDC pattern of migration. Assays were performed in TranswellTM systems with or without Matrigel as described in *Material and Methods*. Results are expressed as the number of migrated cells per well and represent the mean response obtained for 15 healthy donors. Intra-individual variation of the migration capacity has been tested for three donors and never exceeded 8%.

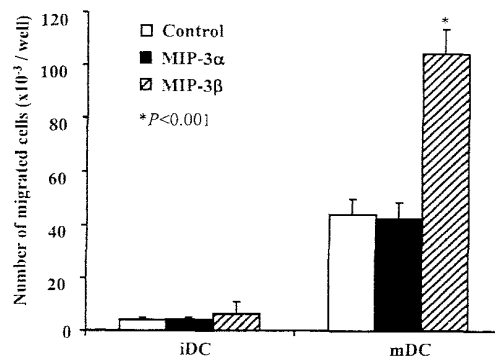


Figure 5. Chemotactic response of iDC and mDC to human MIP-3α and MIP-3β chemokines. Migration assays were performed in TranswellTM systems using Matrigel with MIP-3α (100 ng/mL) or MIP-3β (300 ng/mL) in the bottom chamber as described in *Materials and Methods*. The data presented here are expressed as the number of migrated cells per well after 3 hr incubation at 37 °C and are the average of three independent experiments realised in triplicate.

cells (reviewed in Ref. 29). Here we investigated the effects of MIP-3β and MIP-3α on active DC migration through Matrigel. Figure 5 shows that MIP-3β enhanced mDC active migration by 3-fold and maintained iDC migration at its basal level whereas MIP-3α exhibited no chemotactic effect on both cell types. As previously reported (19, 30, 31), these findings indicate that MIP-3β is a selective and extremely potent inducer of mDC migration *in vitro*. Moreover, to our knowledge, they demonstrate for the first time the ability of MIP-3β to stimulate mDC trans-Matrigel migration. It stems from these data that supplementing culture media with additional chemokines such as MIP-3β for the generation of DC *in vitro*, may enhance the APC functions of these DC and subsequently increase the potency of the DC-based vaccines.

Table 1. Effect of Batimastat on DC migration

	Number of migrating cells ($\times 10^{-3}$ /well)			
	w/o Matrigel		with Matrigel*	
	iDC	mDC	iDC	mDC
Control	31.30 $\pm$ 8.35 ^a	155.70 $\pm$ 31.80	22.06 $\pm$ 5.96	128.02 $\pm$ 25.85
Batimastat	29.50 $\pm$ 10.15 (6.4%) ^b	148.30 $\pm$ 28.10 (4.8%)	10.60 $\pm$ 1.06 (52%)	41.12 $\pm$ 5.72 (68%)

^a Cells were incubated in the presence or absence of Batimastat (1 μ M) in migration chambers for 3 hr at 37 °C and the number of migrating cells per well was estimated as indicated in *Materials and Methods*. Data are the mean value $\pm$ standard deviation from experiments performed in triplicate.

^b Values given in parentheses indicate the percentage of inhibition of cell migration induced by Batimastat.

* $P < 0.001$ by comparison between Batimastat-treated and control cells

Effect of Batimastat on DC migration

Migration across Matrigel by mDC and, to a much lesser extent, by iDC suggests that these cells overcome matrix extracellular resistance by secreting matrix-degrading enzymes, essentially MMP. To test this possibility, we examined the effect of Batimastat, a well known synthetic MMP inhibitor (32), added into the upper compartment of the chamber during the migration assay. As shown in Table 1, Batimastat inhibited the active migration of mDC through Matrigel by 68% but did not affect passive crossing. These results demonstrate that monocyte-derived DC migration strongly depends on local proteolysis associated with MMP activity.

Expression of MMP and TIMP

MMP-2 and -9 appear as key proteases contributing to matrix remodeling, an important prerequisite for the cells to migrate through tissues (33, 34). They are synthesized as the inactive forms proMMP-2 and -9 that must be cleaved to yield active enzymes (35). Thus, expression of these enzymes was analyzed by gelatin zymography both in conditioned media and membrane extracts and compared to that of HT-1080 human fibrosarcoma cells used as controls. As shown in Figure 6A, aliquots of 24 h conditioned media of both mDC and iDC exhibited a major band corresponding to proMMP-9 and a faint band corresponding to proMMP-2. These findings were quantified by ELISA showing that compared to proMMP-9, both cells secreted low amounts of proMMP-2. Interestingly, further zymographic studies of mDC membrane extracts revealed that i) proMMP-9 expression was stimulated during the maturation process and ii) MMP-9 active form was found to be present in mDC and not in iDC (Fig. 6B). Quantification of this active form in cell lysates using the MMP-9 activity assay system confirmed elevated MMP-9 levels in mDC ($6.0 \text{ ng} \pm 1.3/10^6$ cells) and very low level in iDC

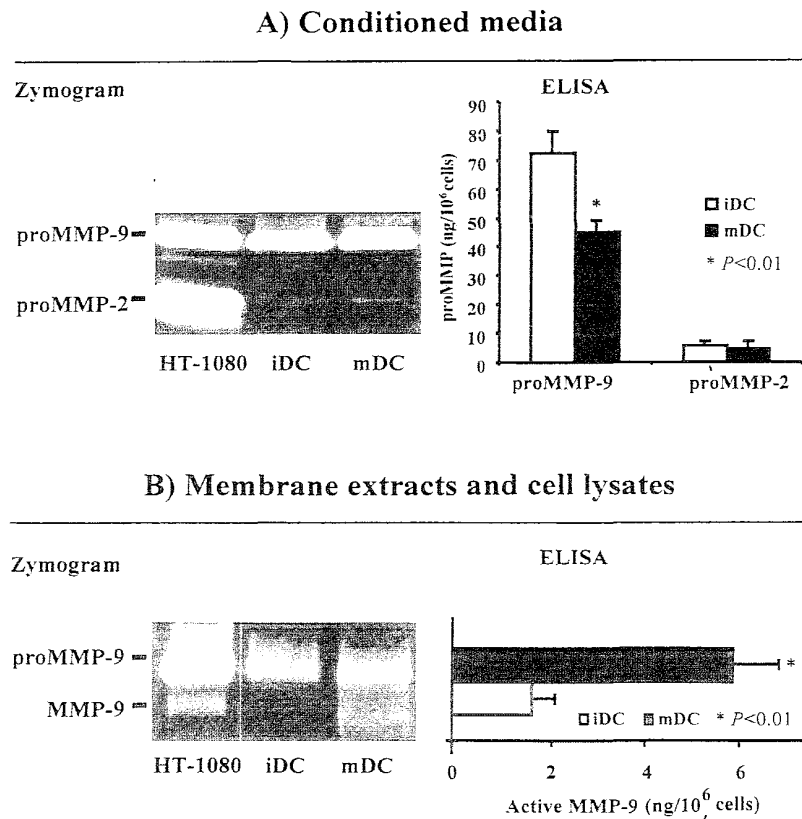


Figure 6. Expression of MMP by DC and presence of MMP-9 active form in mDC. Conditioned media (A) and membrane extracts (B) of iDC and mDC were subjected to gelatin zymography and proMMP-9 and proMMP-2 expression were quantified by ELISA (A) as described in *Materials and Methods*. For zymography, conditioned medium of HT-1080 cells was used as a positive control for proMMP-9, proMMP-2, MMP-9 and MMP-2 expression. (A and B). MMP-9 expression was quantified in cell lysates (B) using a high sensitivity ELISA kit as described in *Materials and Methods*. The data presented here are average of three independent experiments.

Table 2. Paired evaluation of both DC motility and MMP-9 production in the same individuals

Donors	Number of migrating cells/well ^a	MMP-9 production (A.U) ^b
A	18480	253290
B	41120	329470
C	91000	647250

^a Assays were performed in Transwell™ systems with Matrigel as described in *Materials and Methods*.

^b MMP-9 production in the membrane extracts was analyzed by gelatin zymography as described in *Materials and Methods*. Intensity of the bands was quantified using a multi-analyst software (Bio-Rad, Belgium) and expressed as arbitrary units (A.U).

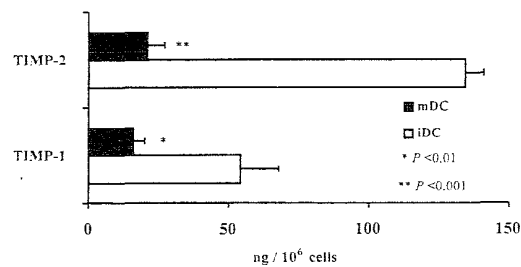


Figure 7. Quantitative analysis of TIMP-1 and TIMP-2 in iDC and mDC. Levels of TIMP-1 and TIMP-2 in conditioned media of iDC and mDC were determined using ELISA as described in *Materials and Methods*. The data presented here are average of three independent experiments.

($1.7 \text{ ng} \pm 0.3/10^6$ cells) (Fig. 6B). In addition, MMP-9 production has been quantified in mDC generated from 3 individuals that were selected for their low, moderate and high migrating capacity. Paired data presented in Table 2 suggest that the higher the proMMP-9 expression, the more important was the migrating capacity.

Since MMP activities are mainly down-regulated by the expression of TIMP whose primary function is to inhibit the degradative activities of MMP (22), we further examined the expression of TIMP-1 and TIMP-2, specific inhibitors of proMMP-9 and proMMP-2, respectively. As depicted in Figure 7, we found that iDC constitutively produced large amounts of both MMP inhibitors whereas their expression was significantly down-modulated in mDC (to 70% and 85% of that detected in iDC). We conclude that down-regulated expression of TIMP-1 and concomitant up-regulation of active MMP-9 in mDC correlate with their high migration potential as evidenced by experiments we carried out on cell dynamics.

Effect of chemokines on MMP-9 and TIMP-1 expression

Having shown that mDC migration across Matrigel depends upon the production of MMP and that it is strongly increased by MIP-3 β and not by MIP-3 α (Figs. 5 and 6), we further investigated the effects of these chemokines on MMP-9 and TIMP-1 expression. Gelatin zymography of mDC membrane extracts revealed that proMMP-9 and MMP-9 expression is stimulated by MIP-3 β whereas MIP-3 α had no effect on both expression (Fig. 8A). These findings were confirmed in cell lysates by using the MMP-9 activity assay system which indicates that MIP-3 β increased MMP-9 production by 40%. As depicted in Figure 8B, the same type of experiments performed with iDC, revealed that MIP-3 α and MIP-3 β did not modify expression of latent and active form of MMP. In addition, TIMP-1 expression was affected neither by MIP-3 α nor by MIP-3 β (data not shown) in both cell types. Taken together, these data indicate that concomitant induction of MMP-9 by MIP-3 β and stability of TIMP-1, would explain the increased migration of mDC in response to this chemokine.

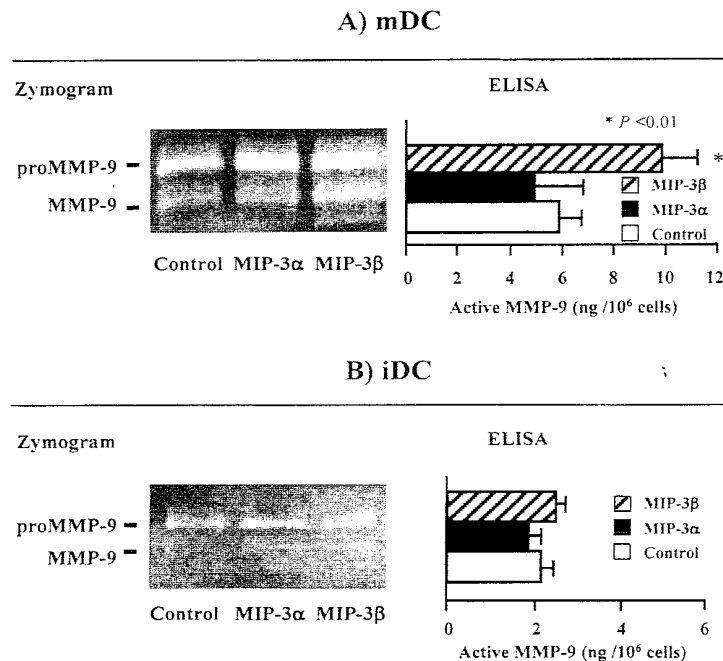


Figure 8. Effect of chemokines on MMP-9 expression in DC. Zymographic analysis of membrane extracts and quantification of the MMP-9 active form in cell lysates were performed in mDC (A) and iDC (B) after 6 hr incubation with MIP-3α (100 ng/mL) and MIP-3β (300 ng/mL). Expression of the MMP-9 was quantified by the MMP-9 activity assay as described in *Materials and Methods*. Results of one experiment representative of 4 healthy donors.

Discussion

In this study, we have generated in conformity with GMP guidelines large numbers of well-defined DC by a one step and reproducible method which includes: collection of mononuclear cells by apheresis, separation of monocytes by elutriation, culture of monocytes in sealed Teflon bags with GM-CSF *plus* IL-4 followed by maturation, and avoidance of fetal calf serum. Thus using this clinically relevant culture system, we further dissected the intricate regulation of trafficking of monocyte-derived DC as a function of their developmental stage. We found that optimally matured CD83⁺ DC are highly migrating cells when compared to their immature counterpart. We extend these data in several regards, the most important ones being that 1) DC migration capacity associated with maturation process is dramatically variable according to the donors and this variability may be of clinical relevance; 2) DC migration involves both constitutive production of the matrix-degrading enzyme MMP-9 in its active form and low levels of TIMP-1, the specific physiological inhibitor of MMP-9; and 3) increased migratory responsiveness of DC to MIP-3β correlated with up-regulation of active MMP-9.

Maturation of DC is a complex process linked with their migration from peripheral tissue to secondary lymphoid organs, and this process is closely associated with morphological, phenotypical and functional changes that culminate in the complete transition from antigen-capturing cell to APC. In our study, CD83 expression was used to characterize matured DC and further evaluate their degree of maturation by quantification of the membrane CD83 antigen density. The CD83 molecule has been identified by ZHOU et al. (27) as a selective marker for fully mature immunostimulatory DC (36). Other candidate maturation markers have been proposed such as DC-LAMP (37), integrin CD49d (38) and IL-12 (5, 39, 40); but since CD83 has been identified as an adhesion receptor (41), it appears to play an important role in the induction and regulation of immune responses and consequently represents a pertinent tool to evaluate the potency of maturation stimuli. Here, we found that among the combinations tested (MCM, TNF- α plus IL-1, TNF- α plus PGE₂, PGE₂ plus IL-1, TNF- α plus PGE₂ plus IL-1) only TNF- α plus PGE₂ induce optimal DC maturation since most of the treated cells were CD83⁺ and exhibited a mean fluorescence intensity 110-fold higher than that of iDC. We conclude that this combination of TNF- α plus PGE₂, in conjunction with the specific culture conditions used in this study, appears to be the most powerful inducer of CD83 reported to date, as compared to the other maturation signals tested by others (36, 39, 42–47). This optimal degree of maturation was further confirmed by the expression of other phenotypical markers such as CD14, CD80, CD86 and HLA-DR, as we described elsewhere².

Among several parameters which may significantly affect DC vaccination efficacy, cell maturation stage and migration capacities appear as particularly relevant (48, 49). We found that iDC did not significantly migrate whereas mDC proved to be highly mobile cells able to cross the Matrigel barrier, a matrix resembling natural basement membrane in composition, structure and fonction (50). This migratory behavior involved a fraction of the mDC population and varied according to the donors. Such a marked variation of DC characteristics according to the different individuals tested has already been described by us for CD1a expression (20) and by others for various membrane markers (51). The higher motility of mDC observed in this study contrast with the results of others which showed that compared to immature DC, mature DC did not significantly migrate (19, 52, 53). Most likely, this discrepancy is due to the nature of the experimental protocols used by these groups to generate DC, specially adherent conditions for monocyte isolation, presence of fetal calf serum in DC culture and non optimized conditions for DC maturation. Indeed, as a result of the growing interest in using cultured DC suitable for clinical use, authors have carefully compared DC generated in our clinical-grade conditions to DC produced in conventional tissue culture flasks (54). In this closed system, DC were found to be superior in terms of yield, viability and function which lead us to hypothesise that our bag DC may also exhibit better migration capacity.

In vivo, mature DC have been shown to be the most effective inducers of T cell immunity in mice (55, 56) and humans (12, 48, 57). These studies support the use of mature DC as cancer vaccines where the goal is efficient differentiation of CD8⁺ T cells into cytotoxic effector cells (58, 59). *In vitro*, the requirement of mature DC for efficient activa-

² Millard, A. L., Mertes, P. M., Ittelet, D., Villard, F., Jeannesson, P. and Bernard J. Butyrate affects differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. Clin Exp Immunol., manuscript in revision.

tion of CD8⁺ T cells has been recently demonstrated in the influenza A virus system, since mature DC but not immature DC elicit interferon- γ production from CD8⁺ effector cells, expand and differentiate CTL precursors into cytotoxic effectors and induce CTL directly from purified CD8⁺ T cells without requiring CD4⁺ T cells (48). In light of our present data, it is conceivable that, *in vivo*, highly migrating mature DC will be the best candidate to favor contact multiplicity with specific T cells thus leading to a more potent immune response. Consequently, in cancer patients, in order to establish a possible relationship between DC migratory capacity and immunological response, we propose to systematically check the migratory capacity of each DC population before injection.

We show that migrating process through the model of reconstituted basement membrane was significantly reduced by the synthetic MMP inhibitor Batimastat (32), suggesting that MMP play a role in DC cell migration as recently reported (60,61). In accordance with this result, we demonstrate that mDC predominantly express the MMP-9 membrane active form and weakly the MMP-9 physiological inhibitor TIMP-1 whereas iDC exhibit only traces of active MMP-9 and high levels of TIMP-1. Such a modification of the MMP/TIMP balance, which is associated with DC maturation, has been recently reported but only for the inactive form of proMMP-9 and using monocyte-derived DC that had not been prepared under GMP conditions (62). In addition, our study represents the first to provide evidence that substantial amounts of matrix metalloprotease MMP-9 can be localized in a proteolytically active form on the cell surface of mature monocyte-derived DC, strongly arguing for their high migrating behavior. Indeed, it is now well established that the cell migration into extracellular matrix is related rather to the presence of active form of MMP on the cell surface than to the release of proMMP *per se* (63-65). However, the involvement of other migration strategies such as contact guidance recently described for Langerhans cells (66) cannot be excluded. In this process independent of matrix remodeling, it is proposed that the orientation of collagen fibers directs the paths of migrating Langerhans cells without any fiber destruction.

The chemokine system plays a crucial role in immune cell trafficking and one of the most interesting recent developments in chemokine biology has been the association between chemokines and DC (reviewed in Ref. 67). Here, in presence of Matrigel, we found that MIP-3 β is highly active on mDC migration and directly stimulates the production of active MMP-9 in these cells. This effect of a chemokine, which is expressed in T cell areas of lymph nodes and allows mature DC to migrate to these sites (68), has not yet been reported for the regulation of a MMP active form; recent studies in other categories of human leukocytes have only demonstrated that chemokines stimulate the latent forms of MMP (69, 70). In addition, we provide evidence that MIP-3 β does not modify TIMP-1 production in mDC. Such results thus indicate that this chemokine controls the MMP/TIMP balance and consequently DC migration by exclusively targeting MMP.

Since clinical trials exploiting the efficacy of DC-based vaccines are under way, the need for a well defined and reproducible vaccination strategy becomes evident. Current research focuses on optimization of DC source, choice of antigen, antigen loading, mode of injection, as well as immuno-monitoring. Our findings therefore lead us to propose to include a systematic checking of the DC migratory capacity using the Boyden chamber in DC quality control. This versatile appliance will permit a rapid and reproducible screening of numerous cell samples in presence of selected extracellular matrix components and in response to MIP-3 β chemokine.

Acknowledgements

This work was supported by the Ligue Nationale contre le Cancer, Comités de l'Aisne et de la Marne and Crédit Agricole du Nord-Est. PATRICK HOLLENDER is a recipient of a fellowship from Région Champagne-Ardenne. We thank Dr AGNÈS NOËL (University of Liège, Belgium) for kindly providing Matrigel and Batimastat. We also acknowledge SYLVIE RICORD for her lexical assistance.

References

1. CELLA, M., F. SALLUSTO, and A. LANZAVECCHIA. 1997. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 10.
2. BANCHEREAU, J., F. BRIERE, C. CAUX, J. DAVOUST, S. LEBECQUE, Y. J. LIU, B. PULENDRAN, and K. PALUCKA. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767.
3. LANZAVECCHIA, A., and F. SALLUSTO. 2001. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 106: 263.
4. SOGN, J. A. 1998. Tumor immunology: the glass is half full. *Immunity* 9: 757.
5. FLAMAND, V., T. SORNASSE, K. THIELEMANS, C. DEMANET, M. BAKKUS, H. BAZIN, F. TIELEMANS, O. LEO, J. URBAIN, and M. MOSER. 1994. Murine dendritic cells pulsed in vitro with tumor antigen induce tumor resistance in vivo. *Eur. J. Immunol.* 24: 605.
6. MAYORDOMO, J. I., T. ZORINA, W. J. STORKUS, L. ZITVOGEL, C. CELLUZZI, L. D. FALO, C. J. MELIEF, S. T. ILDSJAD, W. M. KAST, and A. B. DELEO et al. 1995. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat. Med.* 1: 1297.
7. PAGLIA, P., C. CHIODONI, M. RODOLFO, and M. P. COLOMBO. 1996. Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J. Exp. Med.* 183: 317.
8. ZITVOGEL, L., J. I. MAYORDOMO, T. TJANDRAWAN, A. B. DELEO, M. R. CLARKE, M. T. LOTZE, and W. J. STORKUS. 1996. Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J. Exp. Med.* 183: 87.
9. CAUX, C., B. VANBERVLIET, C. MASSACRIER, C. DEZUTTER-DAMBUYANT, B. DE SAINT-VIS, C. JACQUET, K. YONEDA, S. IMAMURA, D. SCHMITT, and J. BANCHEREAU. 1996. CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J. Exp. Med.* 184: 695.
10. SALLUSTO, F., and A. LANZAVECCHIA. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179: 1109.
11. ZHOU, L. J., and T. F. TEDDER. 1996. CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2588.
12. ROMANI, N., S. GRUNER, D. BRANG, E. KAMPGEN, A. LENZ, B. TROCKENBACHER, G. KONWALINKA, P. O. FRITSCH, R. M. STEINMAN, and G. SCHULER. 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 180: 83.
13. DHODAPKAR, M. V., R. M. STEINMAN, M. SAPP, H. DESAI, C. FOSSELLA, J. KRASOVSKY, S. M. DONAHOE, P. R. DUNBAR, V. CERUNDOLO, D. F. NIXON, and N. BHARDWAJ. 1999. Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J. Clin. Invest.* 104: 173.
14. ANDERSEN, M. H., P. KEIKAVOUSSI, E. B. BROCKER, B. SCHULER-THURNER, M. JONASSEN, I. SONDERGAARD, P. T. STRATEN, J. C. BECKER, and E. KAMPGEN. 2001. Induction of systemic CTL responses in melanoma patients by dendritic cell vaccination: cessation of CTL responses is associated with disease progression. *Int. J. Cancer* 94: 820.
15. SCHNURR, M., P. GALAMBOS, C. SCHOLZ, F. THEN, M. DAUER, S. ENDRES, and A. EIGLER. 2001. Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an in vitro model for the assessment of tumor vaccines. *Cancer Res.* 61: 6445.

16. FRIEDL, P., K. S. ZANKER, and E. B. BROCKER. 1998. Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc. Res. Tech.* **43**: 369.
17. JANCIC, C., H. E. CHULUYAN, A. MORELLI, A. LARREGINA, E. KOLKOWSKI, M. SARACCO, M. BARBOZA, W. S. LEIVA, and L. FAINBOIM. 1998. Interactions of dendritic cells with fibronectin and endothelial cells. *Immunology* **95**: 283.
18. AMMON, C., S. P. MEYER, L. SCHWARZFISCHER, S. W. KRAUSE, R. ANDRESEN, and M. KREUTZ. 2000. Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* **100**: 364.
19. LIN, C. L., R. M. SURI, R. A. RAHDON, J. M. AUSTYN, and J. A. ROAKE. 1998. Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. *Eur. J. Immunol.* **28**: 4114.
20. BERNARD, J., D. ITTELET, A. CHRISTOPH, G. POTRON, J. C. ADJIZIAN, S. KOCHMAN, and M. LOPEZ. 1998. Adherent-free generation of functional dendritic cells from purified blood monocytes in view of potential clinical use. *Hematol. Cell. Ther.* **40**: 17.
21. NOEL, A., C. GILLES, K. BAJOU, L. DEVEY, F. KEBERS, J. M. LEWALLE, E. MAQUOI, C. MUNAUT, A. REMACLE, and J. M. FOIDART. 1997. Emerging roles for proteinases in cancer. *Invasion Metastasis* **17**: 221.
22. BREW, K., D. DINAKARPANDIAN, and H. NAGASE. 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**: 267.
23. BENDER, A., M. SAPP, G. SCHULER, R. M. STEINMAN, and N. BHARDWAJ. 1996. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J. Immunol. Methods* **196**: 121.
24. DEVEY, L., P. HOLLENDER, C. MUNAUT, A. COLIGE, R. GARNOTEL, J. M. FOIDART, A. NOEL, and P. JEANNESSON. 2002. Matrix and serine protease expression during leukemic cell differentiation induced by a clacino mycin and all-trans-retinoic acid. *Biochem. Pharmacol.* **63**: 179.
25. GRAHAM, J. M. 1993. Isolation of membranes from tissue culture cells. *Methods Mol. Biol.* **19**: 97.
26. HEUSSEN, C., and E. B. DOWDIE. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* **102**: 196.
27. ZHOU, L. J., and T. E. TEDDER. 1995. A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83+ blood dendritic cells. *Blood* **86**: 3295.
28. SALLUSTO, F., and A. LANZAVECCHIA. 1999. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J. Exp. Med.* **189**: 611.
29. GALE, L. M., and S. R. MCCOLL. 1999. Chemokines: extracellular messengers for all occasions? *Bioessays* **21**: 17.
30. DIEU, M. C., B. VANBERVLIET, A. VICARI, J. M. BRIDON, E. OLDHAM, S. AIT-YAHIA, F. BRIERE, A. ZLOTNIK, S. LEBECQUE, and C. CAUX. 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med.* **188**: 373.
31. KELLERMAN, S. A., S. HUDAK, E. R. OLDHAM, Y. J. LIU, and L. M. MCEVOY. 1999. The CC chemokine receptor-7 ligands 6CKine and macrophage inflammatory protein-3 beta are potent chemoattractants for in vitro- and in vivo-derived dendritic cells. *J. Immunol.* **162**: 3859.
32. BOTOS, I., L. SCAPOZZA, D. ZHANG, L. A. LIOTTA, and E. F. MEYER. 1996. Batimastat, a potent matrix metalloproteinase inhibitor, exhibits an unexpected mode of binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 2749.
33. FRIEDL, P., and E. B. BROCKER. 2000. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**: 41.
34. OPDENAKKER, G., P. E. VAN DEN STEEN, and J. VAN DAMME. 2001. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol.* **22**: 571.
35. MURPHY, G., H. STANTON, S. COWELL, G. BUTLER, V. KNAUPER, S. ATKINSON, and J. GAVRILOVIC. 1999. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS* **107**: 38.
36. KAMMERER, U., M. SCHOPPET, A. D. McLELLAN, M. KAPP, H. I. HUPPERTZ, E. KAMPGEN, and J. DIETL. 2000. Human decidua contains potent immunostimulatory CD83(+) dendritic cells. *Am. J. Pathol.* **157**: 159.

37. DE SAINT-VIS, B., J. VINCENT, S. VANDENABEELE, B. VANBERVLIET, J. J. PIN, S. AIT-YAHIA, S. PATEL, M. G. MATTEI, J. BANCHEREAU, S. ZURAWSKI, J. DAVOUST, C. CAUX, and S. LEBECQUE. 1998. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* 9: 325.
38. PUIG-KROGER, A., F. SANZ-RODRIGUEZ, N. LONGO, P. SANCHEZ-MATEOS, L. BOTELLA, J. TEIXIDO, C. BERNABEU, and A. L. CORBI. 2000. Maturation-dependent expression and function of the CD49d integrin on monocyte-derived human dendritic cells. *J. Immunol.* 165: 4338.
39. KALINSKI, P., J. H. SCHUITEMAKER, C. M. HILKENS, M. L. and KAPSENBERG. 1998. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a⁺CD83⁺ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J. Immunol.* 161: 2804.
40. EBNER, S., G. RATZINGER, B. KROSBACHER, M. SCHMUTH, A. WEISS, D. REIDER, R. A. KROCZEK, M. HEROLD, C. HEUFLE, P. FRITSCH, and N. ROMANI. 2001. Production of IL-12 by human monocyte-derived dendritic cells is optimal when the stimulus is given at the onset of maturation, and is further enhanced by IL-4. *J. Immunol.* 166: 633.
41. SCHOLLER, N., M. HAYDEN-LEDBETTER, K. E. HELLSTROM, I. HELLSTROM, and J. A. LEDBETTER. 2001. CD83 is a sialic acid-binding Ig-like lectin (Siglec) adhesion receptor that binds monocytes and a subset of activated CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 166: 3865.
42. THURNHER, M., C. PAPESH, R. RAMONER, G. GASTL, G. BOCK, C. RADMAYR, H. KLOCKER, and G. BARTSCH. 1997. In vitro generation of CD83⁺ human blood dendritic cells for active tumor immunotherapy. *Exp. Hematol.* 25: 232.
43. RIESER, C., C. PAPESH, M. HEROLD, G. BOCK, R. RAMONER, H. KLOCKER, G. BARTSCH, and M. THURNHER. 1998. Differential deactivation of human dendritic cells by endotoxin desensitization: role of tumor necrosis factor- α and prostaglandin E2. *Blood* 91: 3112.
44. VERDIJK, R. M., T. MUTIS, B. ESENDAM, J. KAMP, C. J. MELIEF, A. BRAND, and E. GOULMY. 1999. Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *J. Immunol.* 163: 57.
45. KRUSE, M., O. ROSORIUS, F. KRATZER, D. BEVEC, C. KUHN, A. STEINKASSERER, G. SCHULER, and J. HAUBER. 2000. Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA. *J. Exp. Med.* 191: 1581.
46. REA, D., C. VAN KOOTEN, K. E. VAN MEIJGAARDEN, T. H. OTTENHOFF, C. J. MELIEF, and R. OFFRINGA. 2000. Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10. *Blood* 95: 3162.
47. STEINBRINK, K., L. PARAGNIK, H. JONULEIT, T. TUTING, J. KNOR, and A. H. ENK. 2000. Induction of dendritic cell maturation and modulation of dendritic cell-induced immune responses by prostaglandins. *Arch. Dermatol. Res.* 292: 437.
48. LARSSON, M., D. MESSMER, S. SOMERSAN, J. F. FONTENEAU, S. M. DONAHOE, M. LEE, P. R. DUNBAR, V. CERUNDOLO, I. JULKUNEN, D. F. NIXON, and N. BHARDWAJ. 2000. Requirement of mature dendritic cells for efficient activation of influenza A-specific memory CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 165: 1182.
49. BANCHEREAU, J., B. SCHULER-THURNER, A. K. PALUCKA, and G. SCHULER. 2001. Dendritic cells as vectors for therapy. *Cell* 106: 271.
50. KLEINMAN, H. K., M. L. MCGARVEY, L. A. LIOTTA, P. G. ROBEY, K. TRYGGVASON, and G. R. MARTIN. 1982. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 21: 6188.
51. PIETSCHEMANN, P., P. HAHN, S. KUDLACEK, R. THOMAS, and M. PETERLIK. 2000. Surface markers and transendothelial migration of dendritic cells from elderly subjects. *Exp. Gerontol.* 35: 213.
52. BIANCHI, G., G. D'AMICO, L. VARONE, S. SOZZANI, A. MANTOVANI, and P. ALLAVENA. 2000. In vitro studies on the trafficking of dendritic cells through endothelial cells and extracellular matrix. *Dev. Immunol.* 7: 143.
53. SATO, K., H. KAWASAKI, H. NAGAYAMA, M. ENOMOTO, C. MORIMOTO, K. TADOKORO, T. JUJI, and T. A. TAKAHASHI. 2000. TGF- β 1 reciprocally controls chemotaxis of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells via chemokine receptors. *J. Immunol.* 164: 2285.

54. GUYRE, C. A., J. L. FISHER, M. G. WAUGH, P. K. WALLACE, C. G. TRETTER, M. S. ERNSTOFF, and R. J. BARTH. 2002. Advantages of hydrophobic culture bags over flasks for the generation of monocyte-derived dendritic cells for clinical applications. *J. Immunol. Methods* 262: 85.
55. DE BRUIJN, M. L., D. H. SCHUURHUIS, M. P. VIERBOOM, H. VERMEULEN, K. A. DE COCK, M. F. OOMS, M. E. RESSING, M. TOEBES, K. L. FRANKEN, J. W. DRIJFHOUT, T. H. OTTENHOFF, R. OFFRINGA, and C. J. MELIEF. 1998. Immunization with human papillomavirus type 16 (HPV16) oncoprotein-loaded dendritic cells as well as protein in adjuvant induces MHC class I-restricted protection to HPV16-induced tumor cells. *Cancer Res.* 58: 724.
56. CHIODONI, C., P. PAGLIA, A. STOPPACCIARO, M. RODOLFO, M. PARENZA, and M. P. COLOMBO. 1999. Dendritic cells infiltrating tumors cotransduced with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and CD40 ligand genes take up and present endogenous tumor-associated antigens, and prime naive mice for a cytotoxic T lymphocyte response. *J. Exp. Med.* 190: 125.
57. DHODAPKAR, M. V., J. KRASOVSKY, R. M. STEINMAN, and N. BHARDWAJ. 2000. Mature dendritic cells boost functionally superior CD8(+) T-cell in humans without foreign helper epitopes. *J. Clin. Invest.* 105: R9.
58. ALBERT, M. L., M. JEGATHESAN, and R. B. DARNELL. 2001. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8⁺ T cells. *Nat. Immunol.* 2: 1010.
59. LARSSON, M., D. T. WILKENS, J. F. FONTENEAU, T. J. BEADLE, M. J. MERRITT, R. G. KOST, P. A. HASLETT, S. CU-UVIN, N. BHARDWAJ, D. F. NIXON, and B. L. SHACKLETT. 2002. Amplification of low-frequency antiviral CD8 T cell responses using autologous dendritic cells. *Aids* 16: 171.
60. GRILLET, B., J. DEQUEKER, L. PAEMEN, B. VAN DAMME, and G. OPDENAKKER. 1997. Gelatinase B in chronic synovitis: immunolocalization with a monoclonal antibody. *Br. J. Rheumatol.* 36: 744.
61. BARTHOLOME, E. J., I. VAN AELST, E. KOYEN, R. KISS, F. WILLEMS, M. GOLDMAN, and G. OPDENAKKER. 2001. Human monocyte-derived dendritic cells produce bioactive gelatinase B: inhibition by IFN-beta. *J. Interferon Cytokine Res.* 21: 495.
62. OSMAN, M., M. TORTORELLA, M. LONDEI, and S. QUARATINO. 2002. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases define the migratory characteristics of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* 105: 73.
63. BOURGUIGNON, L. Y., Z. GUNJA-SMITH, N. IIDA, H. B. ZHU, L. J. YOUNG, W. J. MULLER, and R. D. CARDIFF. 1998. CD44v(3,8-10) is involved in cytoskeleton-mediated tumor cell migration and matrix metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells. *J. Cell Physiol.* 176: 206.
64. NAGASE, H. 1998. Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration. *Cell Res* 8: 179.
65. YU, Q., and I. STAMENKOVIC. 2000. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 14: 163.
66. GUNZER, M., E. KAMPGEN, E. B. BROCKER, K. S. ZANKER, and P. FRIEDL. 1997. Migration of dendritic cells in 3D-collagen lattices. Visualisation of dynamic interactions with the substratum and the distribution of surface structures via a novel confocal reflection imaging technique. *Adv. Exp. Med. Biol.* 417: 97.
67. ZLOTNIK, A., and O. YOSHIE. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12: 121.
68. AUSTYN, J. M. 2000. Antigen-presenting cells. Experimental and clinical studies of dendritic cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162: S146.
69. JOHNATTY, R. N., D. D. TAUB, S. P. REEDER, S. M. TURCOVSKI-CORRALES, D. W. COTTAM, T. J. STEPHENSON, and R. C. REES. 1997. Cytokine and chemokine regulation of proMMP-9 and TIMP-1 production by human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* 158: 2327.
70. JANOWSKA-WIECZOREK, A., L. A. MARQUEZ, A. DOBROWSKY, M. Z. RATAJCZAK, and M. L. CABUHAT. 2000. Differential MMP and TIMP production by human marrow and peripheral blood CD34(+) cells in response to chemokines. *Exp. Hematol.* 28: 1274.

PIERRE JEANNESSON, Ph.D., Faculté de Pharmacie, Unité MéDIAN, CNRS UMR 6142, 51 rue Cognacq-Jay, F-51096 Reims Cedex, France, Phone: 333 26 91 35 67, Fax: 333 26 91 37 30, e-mail: pierre.jeannesson@univ-reims.fr

2.2. Résumé :

Nous avons comparé les capacités migratoires de cellules dendritiques immatures (iDC) et matures (mDC) issues par culture *in vitro* de leurs précurseurs sanguins obtenus par aphérèse dans une cohorte de 15 donneurs sains volontaires. Pour chaque sujet, les monocytes prélevés ont été purifiés par élutriation puis différenciés en DC par leur culture en présence de GM-CSF et IL-4. La maturation fonctionnelle a été induite par l'addition combinée de TNF- α et de PGE2. Les capacités migratrices des DC ainsi obtenues ont été évaluées qualitativement par vidéo-microscopie et quantitativement par des tests de migration avec ou sans Matrigel. Parallèlement, le profil d'expression de la MMP-9 et de son inhibiteur physiologique, l'inhibiteur tissulaire de métalloprotéinase-1 (TIMP-1) ont été analysés en fonction du degré de maturité des DC obtenues par variation des conditions de culture.

Résultats : la combinaison de TNF- α et PGE2 permet d'obtenir des mDC homogènes caractérisées par la forte expression de CD83 se traduisant en cytométrie par une densité de ce marqueur augmentée d'un facteur 110 comparativement aux iDC. L'analyse qualitative de migration cellulaire réalisée en vidéo-microscopie montre une grande mobilité des mDC contrairement aux iDC incapables de se déplacer. La quantification du pouvoir migrateur effectuée au moyen de filtres chargés ou non de Matrigel met en évidence une mobilité de 8 à 15 fois plus importante pour les mDC comparativement aux iDC selon la présence ou non de Matrigel.

Enfin, l'analyse phénotypique des mDC montre une forte expression de la forme active de MMP-9 et un faible taux de son inhibiteur TIMP-1, qui pourraient ainsi corrélérer cette haute potentialité migratoire aux capacités invasives du micro-environnement.

Conclusion : ces résultats démontrent que seules les mDC préparées dans des conditions *in vitro* satisfaisant aux règles pour un usage thérapeutique sont douées de capacités invasives et migratoires, lesquelles sont indispensables, après injection dans un organisme, à la mobilité tissulaire et donc à la réalisation des fonctions immunes de ces cellules présentatrices d'Ag hautement spécialisées à l'interface des immunités innée et adaptative.

3. Amplification de l'immunité anti-tumorale par des cellules dendritiques matures allogéniques.

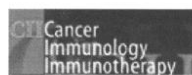
3.1. Selected Allogeneic Dendritic Cells Markedly Enhance Tumor Antigen-Specific T Cell Response.

J.C. Eymard*, A. Gervais*, E. Toulmonde, J. Bernard.

*equal co-first authors

Cancer Immunol Immunother, accepté pour publication

L'objectif de ce travail était d'évaluer la faisabilité d'utilisation de la puissance de l'alloréactivité pour promouvoir une réponse T spécifique concomitante de grande amplitude chez un sujet donné.



Selected Allogeneic Dendritic Cells Markedly Enhance Human Tumor Antigen-Specific T Cell Response In Vitro

Journal:	<i>Cancer Immunology Immunotherapy</i>
Manuscript ID:	CII-08-0248.R1
Manuscript Type:	Original article
Date Submitted by the Author:	31-Oct-2008
Complete List of Authors:	Gervais, Alban; Institut Jean Godinot, Laboratoire de therapie cellulaire EYMARD, Jean-Christophe; Institut Jean Godinot, Laboratoire de therapie cellulaire TOULMONDE, Eric; Etablissement Français du Sang, Site Nord de France BERNARD, Jacky; Institut Jean Godinot, Laboratoire de therapie cellulaire
Keywords:	Alloreactivity, Dendritic cell, Antigen-specific T-cell, Tumor-associated antigens, Adjuvant



***Selected Allogeneic Dendritic Cells Markedly Enhance Human Tumor
Antigen-Specific T Cell Response In Vitro***

Alban Gervais • Jean-Christophe Eymard • Eric Toulmonde • Jacky Bernard

A. Gervais (✉) • J.C. Eymard • J. Bernard
Institut Jean Godinot, Unité de Thérapie Cellulaire
Reims, FRANCE
e-mail: alban.gervais@reims.fncclcc.fr

E. Toulmonde
Etablissement Français du Sang, Nord de France
Reims, FRANCE

Alban GERVAIS and Jean-Christophe EYMARD contributed equally to this work.

Running Title : Selected Allogeneic Dendritic Cells Enhance Specific T Cell Response

Key words : Alloreactivity, Dendritic cell, Antigen-specific T-cell, Tumor-associated antigen, Adjuvant

Acknowledgments

The authors wish to thank the “Comité de l’Aisne de la Ligue Nationale contre le Cancer” for financial support.

Abbreviations :

APC Antigen Presenting Cell
CTL Cytotoxic T-Lymphocyte
DC Dendritic Cell
DMSO Dimethyl sulfoxide
GM-CSF Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
HLA Human Leukocyte Antigen
HSA Human Serum Albumin
IFN Interferon
IL Interleukin
KIR Killer Inhibitory Receptor
MAb Monoclonal Antibody
MHC Major Histocompatibility Complex
MLR Mixed Lymphocyte Reaction
NK Natural Killer
PBL Peripheral Blood Lymphocytes
PBMC Peripheral Blood Mononuclear Cells
Treg Regulatory T cells

Abstract

Background Alloreaction is known to accumulate several theoretical advantages that can bring help for dendritic cell (DC)-based anti-infective or antitumor strategies. Allogeneic DC have already been tested in experimental and clinical studies, but their comparison with their autologous counterparts were rarely investigated and conclusions diverge.

Objective This study compared antigen-specific T cell responses following priming with autologous versus allogeneic DC and examined the possibility of screening these responses in order to select allogeneic DC that led to a great amplification.

Results Single allele-matched allogeneic DC were efficient in generating *in vitro* peptide-specific T cell responses. When randomly chosen, allogeneic DC generated a broad range of antigen-specific T cell responses in comparison with autologous DC. When screened and selected, allogeneic DC markedly enhanced peptide-specific T cell priming and allowed a more efficient boosting of resulting T cells. These selected allogeneic DC provided a favourable cytokinic and cellular environment that can help concurrent antigen-specific responses.

Conclusion When selected, allogeneic DC provide adjuvant effects that lead to amplification of concomitant antigen-specific T cell responses.

INTRODUCTION

There is now increasing experimental evidence demonstrating that a destructive and specific immune response can be elicited *in vitro* against antigens associated with different pathologies and by using several antigen delivery systems such as dendritic cells (DC). *A contrario*, generation of such responses *in vivo* is likely to be difficult, especially against autologous antigens, that are known to be poorly immunogenic. For example, in cancer, although immune responses were often observed in patients treated with DC-based protocols, only a few objective clinical responses were reported [1]. Then, the use of adjuvants becomes critical for efficacy of these strategies, especially for inducing strong T cell-mediated responses.

Allogeneic reaction to donor MHC molecules generates a powerful immune response that offers significant implications for such DC-based strategies by accumulating several theoretical advantages and adjuvant characteristics [2]. For example, whereas precursor T-cell frequencies for viral antigens have been estimated between 0.001 and 0.01%, up to 10% of a host's T cells will respond to foreign MHC antigens [3;4]. This extraordinarily high precursor frequency leads to activation of numerous T cells whose help will be unusually potent and provide a favourable cytokinic micro-environment [5]. Furthermore, T cells responding by direct allorecognition to foreign MHC molecules can also be specific for other antigens presented by self MHC molecules. Such cross-reactions have been reported for viral peptides [6;7] but could also occur for tumor-associated antigens. Additionally, some authors recently showed that allogeneic HLA molecules can act as ligands for KIR and consequently activate NK cells [8] that exert cytolytic activity against MHC mismatched tumor cells [9] and can provide additional help to immune responses by secreting high levels of cytokines. Finally, although their natural ligands remain undefined, CD1d-dependent NKT cells have also been described as implied in the modulation of alloreaction as helper cells for concurrent T cell responses [10].

The full potential of interactions between a strong alloreaction and an antigen-specific immune response has not been systematically evaluated. Several studies have reported the use of allogeneic cells, such as tumor cells, as an antigen source and adjuvant for vaccination [11;12]. However, the most relevant strategy seems to be the use of allogeneic DC that combine adjuvant effects and antigen-presenting ability, but only if target antigen presentation

1
2
3 is self MHC-restricted : allogeneic APC with at least one HLA allele matched with recipient
4 [13-15], autologous APC with acquired allogeneic MHC molecules [16] and fusion between
5 allogeneic APC and autologous target cells [17-24]. Unfortunately, this strategy was not often
6 conditioned by the help that alloreaction can provide to a concomitant specific response, but
7 rather by the advantages of obtaining DC from healthy donors, with availability, quantity and
8 efficacy [25], as compared with APC from cancer [26] or AIDS patients [27]. Although
9 allogeneic DC were used in different models, antitumor or antigen-specific immune responses
10 were not always monitored and rarely compared with their autologous counterparts.
11 Moreover, when comparison occurs, conclusions diverge [25]: immune responses generated
12 in allogeneic conditions were either less efficient [28-31], equivalent [18] or more efficient
13 [19;30-33] than those generated in corresponding autologous conditions.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 In this study, we examined the feasibility of eliciting antigen-specific immune responses
25 against different target peptides with partially MHC-matched allogeneic APC. Next, we
26 compared the intensity of this response following autologous DC priming with that obtained
27 using randomly chosen allogeneic DC. Then we addressed the question of whether it was
28 possible to select allogeneic DC by screening antigen-specific responses generated in order to
29 amplify immune responses and modify lymphocyte responder properties. Finally, we
30 investigated whether or not selected allogeneic DC stimulation acts as an adjuvant and
31 generates a favourable cytokinic and cellular environment that could explain help provided
32 for concomitant antigen-specific response.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

MATERIALS AND METHODS

Healthy Donors

The study protocol was approved by the local Ethics Committee (CCPPRB Champagne-Ardenne). Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were obtained from 30 HLA-A2⁺ healthy donors who participated in this study after informed consent. Leukocyte-enriched fractions were collected after cytopheresis and HLA typing at the local Blood Bank (Etablissement Français du Sang- Nord de France, Reims, France).

Cell isolation, culture and cryoconservation

The elutriation procedure [34] previously described was used for lymphocyte and monocyte separation. Lymphocytes obtained were mixed with a freezing medium containing 4% human serum albumin (LFB, Les Ulis, France) supplemented with 20% DMSO (v/v, Sigma-Aldrich, Stenheim, Germany) and stored at -196°C in gas phase nitrogen until further use. Monocytes were frozen as described above or used for macrophage and DC generation. Macrophages were obtained from monocytes that were cultured in RPMI medium containing 5% human serum AB (BioWest, Nuaille, France), 2 mM L-Glutamine (Eurobio, Les Ulis, France) and 800 IU/mL GM-CSF (R&D systems, Minneapolis, MN) for 6 days. DC were obtained from monocytes cultured in the same complete medium supplemented with 1000 IU/mL IL-4 (R&D systems). On the 6th day, TNF α (9ng/mL; R&D systems) and PGE2 (1 μ g/mL; Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) were added for DC maturation. After a further 24 hours in culture, mature DC were collected and frozen. Before storing, cell viability and phenotype were assessed by flow cytometry. DC were CD45^{positive} CD14^{low} and CD83^{high} (data not shown).

Cell lines

HLA-A*0201 T2 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and maintained in complete RPMI medium (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) containing 5% human serum AB and 2 mM L-Glutamine.

In vitro Lymphocyte Priming assay

APC were pulsed with 20 μ g/mL of MelanA/MART-1₂₇₋₃₅ (AAGIGILTV), Influenza Virus Matrix Protein Epitope₅₈₋₆₆ (GILGFVFTL) or CEA₆₀₅₋₆₁₃ (YLSGANLNL) peptides (NeoMPS, Strasbourg, France) for 1h. Cells were then washed and cultured with autologous or allogeneic lymphocytes (ratio 1 : 3) for 7 days in a 96-well plates, in RPMI medium

containing 5% human serum AB and 2 mM L-Glutamine. No IL-2 was added during the culture. Assays were performed in triplicate.

Cell number and viability

Lymphocyte absolute number and viability were assessed by using a Guava EasyCytometer and Guava ViaCount reagent (Guava Technologies, Hayward, CA), according to the manufacturer's instructions. Absolute subpopulation lymphocyte number was deduced by multiplying the percentage of positive phenotype cells by absolute lymphocyte number.

Phenotype

Cells from cultures were washed and resuspended in PBS supplemented with 0.5% BSA and 2mM EDTA. Cell phenotype was analysed by flow cytometry by using a EPICS XL (Beckman Coulter, Miami, FL) or Guava EasyCytometer FACS after incubation (at 4°C for 30 min) with the following PE-/ FITC-/ PC5-conjugated mAbs and their corresponding isotypes : anti-CD3 (clone UCHL1), anti-CD4 (13B8.2), anti-CD8 (B9.11), anti-CD25 (B1.49.9), anti-CD27 (1A4CD27), anti-CD45RO (UCHL1), anti-CD56 (NKH-1), anti-CD69 (TP1.55.3), anti-TCR $\alpha\beta$ (BMA031), anti-V α 24 (C15) and anti-V β 11 (C21) and anti-CD127 (R34.34) from Beckman Coulter/Immunotech (Marseille, France). Data analysis was performed with Expo32 (Beckman Coulter), Guava ExpressPlus (Guava) or WinMDI (TSRI, San Diego, CA) softwares.

Tetramer staining

The frequency of antigen-specific CD8+ T lymphocytes was evaluated in the polyclonal population by the use of HLA-A*0201/peptide tetramer. The PE-labelled MART-1, Influenza M1 (Immunonics, Beckman Coulter) and CEA tetramers (ProImmune, Oxford, UK) were used according to the manufacturer's instructions and cells were counterstained with anti-CD8.

Non-radioactive cytotoxicity assay

T cell-mediated cytotoxicity was assayed by flow cytometry according to a protocol adapted from Lecoeur et al. [35]. Briefly, T2 target cells were pulsed with 20 μ g/mL MART-1 peptide for 45 min at 37°C. Then, cells were incubated 10 min at 37°C with 5 μ M CFSE (Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA), washed and counted. 5×10^3 target cells per well were mixed with effector cells (E/T : 20/1) and incubated for 4h. 7-AAD solution (eBioscience, San Diego, CA) was added in wells for 10 min at room temperature. CFSE+ 7-AAD+ cells were considered as dead target cells. Assays were run in triplicate in U-bottomed 96 well

plates. Basal lysis was determined as target cell lysis in the absence of effectors. One lytic unit (LU) was defined as the number of effector cells required to lyse 50% of 5,000 targets. The number of LU per culture (LU50/culture) was calculated.

Intracellular cytokine staining

The frequency of cytokine-secreting CD8⁺ or CD4⁺ T lymphocytes was evaluated in the polyclonal population at day 7 by using the Cytotfix/Cytoperm™ fixation and permeabilization kit (Becton Dickinson) and PE conjugated anti-IFN γ (clone 45.15) or anti-IL-4 (clone 4D9) mAb, from Beckman Coulter, according to the manufacturer's instructions. Cells were previously incubated with 10 μ g/mL BrefeldinA solution (Sigma-Aldrich) for 2h.

Supernatant cytokine quantification

The Human Th1/Th2 Cytokine Kit (Becton Dickinson, San Diego, CA) was used to quantify cytokines (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF α , IFN γ) in culture supernatant by flow cytometry (Cytometric Bead Array), according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

The Wilcoxon's test was used to test for statistical significance of the differences between stimulation by autologous and allogeneic DC. Values for $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Single allele-matched allogeneic APC efficiently prime antigen-specific

T-cells *in vitro*

We first assessed the ability of allogeneic APC to elicit an antigen-specific T-cell response against MHC class I binding peptides in our *in vitro* priming model. PBL from healthy HLA-A2⁺ individuals were cultured for 7 days either with HLA-A2⁺ or HLA-A2⁻ peptide-pulsed allogeneic APC and were thereafter evaluated for the relevant antigen-specific T-cell response using the tetramer assay. Despite the strong expansion of alloreactive T-cells (data not shown), allogeneic HLA-A2⁺ DC were capable of generating effective peptide-specific CD8⁺ T-cell response (Fig. 1A). Moreover, culture controls showed that single allele-matched DC were necessary and sufficient to induce a potent MART-1-specific CD8⁺ T-cell response (Fig. 1A). Similar alloinduced antigen-specific priming was observed whatever the HLA-A2 restricted peptide presented (MART-1, M1 or CEA) and whatever the APC used (DC, macrophages or monocytes) as shown in Fig. 1B and 1C, respectively. These data demonstrate that alloreactive T-cell expansion does not compete with proliferation of target peptide-specific T-cells responding to the same DC.

Randomly chosen allogeneic DC generate a broad range of peptide-specific T-cell responses as compared with their autologous counterparts

As partially matched allogeneic APC can induce concurrent alloreactive and antigen-specific T-cell responses, we systematically compared the potential of autologous and allogeneic DC to promote T-cell activation in response to a target peptide. To constitute large panels of stimulator DC and responder T cells, monocytes and lymphocytes were first isolated from HLA-A2⁺ donor apheresis products using countercurrent centrifugal elutriation, and DC were further grown and matured from monocytes as we previously described [34]. PBL and DC samples were cryopreserved and later used to initiate serial peptide-specific T-cell cultures as follows : lymphocytes from Donor A were mixed with peptide-pulsed DC from either Donor A to initiate autologous cultures (control), or from randomly chosen Donor B to initiate allogeneic cultures. The resulting peptide-specific T CD8⁺ expansions were tested on day 7 of culture, and finally, the relative capacity of allogeneic DC to promote specific response was expressed as the ratio of antigen-specific T-cell numbers in allogeneic to autologous cultures.

Using this experimental design, we investigated the reactivity of 34 individual responders towards M1 peptide presented by paired allogeneic and autologous DC (Fig.2A). When considering data from the entire cohort of responders, a mean 3.8-fold increase of specific T-cell expansion was observed following allogeneic stimulation ($p < 0.001$). However, no or few differences (≤ 2.0 -fold ratio) were observed in nearly half of the responders (14/34 donors), whereas allogeneic DC induced a more than 2-fold increase in M1-specific CD8+ T-cell number in the rest of the cohort. Interestingly, the response of 2 individual allogeneic cultures exceeded control culture by 21- and 27-fold respectively. When the experiment was repeated in another cohort of 30 individuals using paired MART-1 peptide-pulsed DC, a similar pattern of reactivity was obtained (Fig. 2B) : compared with autologous controls, peptide-specific CD8+ T cell numbers were statistically increased ($p < 0.001$) in allogeneic cultures with a mean 3.5-fold ratio, whereas nearly the same proportion of responders exhibited a similar (14/30 donors, ratio ≤ 2.0 -fold) or enhanced (16/30 donors, ratio > 2.0 -fold) specific expansion. A 14-fold amplification occurred in one donor allogeneic culture, generating 2027 additional MART-1 specific CD8+ T lymphocytes per million primed PBL. Considered together, these findings indicate that randomly chosen allogeneic DC generate a broad range of antigen-specific T cell responses, as compared with autologous DC. By chance, a proportion of responders showed an enhanced response in allogeneic conditions but with disparate magnitude.

Screening of peptide-specific T-cell responses generated following priming with different allogeneic DC allows selection of highly potent donor APC

Although how different parameters determine this reactivity remains unclear, previously accumulated data showed the importance of HLA mismatching for the outcome of alloreaction [36-41]. Therefore, we attempted to determine whether random HLA combinations influence specific response intensity by challenging lymphocytes from the same individual with a series of different allogeneic DC. We also examined the possibility of screening resulting antigen-specific responses to highlight allogeneic DC that allowed great amplifications. With this aim, panels of MART-1-pulsed allogeneic DC were used to prime PBL from different responders and peptide-specific CD8+ T cells were counted in cultures following tetramer staining. Figure 3 illustrates results obtained for 3 individual subjects showing various antigen-specific responses in autologous cultures. For each responder, when PBL were separately stimulated with allogeneic DC from 12 different donors, again, resulting

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

cultures exhibited a broad range of specific responses. For example, donor #1 developed responses ranging from 47 to 1476 peptide-specific CD8+ T cells per million primed PBL. Furthermore, in the case of one individual (donor #1) with a low response in autologous cultures (161 peptide-specific CD8+ T cells), stimulation with allogeneic DC led to a superior response in 91% of cases (10/11 DC donors), with a maximum 9.2-fold amplification. One subject (donor #2), with a higher autologous response (631 tetramer-positive cells), exhibited enhanced responses in 64% of cases with a highest 3.9-fold increase. Finally, in the case of one donor (donor #3) with a strong autologous response (1469 MART-1-specific CD8+ T cells), antigen-specific reactions showed a shorter range from 672 to 1904 specific cells and augmented responses in only 44% of cases, with a maximum 2.1-fold amplification. These data indicate that each PBL responder : DC stimulator combination tested generates an HLA mismatching and consequently an alloreaction that is intrinsic to that particular pairing and that can help concurrent antigen-specific response. Responder cell properties also play a role in the response outcome as shown by differences observed between individuals following priming with autologous APC. Interestingly, by screening responses, we are able to detect and select allogeneic DC that greatly amplify the antigen-specific reaction for each responder, and not for only half of the responders when randomly chosen.

Antigen-specific CD8+ T cells primed with selected allogeneic DC exhibit a CTL activity

When a strong antigen-specific response amplification occurred in allogeneic cultures, the functional activity of resulting lymphocytes was directly evaluated. With this aim, CTL generated following stimulation with autologous and with selected (based on the previous screening) allogeneic MART-1-pulsed DC were tested for peptide-specific lysis on day 7 of culture. As can be seen in Figure 4, increase of tetramer-positive cell numbers in allogeneic cultures led to a significant amplification ($p < 0.05$) of lytic units, *i.e* number of CTL, against peptide-pulsed target T2 cells, whereas cytotoxic activity was similar in both allogeneic and autologous cultures, for the same number of CTL (data not shown). These results indicate that when alloreaction promotes concomitant antigen-specific response, resulting antigen-specific CD8+ T cells conserve a functional activity and are efficient for lysis of target cells.

Priming with allogeneic DC can modifies responder PBL properties and allows a more efficient boosting of resulting cells

Next, we tried to determine whether stimulation with allogeneic DC only amplifies antigen-specific T cell numbers or, more profoundly, modifies intrinsic properties of these responder cells. To test this, PBL from different donors were stimulated either by autologous or allogeneic DC. At day 7, peptide-specific cell numbers were assessed. Then, in some cases where allogeneic DC generated about the same number than in autologous control cultures, CD8+ tetramer-positive cells from both type of cultures were washed and plated. To avoid influence of the alloreaction environment, these resulting lymphocytes were consecutively stimulated with corresponding autologous peptide-pulsed DC for one additional week. As shown in figure 5, although starting cultures had about the same number of antigen-specific CD8+ T cells, 7 days after boosting, numbers of tetramer positive cells were roughly 2-fold greater in cultures issued from allogeneic priming. These data suggest that responder PBL primed with allogeneic DC can be modified and become more responsive to a second stimulation.

Selected allogeneic DC elicit a strong reaction which provides a favourable environment that can help antigen-specific response

Finally, we decided to explore potential changes in the immune response environment generated by selected allogeneic DC which could explain their efficacy in amplifying antigen-specific response. Previous studies suggest that alloreaction induces a preferentially Th1-type “cytokine storm” [5] and leads to activation of numerous immune cell types. To test this, we dissected immune responses after priming with selected allogeneic or autologous DC by quantifying cytokines and identifying different categories of effector and modulatory cells. Figure 6 shows that allo-induced responses were strongly Th1-polarized with high levels of TNF α , IFN γ and IL-2 cytokines in supernatant as compared with autologous controls. Concentrations of TNF α and IL-2 were more than 100-fold increased, whereas IL-4 levels were reduced. No IL-5 and IL-10 cytokines were detected at day 3 of culture (data not shown). Although compared with autologous cultures, proportions and numbers of IL-4-secreting CD4+ T cells increased in allogeneic cultures, this Th1-polarization was confirmed by the proportion of IFN γ -secreting CD4+ T cells, which were 18-fold more numerous than IL-4-secreting CD4+ T cells (Table 1). As attempted, alloreaction induced a great proliferation in total lymphocyte population that led to amplification of all T cell subpopulations as described in Table 1. For example, we observed a mean 2.5-fold more efficient expansion of T lymphocytes, CD4+ and CD8+ T cells with allogeneic DC than with

autologous DC. Interestingly, in addition to these quantitative effects, qualitative changes also occurred in allogeneic cultures and accentuated or mitigated expansions. CD8+ and CD4+ T cells were strongly activated as shown by increased percentages of CD27-positive and CD25-positive cells in allogeneic conditions, leading to a more than 10-fold expansion of these cells, as compared with autologous cultures. In the same way, a larger proportion of CD8+ T lymphocytes expressed the CD45RO memory marker (+5.8%) and secreted IFN γ as detected by intracellular staining (+5%). *A contrario*, the percentage of regulatory T cells (Treg) decreased in cultures following allogeneic priming (0.9%) as compared with autologous controls (1.6%). Furthermore, not only T lymphocytes benefited from this great proliferation but also innate immune cells. NK and NKT cell expansions were respectively 2.6-fold and 13.8-fold more intensive in allogeneic cultures (Table 1). Again, this amplification was accompanied by qualitative changes : the proportion of NK cells expressing CD69 was statistically larger ($p=0.0034$, $n=11$) in allogeneic ($80.0\pm17.5\%$) than in autologous ($70.8\pm26.4\%$) cultures (data not shown). Considered together, these findings indicate that selected allogeneic DC generate a powerful Th1-polarized response that provides a favorable cytokinic and cellular environment, leading to activation and expansion of both helper and effector cells from adaptive and innate immunity.

DISCUSSION

Previous studies demonstrated the possibility of generating antigen-specific immune responses using partially MHC-matched DC, against different target peptides, such as tumor [14] and AIDS antigens [13], in animal and human models. In this study, we confirmed the ability of allogeneic DC to generate antigen-specific CD8⁺ T cells *in vitro* against three HLA-A2 restricted peptides : MART-1, Influenza M1 and CEA. Importantly, as previously described [2;13], a primary peptide-specific immune response could only be detected if at least one HLA allele was matched between allogeneic DC and responder lymphocytes. Furthermore, we also demonstrated that this ability is not limited to allogeneic DC, but can be applied to other APC categories like monocytes and macrophages, even if antigen-specific T cell responses are lower.

Transplantation immunology and the mixed lymphocyte reaction (MLR), a useful *in vitro* model, provide information about alloreaction. Traditionally, the primary alloresponse is regarded as a strong Th1 response with high levels of IL-2, IFN γ and TNF α and low levels of or no IL-4 [5]. We confirmed exactly this observation by another sensitive method, the Cytokine Bead Assay. Jordan et al. [42] suggest that human alloresponse is far more heterogeneous than previously thought, with Th2 cytokines playing a major part in the overall composite profile produced. In our model, we detected no IL-5 (data not shown) and equivalent IL-4 levels in autologous and allogeneic cultures. Differences in experimental models, and especially kinetics, could explain these results.

This cytokinic “storm” [43] is initiated by the high frequency of alloreactive T cells that directly recognize MHC molecules on allogeneic DC. As APC, DC express both MHC class I and class II molecules and can concurrently activate alloreactive CD8⁺ and CD4⁺ T cells. In our model, we observed activation of both T cell subpopulations that expressed CD27 and CD25 markers and were positive for IFN γ intracellular staining. These results are consistent with previous data from different authors working on a similar experimental model. Peshwa et al. [13] described the presence of larger fractions of activated (HLA-DR expressing) CD4⁺ and CD8⁺ T cells and Rentenaar et al. [44] observed a higher frequency of reactive (CD69 expressing and IFN γ -producing) CD8⁺ T cells in allogeneic cultures. Although allostimulation was sometimes described as generating more favourable conditions for the expansion of CD8⁺ than CD4⁺ T-lymphocytes [13;14], in our conditions, equivalent mean expansions were reported for both T cell subpopulations.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Interestingly, in our work, low levels of IL-10 (data not shown) were detected at day 3, consistent with results from Jordan et al. [42] and with the IL-10 modulation role in alloreactivity and graft-versus-host reactions [45]. Moreover, a reduced proportion of CD4⁺CD127⁺CD25^{high} Treg was observed in cultures following priming with selected allogeneic DC. Although allogeneic APC are known to expand alloantigen-specific Treg in the MLR that develops from polyclonal populations of T cells [46], the vigorous induction of T cell responses could in part be explained by a weak immunoregulation, as in liver transplantation when low circulating Treg levels were observed after acute rejection [47].

By generating this favourable cytokinic and cellular environment, we demonstrated in this study that alloreaction can potentially help a concomitant antigen-specific T cell response and then elicit stronger reactions than in autologous conditions. The question of whether co-expression of allogeneic MHC molecules enhances or impairs priming of a specific immunity by peptide-pulsed DC has already been addressed. Recently, two studies compared the use of allogeneic (semi-allogeneic) and autologous DC to generate antigen-specific and antitumor responses [28;29]. *In vitro*, semi-allogeneic DC were equivalent or more efficient than autologous DC to prime ovalbumin peptide-specific T cells as shown by CFSE dilution and proliferation assays in murine models. *In vivo*, these allogeneic DC were less efficient than autologous counterparts to generate antitumor responses, whereas allogeneic APC have already been described as more potent in other *in vivo* models as fusion hybrids [32]. Several hypotheses can explain this lack of efficacy. Allogeneic DC persist for a shorter time in draining lymph nodes [28] and can be rapidly destroyed in a MHC mismatched organism [48], even if semi-allogeneic cells seem to be protected [49]. Early APC/T cell interaction is a critical point for presentation of target antigen and initiation of a strong specific immune response. Rapid elimination of allogeneic DC may restrict this phase and compromise priming efficacy. *In vivo* weaker stimulation of naïve antigen-specific T cells by semi-allogeneic DC, as compared with autologous DC, could also be due to low antigen-presenting MHC molecule expression by these DC, as detected by flow cytometry and mean fluorescence intensity [28;29].

Interestingly, Merrick et al. [29] also worked on an *in vitro* human model and concluded that autologous DC were more efficient to prime naïve CTL against MART-1. However, there are two major differences with our model. Firstly, IL-2 was added in their cultures after priming. Our previous data showed that adjuvant effect observed with allogeneic DC was eliminated if IL-2 was added to cultures : similar expansions were then observed in autologous and allogeneic cultures (data not shown). Secondly, Merrick et al.

randomly chose allogeneic APC and resulting HLA mismatching and/or intrinsic cell properties are perhaps not efficient enough. This hypothesis was confirmed by low differences observed in cell counts between allogeneic and autologous cultures.

Indeed, the originality of our study is to be based on the allogeneic DC selection. In previous studies which compared allogeneic to autologous DC, allogeneic APC were issued from either F1 cross or randomly chosen individuals. Although screening tests using MLR or IFN γ secretion assays have already been described for the selection of donors in transplantation [50-51], this is the first time that such a test was performed to amplify an antigen-specific T cell response. This screening test is still empirical and mainly based on the measurement of antigen-specific T cell expansion, but could also be on NK and NKT cell proliferation. Importantly, this assay is consistent because, when the same donor-responder combinations were repeated in independent experiments, the most efficient APC donor still the same (data not shown). However, in addition, we work on different parameters that can influence the outcome of alloreaction and the concurrent immune responses generated : HLA mismatching [36-38], HLA-A2 molecule expression intensity [28], KIR mismatching [8;9;52-54], CD1d expression, alpha-galactosyl ceramide analogue use [10] and intrinsic properties of donor APC and PBL responders. The aim is to find predictive factors allowing cell pre-selection or pre-treatment that could increase resulting immune response amplifications.

Finally, the potential of using allogeneic DC from healthy donors offers significant immunological advantages for antitumor strategies. Donor APC are not immunocompromised by tumor factors, in contrast with cancer patients [26;55] and alloreaction can provide immune “danger” signals [56] that could bypass tumor immunosuppressive effects. Additionally, when allogeneic DC are efficient, diversity and numbers of generated immune effectors, i.e CTL, NK and NKT, give the possibility of high-intensity attacks on tumor cells from different angles. Furthermore, no evidence of significant treatment related toxicity or auto-immunity was detected *in vivo* [22-57] or *in vitro* against autologous monocytes (data not shown). But a better understanding of immune responses generated is required for exploitation of the alloreaction for clinical applications : memory response after successive stimulations, resistance to immunosuppressive mechanisms and *in vivo* allogeneic DC survival and migration.

To conclude, we have shown that peptide-pulsed DC derived from a partially allogeneic donor are efficient to generate an antigen-specific T cell response. Alloreaction can amplify a concomitant peptide-specific response for each responder by generating a favourable environment only if allogeneic DC are selected from a panel of different donors by

a screening test. Moreover, selected allogeneic DC not only promote CTL but also NK and NKT cell responses and make these APC interesting candidates to generate efficient antitumor responses.

References

1. Lesterhuis WJ, Aarntzen EH, De V, I, Schuurhuis DH, Figdor CG, Adema GJ, et al. (2008) Dendritic cell vaccines in melanoma: From promise to proof? *Crit Rev Oncol Hematol* 2008 Feb 7.
2. Fabre JW (2001) The allogeneic response and tumor immunity. *Nat Med* 7(6):649-52.
3. Nisbet NW, Simonsen M, Zaleski M (1969) The frequency of antigen-sensitive cells in tissue transplantation. A commentary on clonal selection. *J Exp Med* 129(3):459-67.
4. Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, Turka LA (2001) Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J Immunol* 166(2):973-81.
5. Danzer SG, Kirchner H, Rink L (1994) Cytokine interactions in human mixed lymphocyte culture. *Transplantation* 57(11):1638-42.
6. Burrows SR, Khanna R, Burrows JM, Moss DJ (1994) An alloresponse in humans is dominated by cytotoxic T lymphocytes (CTL) cross-reactive with a single Epstein-Barr virus CTL epitope: implications for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 179(4):1155-61.
7. Brehm MA, Markees TG, Daniels KA, Greiner DL, Rossini AA, Welsh RM. (2003) Direct visualization of cross-reactive effector and memory allo-specific CD8 T cells generated in response to viral infections. *J Immunol* 170(8):4077-86.
8. Chewning JH, Gudme CN, Hsu KC, Selvakumar A, Dupont B (2007) KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group in vitro. *J Immunol* 179(2):854-68.
9. Igarashi T, Wynberg J, Srinivasan R, Becknell B, McCoy JP, Jr., Takahashi Y, et al. (2004) Enhanced cytotoxicity of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells. *Blood* 104(1):170-7.
10. Patterson S, Kotsianidis I, Almeida A, Politou M, Rahemtulla A, Matthew B, et al. (2005) Human invariant NKT cells are required for effective in vitro alloresponses. *J Immunol* 175(8):5087-94.
11. Thompson PL, Dessureault S (2007) Tumor cell vaccines. *Adv Exp Med Biol* 601:345-55.

12. Ward JE, McNeel DG (2007) GVAX: an allogeneic, whole-cell, GM-CSF-secreting cellular immunotherapy for the treatment of prostate cancer. *Expert Opin Biol Ther* 7(12):1893-902.
13. Peshwa MV, Benike C, Dupuis M, Kundu SK, Engleman EG, Merigan TC, et al. (1998) Generation of primary peptide-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocytes in vitro using allogeneic dendritic cells. *Cell Transplant* 7(1):1-9.
14. Peiper M, Goedegebuure PS, Eberlein TJ (1997) Generation of peptide-specific cytotoxic T lymphocytes using allogeneic dendritic cells capable of lysing human pancreatic cancer cells. *Surgery* 122(2):235-41.
15. Santegoets SJ, Schreurs MW, Masterson AJ, Liu YP, Goletz S, Baumeister H, et al. (2006) In vitro priming of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes using allogeneic dendritic cells derived from the human MUTZ-3 cell line. *Cancer Immunol Immunother* 55(12):1480-90.
16. Russo V, Zhou D, Sartirana C, Rovere P, Villa A, Rossini S, et al. (2000) Acquisition of intact allogeneic human leukocyte antigen molecules by human dendritic cells. *Blood* 95(11):3473-7.
17. Marten A, Renoth S, Heinicke T, Albers P, Pauli A, Mey U, et al. (2003) Allogeneic dendritic cells fused with tumor cells: preclinical results and outcome of a clinical phase I/II trial in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Hum Gene Ther* 14(5):483-94.
18. Neves AR, Ensina LF, Anselmo LB, Leite KR, Buzaid AC, Camara-Lopes LH, et al. (2005) Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumor cell hybrids express more CD86 and induce higher levels of interferon-gamma in mixed lymphocyte reactions. *Cancer Immunol Immunother* 54(1):61-6.
19. Xu F, Ye YJ, Cui ZR, Wang S (2005) Allogeneic dendritomas induce anti-tumour immunity against metastatic colon cancer. *Scand J Immunol* 61(4):364-9.
20. Trefzer U, Herberth G, Wohlan K, Milling A, Thiemann M, Sherev T, et al. (2004) Vaccination with hybrids of tumor and dendritic cells induces tumor-specific T-cell and clinical responses in melanoma stage III and IV patients. *Int J Cancer* 110(5):730-40.
21. Yu Z, Fan Q, Hao X, Long H (2004) Specific antitumor effects of tumor vaccine produced by electrofusion between osteosarcoma cell and dendritic cell in rats. *Cell Mol Immunol* 1(6):454-60.
22. Avigan DE, Vasir B, George DJ, Oh WK, Atkins MB, McDermott DF, et al. (2007) Phase I/II study of vaccination with electrofused allogeneic dendritic cells/autologous tumor-derived cells in patients with stage IV renal cell carcinoma. *J Immunother* 30(7):749-61.
23. Tanaka Y, Koido S, Chen D, Gendler SJ, Kufe D, Gong J (2001) Vaccination with allogeneic dendritic cells fused to carcinoma cells induces antitumor immunity in MUC1 transgenic mice. *Clin Immunol* 101(2):192-200.

24. Barbuto JA, Ensina LF, Neves AR, Bergami-Santos P, Leite KR, Marques R, et al. (2004) Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. *Cancer Immunol Immunother* 53(12):1111-8.
25. De Gruijl TD, Van den Eertwegh AJ, Pinedo HM, Scheper RJ (2008) Free in PMC whole-cell cancer vaccination : from autologous to allogeneic tumor- and dendritic cell-based vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 57(10):1569-77.
26. Gabrilovich DI, Corak J, Ciernik IF, Kavanaugh D, Carbone DP (1997) Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 3(3):483-90.
27. Andrieu M, Chassin D, Desoutter JF, Bouchaert I, Baillet M, Hanau D, et al. (2001) Downregulation of major histocompatibility class I on human dendritic cells by HIV Nef impairs antigen presentation to HIV-specific CD8+ T lymphocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17(14):1365-70.
28. Wells JW, Cowled CJ, Darling D, Guinn BA, Farzaneh F, Noble A, et al. (2007) Semi-allogeneic dendritic cells can induce antigen-specific T-cell activation, which is not enhanced by concurrent alloreactivity. *Cancer Immunol Immunother* 56(12):1861-73.
29. Merrick A, Diaz RM, O'Donnell D, Selby P, Vile R, Melcher A (2008) Autologous versus allogeneic peptide-pulsed dendritic cells for anti-tumour vaccination: expression of allogeneic MHC supports activation of antigen specific T cells, but impairs early naive cytotoxic priming and anti-tumour therapy. *Cancer Immunol Immunother* 57(6):897-906.
30. Simova J, Bubenik J, Bieblova J, Indrova M, Jandlova T (2005) Immunotherapeutic efficacy of vaccines generated by fusion of dendritic cells and HPV16-associated tumour cells. *Folia Biol (Praha)* 51(1):19-24.
31. Suzuki T, Fukuhara T, Tanaka M, Nakamura A, Akiyama K, Sakakibara T, et al. (2005) Vaccination of dendritic cells loaded with interleukin-12-secreting cancer cells augments in vivo antitumor immunity: characteristics of syngeneic and allogeneic antigen-presenting cell cancer hybrid cells. *Clin Cancer Res* 11(1):58-66.
32. Yasuda T, Kamigaki T, Kawasaki K, Nakamura T, Yamamoto M, Kanemitsu K, et al. (2007) Superior anti-tumor protection and therapeutic efficacy of vaccination with allogeneic and semiallogeneic dendritic cell/tumor cell fusion hybrids for murine colon adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 56(7):1025-36.
33. Gong J, Nikrui N, Chen D, Koido S, Wu Z, Tanaka Y, et al. (2000) Fusions of human ovarian carcinoma cells with autologous or allogeneic dendritic cells induce antitumor immunity. *J Immunol* 165(3):1705-11.
34. Bernard J, Ittelet D, Christoph A, Potron G, Adjizian JC, Kochman S, et al. (1998) Adherent-free generation of functional dendritic cells from purified blood monocytes in view of potential clinical use. *Hematol Cell Ther* 40(1):17-26.

35. Lecoeur H, Fevrier M, Garcia S, Riviere Y, Gougeon ML (2001) A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 253(1-2):177-87.
36. Prasad S, Humphreys I, Kireta S, Gilchrist RB, Bardy P, Russ GR, et al. (2006) MHC Class II DRB genotyping is highly predictive of in-vitro alloreactivity in the common marmoset. *J Immunol Methods* 314(1-2):153-63.
37. Cukrova V, Loudova M, Sramkova I, Dolezalova L, Vitek A (1998) Predictive value of HLA class II PCR typing for the outcome of mixed lymphocyte reaction. *Folia Biol (Praha)* 44(4):137-41.
38. Olerup O, Moller E, Persson U (1990) HLA-DP incompatibilities induce significant proliferation in primary mixed lymphocyte cultures in HLA-A, -B, -DR and -DQ compatible individuals: implications for allogeneic bone marrow transplantation. *Tissue Antigens* 36(5):194-202.
39. Suehiro T, Shimada M, Kishikawa K, Shimura T, Soejima Y, Yoshizumi T, et al. (2005) Influence of HLA compatibility and lymphocyte cross-matching on acute cellular rejection following living donor adult liver transplantation. *Liver Int* 25(6):1182-8.
40. Cesbron A, Moreau P, Milpied N, Muller JY, Harousseau JL, Bignon JD (1990) Influence of HLA-DP mismatches on primary MLR responses in unrelated HLA-A, B, DR, DQ, Dw identical pairs in allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 6(5):337-40.
41. Smith RA, Belcher R (1987) Disparity in HLA-DR typing and mixed lymphocyte culture reactivity. *Ann Clin Lab Sci* 17(5):318-23.
42. Jordan WJ, Ritter MA (2002) Optimal analysis of composite cytokine responses during alloreactivity. *J Immunol Methods* 260(1-2):1-14.
43. Ferrara JL, Abhyankar S, Gilliland DG (1993) Cytokine storm of graft-versus-host disease: a critical effector role for interleukin-1. *Transplant Proc* 25(1 Pt 2):1216-7.
44. Rentenaar RJ, Vosters JL, van Diepen FN, Remmerswaal EB, van Lier RA, ten B, I (2002) Differentiation of human alloreactive CD8(+) T cells in vitro. *Immunology* 105(3):278-85.
45. Wang XN, Lange C, Schulz U, Sviland L, Eissner G, Oliver KM, et al. (2002) Interleukin-10 modulation of alloreactivity and graft-versus-host reactions. *Transplantation* 74(6):772-8.
46. Yamazaki S, Patel M, Harper A, Bonito A, Fukuyama H, Pack M, et al. (2006) Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(8):2758-63.
47. Demirkiran A, Kok A, Kwekkeboom J, Kusters JG, Metselaar HJ, Tilanus HW, et al. (2006) Low circulating regulatory T-cell levels after acute rejection in liver transplantation. *Liver Transpl* 12(2):277-84.

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
48. Yu G, Xu X, Vu MD, Kilpatrick ED, Li XC (2006) NK cells promote transplant tolerance by killing donor antigen-presenting cells. *J Exp Med* 203(8):1851-8.
49. Lee WC, Zhong C, Qian S, Wan Y, Gauldie J, Mi Z, et al. (1998) Phenotype, function, and in vivo migration and survival of allogeneic dendritic cell progenitors genetically engineered to express TGF-beta. *Transplantation* 66(12):1810-7.
50. Mickelson EM, Longton G, Anasetti C, Petersdorf E, Martin P, Guthrie LA, et al. (1996) Evaluation of the mixed lymphocyte culture (MLC) assay as a method for selecting unrelated donors for marrow transplantation. *Tissue Antigens* 47(1):27-36.
51. Bendjelloul F, Desin TS, Shoker AS (2004) Donor non-specific IFN-gamma production by primed alloreactive cells as a potential screening test to predict the alloimmune response. *Transpl Immunol* 12(2):167-76.
52. De SD, Bishara A, Witt CS, Nagler A, Brautbar C, Slavin S, et al. (2005) Natural killer cell HLA-C epitopes and killer cell immunoglobulin-like receptors both influence outcome of mismatched unrelated donor bone marrow transplants. *Tissue Antigens* 65(6):519-28.
53. Morishima Y, Yabe T, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, et al. (2007) Effects of HLA allele and killer immunoglobulin-like receptor ligand matching on clinical outcome in leukemia patients undergoing transplantation with T-cell-replete marrow from an unrelated donor. *Biol Blood Marrow Transplant* 13(3):315-28.
54. Farag SS, Bacigalupo A, Eapen M, Hurley C, Dupont B, Caligiuri MA, et al. (2006) The effect of KIR ligand incompatibility on the outcome of unrelated donor transplantation: a report from the center for international blood and marrow transplant research, the European blood and marrow transplant registry, and the Dutch registry. *Biol Blood Marrow Transplant* 12(8):876-84.
55. Almand B, Clark JI, Nikitina E, van BJ, English NR, Knight SC, et al. (2001) Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 166(1):678-89.
56. Laurin D, Kanitakis J, Bienvenu J, Bardin C, Bernaud J, Lebecque S, et al. (2004) Allogeneic reaction induces dendritic cell maturation through proinflammatory cytokine secretion. *Transplantation* 77(2):267-75.
57. Hus I, Rolinski J, Tabarkiewicz J, Wojas K, Bojarska-Junak A, Greiner J, Giannopoulos K et al. (2005). Allogeneic dendritic cells pulsed with tumor lysates or apoptotic bodies as immunotherapy for patients with early-stage B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 19:1621-1627.

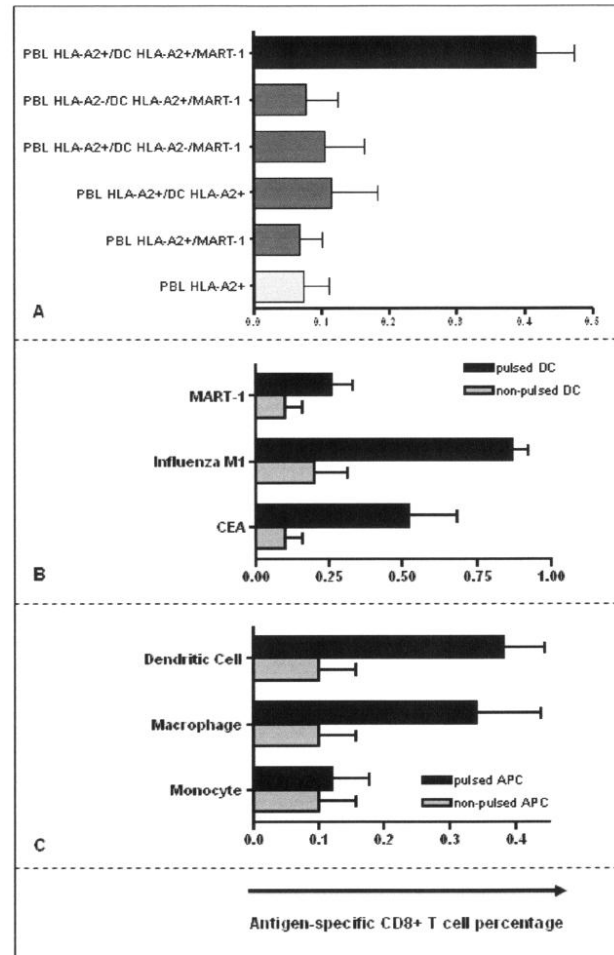


Figure 1: Antigen-specific CD8+ T-cell response upon *in vitro* priming with allogeneic APC. (A) Peripheral blood lymphocytes (PBL) from HLA-A2⁺ or HLA-A2⁻ healthy individuals were co-cultured with MART-1-pulsed or non-pulsed HLA-A2⁺ or HLA-A2⁻ DC. At day 7, the percentage of antigen-specific CD8+ T cells was evaluated by flow cytometry following specific tetramer labelling. This experimental device was used to test DC pulsed with different peptides (B) and MART-1 peptide presentation by different APC (C). Data of one representative experiment from three donors are presented as mean ± SEM of triplicate assay.

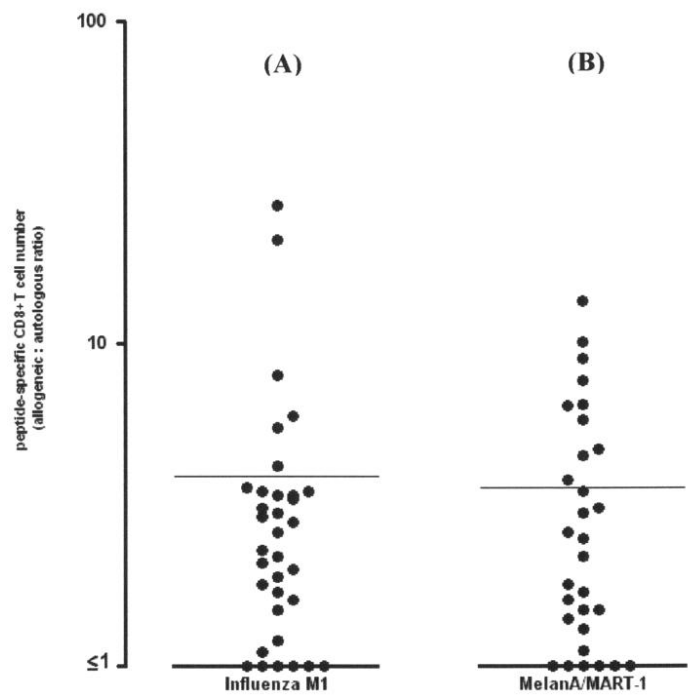


Figure 2 : Relative capacity of allogeneic and autologous DC to generate antigen-specific CD8+ T cell response. PBL from HLA-A2⁺ healthy donors were co-cultured with target peptide-pulsed autologous or HLA-A2⁺ allogeneic DC. At day 7, the number of antigen-specific CD8+ T cells was evaluated by flow cytometry following relevant tetramer staining. Results were expressed as ratio of antigen-specific T cell numbers in allogeneic to autologous cultures. (A) PBL from 34 donors primed with M1-pulsed DC. (B) PBL from 30 donors stimulated with MART-1-pulsed DC. Each point represents an individual donor. Horizontal lines indicate the mean value for each cohort.

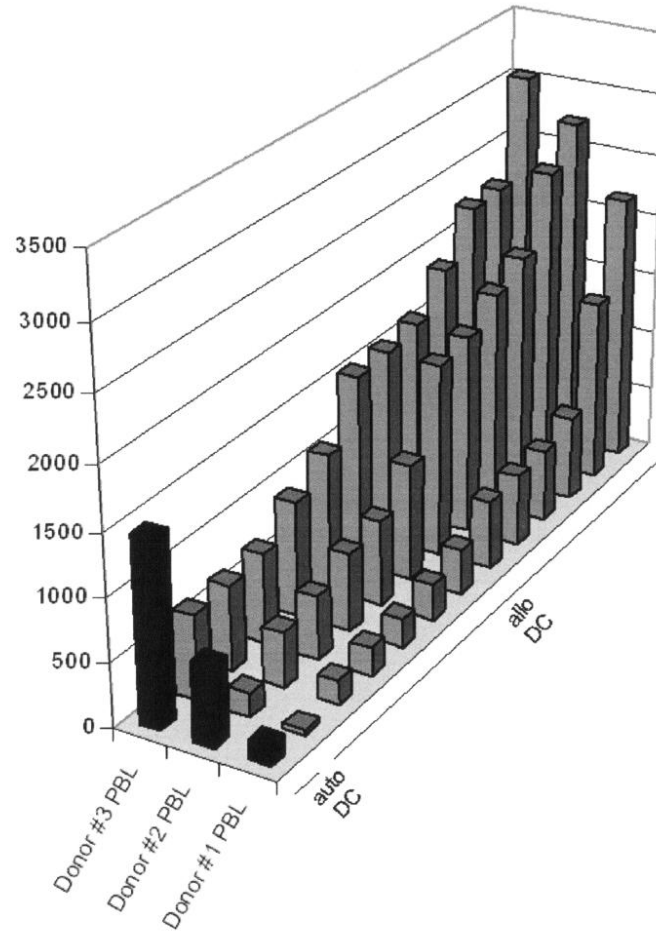


Figure 3 : Antigen-specific CD8+ T cell responses following screening of allogeneic DC. PBL from 3 HLA-A2⁺ healthy donors were co-cultured with target peptide-pulsed autologous (autoDC) (*black histogram*) or allogeneic DC (alloDC) (*grey histogram*) from a panel of 12 different HLA-A2⁺ donors. At day 7, the number of antigen-specific CD8+ T cells was evaluated by flow cytometry following relevant tetramer staining. Data are sorted by increasing order. This graphic shows representative data from one of two independent experiments.

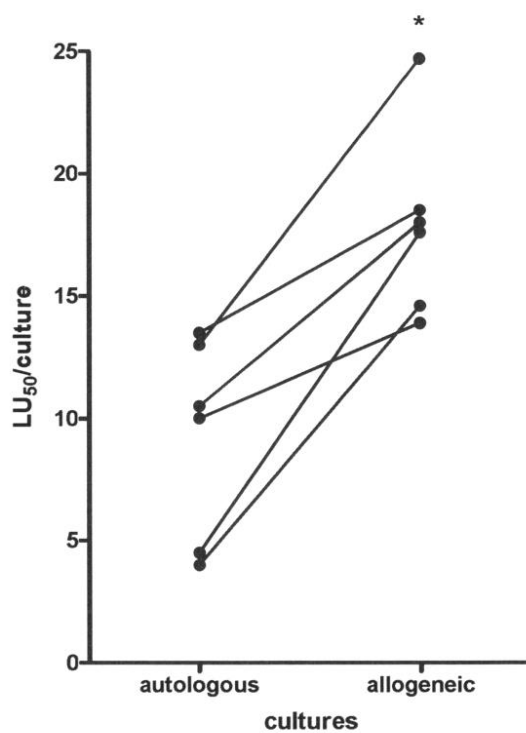


Figure 4 : Antigen-specific CTL generation by autologous and selected allogeneic DC. PBL from 6 HLA-A2⁺ healthy donors were co-cultured with MART-1-pulsed autologous or allogeneic DC selected from HLA-A2⁺ donors. At day 7, the number of antigen-specific lytic units was evaluated by a non-radioactive cytotoxic assay against MART-1-pulsed T2 cells. Each point represents individual donor. *significantly different from autologous cultures ($p < 0.05$)

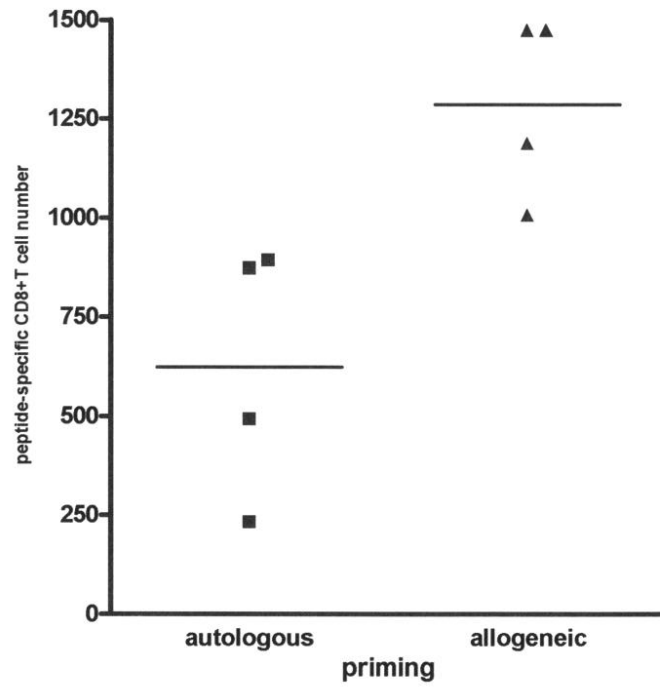


Figure 5 : Autologous or allogeneic DC-primed PBL responses following boosting with corresponding autologous DC. PBL from 4 HLA-A2⁺ healthy donors were co-cultured with target MART-1-pulsed autologous or allogeneic DC selected from HLA-A2⁺ donors. At day 7, the numbers of antigen-specific CD8⁺ T cells were evaluated by flow cytometry following tetramer staining. 10⁶ resulting cells, with the same proportion of tetramer-positive cells, were then stimulated with peptide-pulsed autologous DC for one additional week and then counted. Each point represents an individual donor. Horizontal lines indicate the mean value for each priming condition.

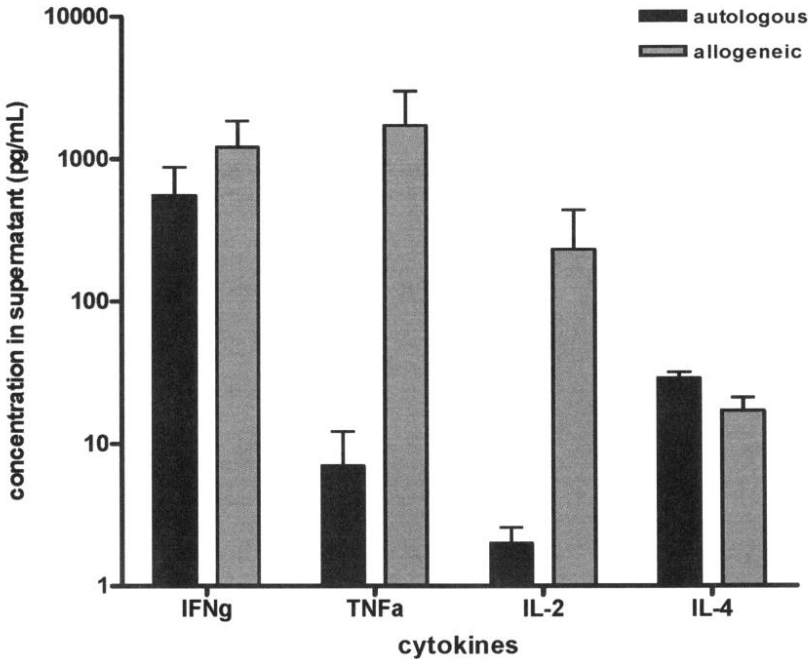


Figure 6 : cytokine secretion in culture supernatant. PBL from 3 HLA-A2+ healthy donors were co-cultured with MART-1-pulsed autologous or selected allogeneic DC from a panel of 3 HLA-A2+ donors. At day 3, supernatant cytokines were quantified by the CBA method and flow cytometry. Datas are presented as means $\pm$ SEM.

cell subpopulation	mean percentage of cells		mean cell number		mean fold ratio
	autologous cultures	allogeneic cultures	autologous cultures	allogeneic cultures	
T cells	72.6 ± 14.1	74.1 ± 14.6	2 340 000	5 752 000 ^{***}	2.5
CD8+ T cells	14.5 ± 5.0	17.0 ± 4.8 ^{**}	544 000	1 407 000 ^{***}	2.6
CD27+ CD8+ T cells	1.6 ± 1.2	8.7 ± 6.7 [*]	10 000	118 000 [*]	11.8
CD4+ T cells	51.9 ± 9.6	59.7 ± 6.1 [*]	1 852 000	4 765 000 ^{**}	2.6
CD25+ CD4+ T cells	3.0 ± 0.6	15.2 ± 3.5 ^{***}	49 000	647 000 ^{**}	13.2
CD45RO+ CD8+ T cells	39.8 ± 9.6	45.6 ± 9.7 ^{**}	237 000	645 000 ^{***}	2.7
IFNγ-secreting CD8+ T cells	13.6 ± 3.7	18.6 ± 7.6 [*]	63 000	207 000 ^{***}	3.3
IFNγ-secreting CD4+ T cells	5.3 ± 2.1	9.2 ± 4.5 ^{**}	23 000	96 000 ^{***}	4.2
IL-4-secreting CD4+ T cells	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.8 ^{**}	500	3 700 ^{***}	7.4
Regulatory T cells (CD4⁺ CD127⁻ CD25⁺)	1.6 ± 1.0	0.9 ± 0.7 [*]	66 000	72 000	1.1
NK cells (CD3⁺ CD56⁺)	6.8 ± 3.4	5.8 ± 4.3	222 000	575 000	2.6
NKT cells (TCR$\alpha\beta$⁺ Vα24⁺ Vβ11⁺)	0.01 ± 0.02	0.08 ± 0.05 [*]	400	5 500 ^{**}	13.8

Table 1 : lymphocyte phenotype and number in cultures following priming with autologous or selected allogeneic DC. PBL from 10 HLA-A2⁺ healthy donors were co-cultured with MART-1-pulsed autologous or selected allogeneic DC from a panel of 3 HLA-A2⁺ donors. At day 7, cell phenotype was analysed by flow cytometry. Absolute lymphocyte subpopulation numbers were deduced by multiplying the percentage of positive phenotype cells by absolute lymphocyte number, per million primed. Data are presented as means ± SEM. The mean fold ratio of cell number in allogeneic to autologous conditions was reported in the last column. *Significantly different from autologous controls p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

3.2. Résumé :

L'alloréactivité génère un micro-environnement particulièrement riche en cytokines, en molécules d'adhésion et en ligands de co-activation, adjuvants puissants de l'immunité. Dans ce contexte, nous avons étudié si des DC matures allogéniques de donneurs sains pulsées avec un peptide tumoral modèle pouvaient amplifier une réponse immune spécifique anti-tumorale de lymphocytes provenant d'autres donneurs sains.

Résultats : dans le cadre d'un partenariat avec l'EFS, une double collection de DC et de lymphocytes a été constituée à partir de résidus de cytaphérèses issus de 30 donneurs sains HLA-A2 après consentement éclairé.

Nous avons d'abord démontré la faisabilité de cette approche en établissant que des DC d'un donneur A pulsées avec le peptide MART-1 induisent une réponse lymphocytaire T CD8+ spécifique pour un répondeur B, si et seulement si, les sujets A et B partagent la même molécule HLA de classe I qui restreint la présentation peptidique, en l'occurrence HLA-A2. Ensuite, nous montrons que des DC allogéniques peuvent influencer une réponse T concomitante et augmenter le nombre d'effecteurs spécifiques générés. Globalement, les DC allogéniques induisent en moyenne 3,5 fois plus d'effecteurs T CD8+ spécifiques que leurs homologues autologues.

La variabilité des réponses observée dans la cohorte de 30 patients nous a amenés à examiner les réponses d'un même répondeur face à un panel élargi de DC allogéniques issues de 12 donneurs différents. L'analyse des résultats révèle que l'amplitude de la réponse T spécifique induite dans de telles conditions est propre à chaque combinaison et la variation du nombre de lymphocytes T CD8+ spécifiques générés chez un même répondeur peut atteindre un facteur voisin de 10 en fonction du donneur de DC du panel.

Nous démontrons de plus que cette amplification lymphocytaire T CD8+ est fonctionnelle s'accompagnant d'une potentialisation de l'activité cytolytique.

Enfin, la polarisation des réponses immunes observées en présence de DC allogéniques a été analysée par le dosage des cytokines dans les surnageants de culture. Une réponse de type Th1 est retrouvée avec la présence de taux très élevés de 2 cytokines, TNF- α et IL-2, comparativement aux co-cultures autologues.

Conclusion : cette approche *ex vivo* permet d'identifier au sein d'une collection pour un sujet donné des DC allogéniques capables de constituer de puissants adjuvants pour une réaction immune anti-tumorale spécifique.

4. Individualisation *ex vivo* des meilleurs candidats cellulaires dendritiques issus de donneurs sains pour une réponse antitumorale performante chez un patient porteur d'un cancer.

4.1. Ex Vivo Identification of Highly Potent Dendritic Cells from Normal Donors Capable of Improving Anti-tumor T-Cell Responses from HLA-A2 matched Cancer Patients.

J.C. Eymard, A. Gervais, E. Toulmonde, J. Bernard.

J of Immunother, en finalisation pour soumission

L'objectif de cette étude a été de vérifier chez des patients suivis pour un cancer les résultats obtenus chez les donneurs sains dans le cadre d'une étude physiologique clinique avec consentement éclairé de type loi Huriet : le protocole ALLOVACS.

Ex Vivo Identification of Highly Potent Dendritic Cells from Normal Donors Capable of Improving Antitumor T-Cell Responses from HLA-A2 matched Cancer Patients.

J.C. Eymard, A. Gervais, E. Toulmonde, J. Bernard.

INTRODUCTION

Despite the current development of different therapeutic vaccine designs, there remains the huge challenge of eliciting destructive immune responses to weakly immunogenic antigens expressed by tumors. The critical preliminary of an effective tumor immunotherapy is the stimulation of a systemic T-cell response to tumor peptides presented by self human leukocyte antigen (HLA) molecules. As the high precursor frequency for direct T-cell allorecognition involves an extraordinarily strong response to allogeneic MHC molecules, harnessing of the allogeneic responses has been suggested to promote immune eradication of advanced cancer [Fabre 2001]. Accordingly two alternative strategies have recently been explored for augmenting self MHC-restricted T-cell responses to tumor peptides using this approach.

The first alternative is based on the use of allogeneic tumor cells displaying a large number of antigens, delivered either as tumor lysates or whole cells [Xue 2007]. However, allogeneic tumor cells are not professional antigen-presenting cells (APCs) [Dunn 2002] and have been described as poorly immunogenic [Wang 1998]. The addition of BCG [Sondak 2006] or the introduction of genes encoding HLA [Hu 1998], costimulatory molecules [Dols 2003, Raez 2004], or cytokines [Small 2007], has enabled the development of combined adjuvant effects. Early human trials have demonstrated this strategy to be safe and suggested a clinical benefit currently under investigation in ongoing large-scale studies. The recognition that dendritic cells (DCs) are key regulators of immune responses with superior ability compared with other APCs, together with the development of techniques to obtain large numbers of DCs in vitro from isolated monocytes, has opened new therapeutic perspectives with their introduction as adjuvants in vaccination strategies. Different methods have been developed to load DCs with allogeneic tumor material, including tumor RNA [Mu 2005], tumor lysates [Holtl 2002], and dying tumor cells, to induce antigen-specific immune responses [Neidhardt-Bérard 2004, Palucka 2006]. A more recent and sophisticated adjuvant option uses autologous APCs fused

with allogeneic tumor cell lines [Gong 2000, Koido 2005]. This strategy based upon allogeneic tumor material has significant advantages over autologous vaccines in terms of availability for patients and provides a certain degree of standardization allowing large-scale treatments. On the other hand, obtaining suitable quantities of specific tumor cells can be difficult for some types of cancer and the efficiency of the fusion process is very variable yielding relatively few hybrid cells in some cases [Koido 2007].

The second strategy explores the attractive potential of allogeneic professional APCs that express HLA class I or class II alleles syngeneic with the patient for self MHC-restricted presentation of tumor peptides. Delivery of tumor antigens to allogeneic APCs can be achieved either by pulsing with peptides, or by loading with recombinant proteins [Peiper 1997, Peshwa 1998, Santegoets 2006] or autologous tumor cells [Fujii 2001, Höltl 2005], or by generating hybrid cells by fusion with autologous tumor cells [Märten 2003, Trefzer 2005]. In vitro studies show a powerful ability of allogeneic APCs to generate tumor peptide-specific responses whatever the antigen delivery system used. Analysis of early clinical trials shows that allogeneic APC therapy is feasible and well tolerated. However the clinical benefit measured by regression of tumors in patients with metastatic disease has only been reported in a fraction of patients. The first results of hybrid cell vaccination for the treatment of patients with advanced malignant melanoma described few responses but reported a notable extension of survival time compared with historic controls [Trefzer 2005]. Unfortunately, the immunological and clinical responses do not correlate in that clinical non-responders and responders react equally for induction of circulating and functionally active T cells. One possible interpretation of these data is that the DCs used for vaccine generation often did not express HLA-A2.1 presenting the epitopes used for immune monitoring. Taken together, these data are in favor of a potential antitumor efficacy induced by allogeneic DCs. However, the full potential of the interaction between concomitant alloreaction and antitumor response has not been systemically evaluated.

We explored this question with an original *ex vivo* system using the HLA-A2 binding peptide MART-1 as a model tumor antigen with stimulator (DC) and responder (lymphocyte) cells matched for HLA-A2 to allow self MHC-restricted presentation of the tumor peptide. We first compared the intensity of antigen-specific immune response following priming with either allogeneic DCs obtained from healthy donors or autologous DCs from cancer patients. We found that randomly chosen allogeneic stimulation generates a better response compared with

autologous conditions, but interestingly, can be strongly amplified by screening of DCs from a larger panel of different donors. The results suggest that heterogeneity can be attributed both to characteristics of cells from cancer patients and to variations among DCs from donors. Secondly, we demonstrated that allogeneic stimulation creates a favorable cytokinic and cellular microenvironment resulting in induction of other immune effectors, NK and NK-T cells. Finally, we found that allogeneic DCs are also able to extend the memory of the immune response by generating higher frequencies of central memory T cells.

MATERIALS AND METHODS

Cancer Patient and Healthy Donor selection

Cancer patients were eligible for enrolment on this study if they were HLA-A2 positive and presented an early breast cancer with an indication for post-operative adjuvant chemotherapy according to the risk factors as defined by the updated guidelines of St Gallen Conference [Goldhirsch 2005], or a metastatic hormone-refractory prostate cancer requiring a first-line docetaxel-based chemotherapy, considered as the new standard therapy [Petrylak 2004, Tannock 2004]. Peripheral blood samples (100mL) were collected from patients recruited at Institut Jean Godinot, the Regional Cancer Center of Champagne Ardenne. Signed written informed consent was obtained as a condition of patient registration and before HLA typing. Eligibility requirements also included: age at least 18 years; Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status of 0 or 1; normal hematologic parameters and adequate renal, hepatic, and metabolic function. Exclusion criteria included previous malignancy except basal cell carcinoma of the skin; prior chemotherapy, radiotherapy or immunotherapy against cancer; significant comorbidities such as cardiac disease; concurrent chronic immunosuppressive therapy; positive test for hepatitis B surface antigen, hepatitis C or HIV antibodies performed at the time of the screening. The study protocol was approved by the Comité de Protection des Personnes dans la Recherche Bio-Médicale de Champagne-Ardenne in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and guidelines on Good Clinical Practice.

A collection of blood leukocyte-enriched fractions from HLA-A2+ healthy donors was realized by agreement with the blood bank, the Etablissement Français du Sang (EFS) Nord de France on its site at Reims. Blood donors were subjected to detailed donor selection criteria and microbiologic screening as laid down by the EFS. After informed consent was obtained, a leukocyte-enriched fraction of 300mL was collected by leukapheresis from each HLA-A2+ volunteer.

Lymphocyte and monocyte isolation, culture and cryopreservation

The following isolation procedure was similar for patients or healthy blood donors, the only difference remained in the drained volume, 100mL and 300mL respectively, and in the capacity of the elutriation chambers (Beckman Coulter, Roissy CDG, France), 5mL and 40mL respectively. Buffy coat was first separated by density gradient centrifugation using lymphocyte separation medium (1.077g/dl; Eurobio, Les Ulis, France) at 2600 rpm for 20 minutes and washed twice with RPMI medium (Eurobio) containing 1% human AB serum (BioWest, Nuaillé, France) for 10minutes at 1300rpm. Thereafter, lymphocytes and monocytes were isolated by counterflow centrifugation using the Beckman JE 5.0 centrifuge (Beckman Coulter), adapted from procedure previously described [Bernard 1998]. The lymphocyte-rich and monocyte-rich fractions thus obtained were then washed and concentrated on the Cytomate automate (Nexell) in RPMI medium containing 1% human AB serum. Lymphocytes were mixed with a freezing medium containing 80% Human serum albumin (HAS) (LFB, Les Ulis, France) and 20% DMSO (Sigma-Aldrich, Stenheim, Germany) and stored at -196°C in gas phase nitrogen until required. Purified monocytes were frozen as described above and further cultured to produce DCs. To obtain DCs, blood-elutriated monocytes were seeded to a concentration of 10^6 cells/mL in RPMI medium supplemented with 5% human AB serum, 1% HSA, 800 IU/mL granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (R&D systems, Minneapolis, MN) and 1000 IU/mL IL-4 (R&D systems) and maintained for 5 days at 37°C, in either 6-well plates (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) when cells issued from patients, or LifeCell culture bags (Baxter, Maurepas, France) when from healthy donors. On day 5, TNF α (9ng/mL; R&D systems) and PGE2 (1 μ g/mL; Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) were added to allow DC maturation and the culture was prolonged for another 24h at 37°C before collecting cells.

Antigen-specific lymphocyte elicitation and expansion

Autologous or allogeneic mature DCs were pulsed with 20 μ g/mL of MART-1₂₇₋₃₅ (AAGIGILTV) peptide (NeoMPS, Strasbourg, France) for 1 h and subsequently washed twice to remove excess peptide. Peptide-pulsed stimulator DCs were then mixed with patient lymphocytes and cultured in 96-well plates at a ratio of 1:3 to yield a cell concentration of 1.0×10^6 cells/mL in RPMI medium containing 5% human AB serum and 2 mM L-Glutamine (Eurobio). No IL-2 was added during the culture. Controls were performed with lymphocytes alone with MART-1, with unpulsed DCs or with non HLA.A2 MART-1 pulsed DCs. Assays were performed in triplicate.

Immunomonitoring

Cell count and viability

Lymphocyte viability and absolute number were assessed using a Guava EasyCyte cytometer and Guava ViaCount Reagent (Guava Technologies, Hayward, CA), according to the manufacturer's instructions. Absolute cell subpopulation number was deduced by multiplying the percentage of positive phenotype cells by absolute lymphocyte number.

Phenotype analysis

Cells from cultures were analysed by flow cytometry using an EPICS XL FACS (Beckman Coulter, Miami, FL) or Guava EasyCyte FACS after incubation (at 4°C for 30 min) with the following ECD-/ PE-/ FITC-/ PC5-conjugated mAbs and their corresponding isotypes : anti-V α 24(clone C15), anti-V β 11 (clone C21), anti-CD3 (UCTH1), anti-CD4 (13B8.2), anti-CD8 (B9.11), anti-CD45RO (UCHL1), anti-CD56 (NKH-1), anti-CD69 (TP1.55.3), anti-TCR $\alpha\beta$ (BMA031) from Beckman Coulter/Immunotech (Marseille, France) and anti-CD127 (hIL-7R-M21) from Beckton Dickinson (San Diego, CA). Data analysis was performed with Expo32 (Beckman Coulter), Guava ExpressPlus (Guava) and WinMDI (TSRI, San Diego, CA) softwares.

Tetramer staining

The frequency of MART-1-specific CD8⁺ T lymphocytes was evaluated in the polyclonal population by the use of HLA-A*0201/peptide tetramer. The PE-labelled iTag™ MHC class I MART-1 tetramer (Immunonics/Beckman Coulter) was used according to the manufacturer's instructions and cells were counterstained with anti-CD8. Analysis was performed on an EPICS XL FACS.

Non-radioactive cytotoxicity assays

T cell-mediated cytotoxicity was assayed by flow cytometry against MART-1-pulsed HLA-A*0201 T2 cell line according to a protocol adapted from Lecoeur et al [Lecoeur 2001]. HLA-A*0201 T2 target cells obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) were incubated 10 min at 37°C with 10 μ M CFSE (Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA), washed and counted. MART-1 peptide was previously used at 20 μ g/mL concentration for 45 min at 37°C to pulse T2 cells. The assays were carried out in U-bottomed 96-well plates. Then, 5x10³ target cells per well were mixed with effector cells (E/T: 20/1), incubated for 4 h and 5ml of 1/10 diluted 7-AAD solution (eBioscience, San

Diego, CA) was added in wells for 10 min at room temperature. Spontaneous lysis was assessed by incubation of targets in the absence of effectors. Maximum lysis was determined by incubation of targets in 0.1% Triton X-100 (Sigma). CFSE⁺ 7-AAD⁺ cells were considered as dead target cells. All assays were run in triplicate. One lytic unit (LU) was defined as the number of effector cells required to lyse 50% of 5,000 targets. The number of LU per culture (LU₅₀/culture) was calculated.

Statistical analysis

The Wilcoxon's test was used to test for statistical significance of the differences between stimulation by autologous and allogeneic DCs. Values for $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Patients and Donors

Two groups of HLA-A2⁺ volunteers were enrolled in this study and consented to give a peripheral blood sample. The healthy donor group consisted of 20 individuals (x women, y men). The patient group consisted of 12 with breast carcinoma and 3 with prostate cancer (Table 1). Women presented a non-metastatic disease contrary to men but all had undergone no prior chemotherapy or immunotherapy. Median age was __years (range: __ to __), and patients had ECOG performance status of 0 (n = __, __%) or 1 (n = __, __%) at study entry

Single allele-matched allogeneic APCs can prime antigen-specific T-cells from cancer patients *in vitro*

In our initial experiments, we have assessed the ability of allogeneic APCs to elicit patient antigen-specific T-cell responses against MHC class I binding peptides in an *in vitro* priming model. PBLs from HLA-A2⁺ cancer patients were cultured for 7 days with HLA-A2⁺ peptide-pulsed allogeneic APCs from healthy donors and were thereafter evaluated for the relevant antigen-specific T-cell response using the tetramer assay. Despite the strong expansion of alloreactive T-cells (data not shown), allogeneic HLA-A2⁺ DCs were capable of generating effective melanA/MART-1₂₇₋₃₅ peptide-specific CD8⁺ T-cell response, contrary to control unmatched DCs (Fig.1A). Similar allo-induced antigen-specific priming was observed whatever the HLA-A2 restricted peptide presented (MART-1, M1 or CEA) and whatever the APCs used (DCs, macrophages or monocytes) as shown in Fig. 1B and 1C, respectively.

These data demonstrate that patient alloreactive T-cell expansion does not compete with proliferation of peptide-specific T-cells responding to the same DC.

DCs from healthy donors can be more effective than autologous counterparts in expanding antitumor tetramer⁺/CD8⁺ T-cells from cancer patients

As partially matched allogeneic APCs can induce concurrent alloreactive and antigen-specific T-cell responses in cancer patients, we performed a series of experiments to systemically compare the relative capacities of autologous and allogeneic DCs to promote T-cell activation in response to a target peptide. To constitute panels of stimulator APCs, DCs were grown and matured from monocytes issued from patients and normal donors, as we previously described []. DC samples were cryopreserved and used later to initiate pairs of peptide-specific T-cell cultures as follows: lymphocytes from each patient were mixed either with their own DCs pulsed with MART-1 to initiate autologous cultures (controls), or with pulsed DCs from a random normal donor to initiate allogeneic cultures. The resulting peptide-specific T CD8⁺ expansion was tested on day 7 of the cultures, and finally the relative capacity of DC pairs to promote a naive specific response was expressed as the ratio of antigen-specific T-cell numbers in allogeneic to autologous cultures. When considering data from the cohort of 15 patients (Fig. 2), mature DCs from healthy donors were more effective than autologous counterparts with a 3.5-fold mean increase of the specific T-cell expansion following allostimulation. However, striking differences in expanding specific T-cells were observed among patients. For about a quarter of the patients no or few differences (≤ 2.0 -fold ratio) were observed, whereas for the rest of the cohort allogeneic DCs induced an increase ranging from 2.4-fold to a 10.5-fold ratio, thus generating a maximum of more than 5,000 additional MART-1 specific CD8⁺ T lymphocytes per million primed PBLs as compared to the control culture. This remarkable pattern of T-cell responses can lead to the suggestion that DCs from normal donors may exhibit very heterogeneous capacity to stimulate peptide-specific T-cells from patients in our experimental conditions.

Detection of highly potent allogeneic DCs for the priming of antigen-specific T-cell responses from cancer patients

To address the relevance of this intriguing pattern of expansion, we next challenged lymphocytes from the patient #10 with a panel of allogeneic DCs obtained from 9 normal donors. As shown in Figure 3A, individual DCs displayed very heterogeneous priming capacity and MART-1 tetramer+ CD8+ T cells were present in the cocultures at a much higher proportion (30-fold) in presence of the most potent allogeneic DCs compared with the less efficient DCs. The experiment was re-conducted with the same DC panel for two other patients, Pt#03 and Pt#07, and a similar pattern of allogeneic antigen-specific T cell expansions was found again with specific T cell expansions ranging from 1 to 10 and 1 to 30 respectively.

These data prompted us to study for the Patient # 10 powerful implications of a larger DC panel constituted with 18 healthy volunteers. As expected, extended priming range was observed with one individual DC preparation able to induce up to 50-fold expansion, as shown in Figure 3B. From a practical point of view, such an experimental design may enable us to identify for each patient high performance APCs within a cell collection constituted from multiple healthy donors, and then to proceed to a preferred DC preparation with this capacity.

Highly potent allogeneic DCs also amplify both antitumor cytolytic capacity and memory response

A caveat with a rapid and strong T cell expansion induced by allogeneic APCs may be the risk of generating dysfunctional cells, rendered either anergic or stunned during the process. We therefore assessed effector and memory functions of antigen-specific CD8+ T cells following their allo-expansion. Specific tumor cell lysis was evaluated using MART-1-pulsed T2 cells as targets. As shown in Figure 4, much higher cytolytic activity was found in allogeneic cocultures for the 4 patients. These data show that vigorously expanded peptide-specific CD8+ T cells exhibit CTL effector functions and can be defined as fully functional.

To obtain an overview of the central memory T cells (T_{CM}), we analyzed the responder lymphocyte populations using flow cytometry, focusing on phenotype markers CD3+/CD45RO+/CD62L+. A drastic increase of T_{CM} numbers was obtained within allogeneic co-cultures, reaching up to 2.6-, 7.2- and 7.4-fold for patients #10, # 7 and # 6 respectively (Table 2).

Therefore, to gain insight into functional characterization of this expanded TCM subset, we followed the Ag-specific T cell response to 2 successive DC stimulations in a representative patient (Pt#10). PBLs were stimulated for one week by either autologous or allogeneic DCs, and the numbers of peptide-specific CD8⁺ T cells were assessed. After that, the primed lymphocytes were washed, re-plated at the same number, and both cultures were boosted with autologous peptide-pulsed DCs for one additional activation round. As shown in figure 5, resulting numbers of tetramer positive cells were roughly 2-fold greater in cultures issued from allogeneic priming compared to autologous controls. Thus, this boost with autologous DCs allows to elicit higher and more rapid specific CD8⁺ effector T cells due to superior induction of memory cell subset by allogeneic priming. In excellent agreement with above data, allogeneic DC priming approach can be efficiently used to expand functional memory T cells among Ag-specific CD8⁺ T cells.

Investigating the concurrent effect of normal donor DCs on innate antitumoral immunity of cancer patients

Several publications in recent years have indicated that DCs interact not only with T lymphocytes but also with NK and NKT cells [Fernandez 1999, Ferlazzo 2002, Gerosa 2002, Mailliard 2003, Ferlazzo 2004, Brigl 2004...]. Therefore we compared the relative abilities of allogeneic and autologous DCs to promote NK and NKT cell expansion. Lymphocytes from 4 cancer patients were primed with autologous or allogeneic DCs and, expanded lymphocytes were analyzed for expression of CD3-56⁺ cell phenotype and invariant V α 24/V β 11 T-cell receptor on day 7. As shown in Table 3A, enhancement of NK cell expansion was observed in allo-induced lymphocytes with a more than 4-fold mean increase and a maximal expansion of 7.7-fold (Pt#07).

We also addressed the ability of allogeneic DCs to stimulate NKT cell responses. As shown in Table 3B, the generation of NKT cells was increased notably with stimulation by allogeneic DCs. A maximal 9.5-fold increase has even been noted for the patient Pt#03. Allogeneic HLA-A2 matched DCs promote the expansion of not only specific cytolytic T-cells but also heterogeneous cell subsets useful for a more complete and prolonged anti-tumor efficiency with both NK and NKT cell responses.

DISCUSSION

Previous studies in animal and human models have demonstrated the possibility of generating HIV- or tumour-specific T cell responses using partially HLA-matched DCs. In agreement with these data, we show in this study that allogeneic DCs from normal donors can prime virus and tumour peptide-specific CD8⁺ T cells from HLA-A2 matched cancer patients *ex vivo*. Interestingly, our results reveal that DCs from different donors display variable priming capacity and that certain DCs are more effective than autologous counterparts to induce a vigorous expansion of tumour peptide-specific patient T lymphocytes. As a consequence, screening of normal donors DCs using a relevant experimental device results in the identification of highly efficient DCs that are capable to strongly augment not only cytotoxic effector and memory T cell responses, but also essential components of anti-tumour innate immunity as NK and NKT cell expansion. To our knowledge, this is the first evidence that demonstrates the possibility to select allogeneic APCs in healthy donor panels to amplify anti-tumour immunity of a cancer patient *ex vivo*.

The purpose of this study was to evaluate the feasibility of accessing to partially HLA-matched allogeneic monocyte-derived DCs from normal donors able to trigger the generation of an intense *in vitro* antitumor response of lymphocytes issued from cancer patients. Previous studies demonstrated the possibility of generating antigen-specific immune responses using partially HLA-matched DCs against several relevant peptides, such as AIDS [] and tumor peptides [], in animal and human models. We then decided to systematically compare the relative abilities of autologous and allogeneic DCs to successfully promote a tumor peptide-specific CD8⁺ T cells in cancer patients as this is considered crucial for an effective antitumor response []. As expected, we have confirmed but also extended the notion that allogeneic DCs are able to generate antigen-specific CD8⁺ T cells *in vitro* against three HLA-A2 restricted peptides : MART-1, Influenza M1 and CEA. Importantly, at least one single HLA-matched allele between allogeneic DCs and responder lymphocytes is necessary and sufficient for CTL priming. Interestingly, we demonstrated that certain DCs from normal donors can be more effective than their autologous counterparts to induce a vigorous expansion of tumor peptide-specific T lymphocytes from patients in our experimental conditions. In addition, we observed important functional differences between mature allogeneic DCs issued from panels of normal donor APCs. To our knowledge, this is the first study that demonstrates the feasibility of individualization, within an allogeneic APC panel, of highly efficient DCs that are characteristic for a tested patient. This *ex vivo* approach even permits the access to still more

efficient DCs by enlarging the size of the studied panel. Finally, with such individualized DCs one can obtain ample numbers of not only peptide tumor-specific but also other essential components of antitumor responses represented by the innate immunity with NK and NKT cells on the one hand and memory T cells on the other hand.

Allogeneic DCs might tip the immune balance towards superior antitumor immunity in three critically important ways. First, bypassing potentially insufficient autologous DCs from cancer patients to stimulate PBLs is of evidence. Suppressed DC function has been reported in both tumor-bearing animal models and cancer patients []. For several types of cancers, DCs isolated from patients demonstrated decreased expression of costimulatory molecules and other functional deficiencies [Brown Yang]. Moreover, cancer patients can also show a decrease in the absolute numbers of mature DCs in the peripheral blood and lymph nodes []. Second, the strong allogeneic response to HLA molecules of donor DCs might induce a massive tumor peptide-specific response than autologous DCs, as extensively discussed by Fabre []. Since an estimated 1-10% of the circulating T cell repertoire is directed against foreign HLA of another individual [Sherman 1993, Suchin 2001], allogeneic DCs may be expected to trigger a broadly reactive T-cell response with two possible advantages: (1) activation of tumor-reactive T cells through fortuitous cross-reactivity and (2) allo-antigens on the DCs may provide Th epitopes aiding in the optimal activation of CTL against the tumor peptides presented by the shared HLA class II molecules. Thus, the extraordinarily high precursor frequency for direct T-cell allorecognition may promote an effective T-cell response to self HLA-restricted tumor peptides. Third, allogeneic responses, by strong recruitment and activation of both T cells- including CTL -and NK cells, have the potential to provide a milieu rich in cytokines and T-cell costimulatory ligands for the promotion of effective T cell responses. This process results in massive amplification of the antineoplastic inflammatory reaction that turns an indolent inflammatory status into an acute process promoting tumor destruction [Mantovani 2008]. By this way, quiescent lymphocytes from patients can readily recover full effector function.

Mechanistically this report provides the first controlled evidence of interindividual variability in immunogenicity between tumor peptide-pulsed DCs obtained from multiple HLA-A2+ normal donors. This variability may be due to the combination of two main factors, degree of HLA mismatching and intrinsic properties of allogeneic DCs. Although there are some limitations in interpreting the superiority of certain allogeneic DCs for each cancer patient,

original finding of our approach is to present an individualized screening test for selection of DC donors.

Our work not only provides important confirmatory data on the feasible identification of highly potent allogeneic DCs that are characteristic for a cancer patient evaluated but also forms the potential basis for clinical applications. Our experimental approach reported here might be useful in identifying the best cell candidate for an adoptive immunotherapy. This major advantage of in vitro use of a well-defined and appropriate allogeneic DC product represents a considerable logistic advantage. Given that the immune response pathways in cancer patients may be impaired [], ex vivo generation of antigen-specific CTL for reinfusion is an attractive option. To ensure a robust and long response the infused T cells must be able to expand in response to further stimulation in vivo. This entails two conditions. First, infused T cells must contain, in addition to peripheral effectors, sufficient numbers of T_{CM} which will expand in response to antigen stimulation in vivo. In support of this, we show that peptide-primed T cells generated in allogeneic co-cultures include cells with a central memory phenotype. Second, antigen presentation mechanisms in vivo must be effective at driving the expansion of these T_{CM} . Thus, a dual approach combining both adoptive cellular therapy with ex vivo generated tumor peptide-specific CTL and immunization with in vivo peptide-loaded autologous DCs may be appropriate.

In conclusion, we have shown, using matched allogeneic DCS, the feasibility of ex vivo generation of not only peptide-specific CTL but also NK and NKT cells from patients. We also describe a co-culture system based on allogeneic cell panel from normal donors that provide the platform for a tailored immunotherapeutic strategy in cancer patients.

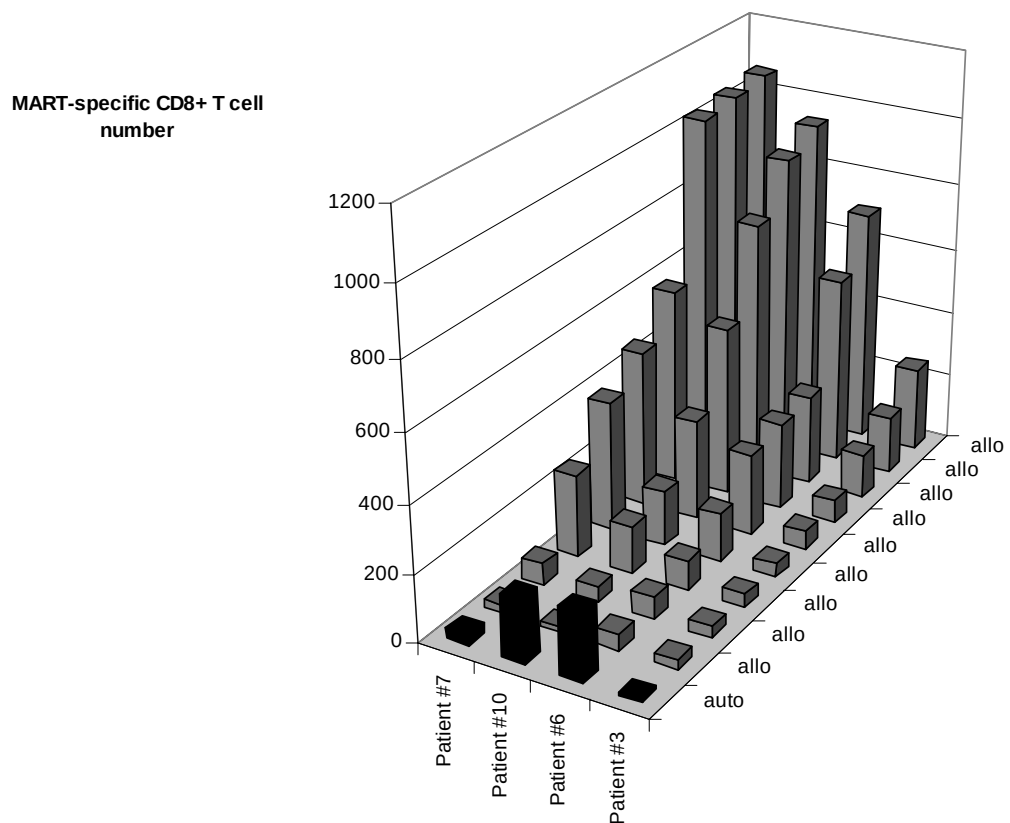


FIGURE 3 : Antigen-specific CD8+ T cell responses following screening of allogeneic DC. PBL from 4 HLA-A2⁺ patients were co-cultured with target peptide-pulsed autologous (auto) (*black histogram*) or allogeneic DCs (allo) (*grey histogram*) from a panel of 9 different HLA-A2⁺ donors. At day 7, the number of antigen-specific CD8+ T cells was evaluated by flow cytometry following relevant tetramer staining. Data are sorted by increasing order. This graphic shows representative data from one of three independent experiments.

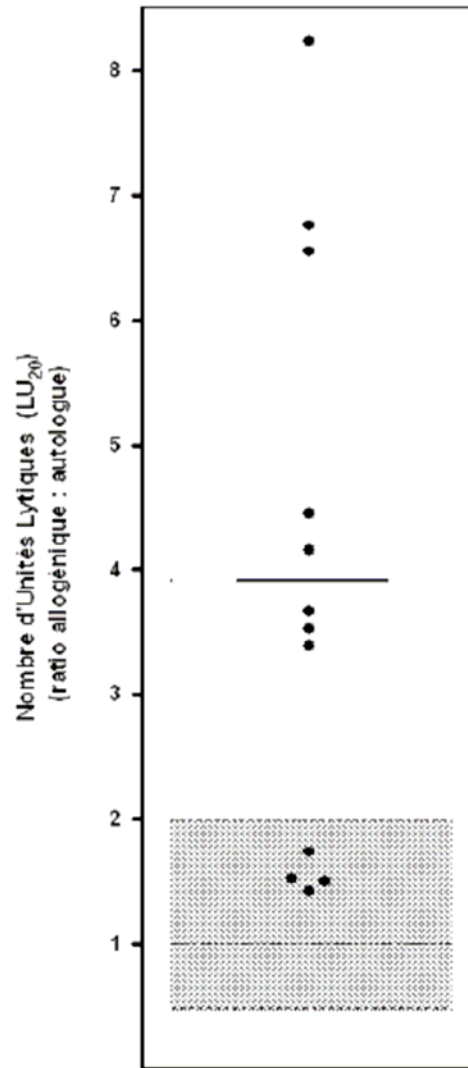


FIGURE 4: Comparison of specific cytolitic activity of T lymphocytes generated by coculture with pulsed autologous DCs from cancer patients and allogeneic DCs from healthy donors, respectively. The stimulated T lymphocytes were incubated with MART-1-pulsed TAP-deficient T2 cells as targets at an ratio of E/T of 20:1. The assays were performed in triplicate and data are expressed as lytic units. Values for allogeneic stimulations were selected as the most efficient out of the 3 healthy donor-derived DCs tested randomly for each of the 10 patients (displayed as the mean $\pm$ SD of triplicate wells)

4.2. Résumé :

L'immunothérapie anti-tumorale, 5ème modalité de traitement du cancer après les traitements conventionnels (chirurgie, radiothérapie, hormonothérapie, chimiothérapie cytotoxique), ne semble pas encore suffisante à l'heure actuelle pour engendrer une éradication tumorale. Les effecteurs immuns des patients subissent des altérations et des modifications imposées par la tumeur. Une approche basée sur l'intervention de DC allogéniques permet d'espérer la génération d'une réponse effectrice anti-tumorale massive et destructrice par le biais de la puissance de l'alloréaction induite.

Résultats : Deux collections cellulaires ont été constituées à partir d'un échantillon de sang périphérique. Le groupe des patients comportait 3 hommes porteurs d'un cancer de la prostate hormono-résistant vus avant chimiothérapie de rattrapage, et 12 femmes atteintes d'un cancer du sein avant mise en route d'une chimiothérapie adjuvante. Vingt donneurs sains ont constitué le deuxième groupe. Patients et donneurs étaient de phénotype HLA-A2+. Dans une première étape, nous avons confirmé que seules les DC allogéniques matchées et pulsées avec le peptide tumoral modèle étaient capables de générer une réponse T CD8+ spécifique du peptide. Comme dans l'étude précédente et malgré le contexte suppresseur induit par la tumeur, nous montrons que les DC allogéniques sont capables de briser cet état de tolérance et de générer une expansion T spécifique 3,5 fois supérieure en moyenne.

Le schéma hétérogène d'expansion observé nous a également incités à élargir le panel à 9 donneurs sains de DC activatrices permettant d'observer des expansions T spécifiques augmentant d'un facteur 10 voire même 30. Cette observation nous a permis de poser les bases d'un test de détection de DC hautement performantes pour un sujet donné et donc d'accéder à des préparations dendritiques préférentielles au sein d'une collection cellulaire. La fonctionnalité des cellules T générées a été confirmée par l'augmentation de la capacité cytolytique anti-tumorale et l'amplification de la réponse mémoire. Enfin, cet effet activateur des DC allogéniques s'exerce aussi sur le compartiment inné de la réponse immune.

Conclusion : la disponibilité d'une collection de DC allogéniques issues de donneurs sains permet d'identifier pour tout patient porteur de cancer, au besoin en élargissant le panel activateur testé, des DC de hautes performances capables d'induire une réponse anti-tumorale optimale associant les principales composantes de la réponse immune.

DISCUSSION

et

PERSPECTIVES

III. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Tentative d'optimisation de l'efficacité d'une monochimiothérapie de référence par combinaison à un autre agent (article 1)

L'étude que nous avons menée, la TAX-20105, est le premier essai clinique randomisé de phase II évaluant parallèlement la monochimiothérapie de référence représentée par le docetaxel (D) et l'association docetaxel/estramustine (D/E).

Le phosphate d'estramustine, conjugué stable d'oestradiol et d'une moutarde azotée, présente à la fois des effets hormonaux et non hormonaux *in vivo* [Hudes, 1997]. Il agit par inhibition de la fonction des microtubules cytoplasmiques en se fixant à la fois sur la tubuline [Dahllof *et al.*, 1993 ; Laing *et al.*, 1997 ; Speicher *et al.*, 1994] et sur des protéines associées à la tubuline (microtubule-associated proteins) [Tew *et al.*, 1992]. Son activité clinique en monothérapie est faible avec un taux de réponse de 5 à 19% [Joly et Tannock, 2004]. Cependant son mécanisme d'action inhibiteur des microtubules a conduit à l'hypothèse d'une synergie possible avec d'autres poisons du fuseau, comme le docetaxel, avec pour corollaire une augmentation de l'effet anti-tumoral. Le rationnel de l'association D/E a été confirmé dans certains modèles expérimentaux [Oudard *et al.*, 2003 ; Williams *et al.*, 2000 ; Hamilton et Muggia, 2001]. En clinique, plusieurs études antérieures de phase I-II évaluant une association D/E ont montré un taux de réponse apparemment plus élevé pouvant faire espérer un gain de survie pour les patients [Petrylak *et al.*, 1999 ; Kreis *et al.*, 1999 ; Weitzman *et al.*, 2000 ; Savarese *et al.*, 2001 ; Sitka Copur *et al.*, 2001 ; Sinibaldi *et al.*, 2002].

Nous avons donc construit et coordonné avec le laboratoire Sanofi-Aventis l'étude TAX-20105 multicentrique française de phase II dans laquelle des patients chimio-naïfs présentant une maladie hormono-résistante progressive ont été randomisés pour recevoir soit docetaxel 75 mg/m² J1 reprenant à J21, soit docetaxel 70 mg/m² (J2) + estramustine 280 mg/jour (J1 à J5) reprenant à J21. Une prophylaxie anti-coagulante systématique par coumadine 1 mg/jour était systématiquement associée dans le bras D/E. Le critère principal de jugement était la réponse biologique sur le PSA (diminution ≥ 50 %).

Ainsi, 92 patients non prétraités par D ou E ont été inclus sur 12 institutions françaises. L'analyse de l'efficacité a montré un taux de réponse biologique en intention de traitement un peu plus de deux fois supérieur dans le bras combiné D/E (68 %

versus 30 %), avec également une amélioration de la médiane du temps jusqu'à progression biologique (5,7 versus 2,9 mois). La médiane de survie globale a été de 19,3 mois pour D/E contre 17,8 mois pour D seul. Sur le plan de la tolérance, trois patients (6,4 %) ont présenté une complication phlébitique malgré la prophylaxie anticoagulante dans le bras D/E, ces événements étant possiblement imputables à l'estrामustine.

Au total, nos résultats en termes de réponse biologique et de survies sont en accord avec ceux des essais non randomisés précédemment publiés qui étudiaient un schéma docetaxel/estrामustine [Kreis *et al.*, 1999 ; Petrylak *et al.*, 1999 ; Weitzman *et al.*, 2000 ; Sitka Copur *et al.*, 2001 ; Savarese *et al.*, 2001 ; Sinibaldi *et al.*, 2002] avec des taux de réponse du PSA de 45 à 65 % et des médianes de survie globale de 13 à 20 mois. Il en est de même avec les conclusions d'une large étude multicentrique de phase II coordonnée par S. Oudard *et al.* [2005], le protocole CP-2000-01 ayant comporté un effectif plus important de patients. Cette étude a comparé deux schémas d'utilisation de docetaxel et d'estrामustine à l'association antérieure de référence, le schéma M/P. Le docetaxel était administré tous les 21 jours à la dose de 70 mg/m² (bras A) ou selon un fractionnement J1 et J8 (bras B) à la dose de 35 mg/m², l'estrामustine étant débuté la veille de chaque perfusion de docetaxel et délivré ensuite pendant 4 jours à la dose de 280 mg x 3/jour. Sur le total des 127 patients inclus et évaluable, 85 ont reçu l'association D/E + prednisone dont 43 selon le schéma A et 42 selon le schéma B. Les deux combinaisons D/E ont abouti à un taux de réponse biologique de 67 % et 63 %, une durée médiane de progression du PSA de 8,8 et 9,3 mois pour les bras A et B respectivement. Enfin, dans l'étude SWOG-9916 de phase III rapportée par Petrylak *et al.* [2004] qui comparait D/E et M/P, 338 patients ont reçu docetaxel 60 mg/m² et estrामustine 280 mg x 2/jour pendant 5 jours. Le taux de réponse biologique a été de 50 %, la survie médiane sans progression du PSA de 6 mois, et la durée médiane de survie globale de 18 mois.

Ultérieurement, nos résultats ont été confirmés par une étude italienne de phase II randomisée au design similaire et rapportée par Caffo *et al.* [2008]. De plus, Fizazi *et al.* [2007] ont établi une méta-analyse qui a rassemblé les données de 605 patients issus de cinq études randomisées qui comparaient une chimiothérapie seule (vinca-alcaloïdes ou taxanes) ou avec estrामustine. Sur le plan de l'efficacité, la survie globale est significativement améliorée pour les patients recevant l'association chimiothérapie/estrामustine (HR = 0,77 [IC 95 % : 0,63-0,93], p = 0,008), ainsi que le taux de réponse biologique (RR = 0,53 [0,38-0,72], p < 0,0001) et le temps jusqu'à progression biologique

(RR = 0,74 [0,58-0,94], p = 0,01). Au niveau de la toxicité, les évènements thrombo-emboliques sont plus fréquents avec l'association comparativement à la monochimiothérapie (12 cas sur 271 patients *versus* 1 sur 275).

Au terme de ce bilan, les résultats de notre étude s'intègrent dans un ensemble de travaux démontrant une nette tendance pour un gain d'efficacité en terme de réponse et de survie sans progression avec l'association D/E. L'impact sur la survie ne peut être apprécié que sur la méta-analyse, les autres études précitées comportant des effectifs trop restreints pour pouvoir mettre en évidence une différence significative : le gain sur la survie est estimé à une augmentation en valeur absolue de 9,5 % à 1 an dans la méta-analyse.

Toutefois, les résultats concordants de cette série d'études ont été contredits par une troisième étude de phase II randomisée récemment publiée [Machiels *et al.*, 2008]. Dans cet essai, 150 patients ont été randomisés pour être traités par docetaxel hebdomadaire (J2, J9, toutes les 3 semaines) + estramustine encadrant pendant 5 jours chacune des perfusions de docetaxel ou docetaxel seul. Cet essai ne retrouve pas de différence sur la réponse biologique et le temps jusqu'à progression entre les 2 bras. Bien que cette étude ait inclus un plus grand nombre de patients, il faut souligner un critère d'inclusion différent autorisant un traitement préalable par estramustine qui a conduit à un total de 38 patients prétraités dans cette étude ce qui peut atténuer la puissance nécessaire pour mettre en évidence cette différence.

Dans cette situation clinique où le bénéfice espéré pourrait être limité, la réalisation d'une étude de phase III serait indiquée mais nécessiterait l'inclusion d'un trop grand nombre de patients.

Les résultats à venir de l'étude néo-adjuvante GETUG 12 intégrant le schéma D/E pourront être utiles pour faire progresser la stratégie des futures études.

De plus, les progrès récents dans la compréhension des mécanismes biologiques de l'hormono-résistance laissent espérer le développement d'associations avec des thérapies ciblées où le docetaxel offre des possibilités de combinaisons avec de nombreux agents du fait de son activité intéressante et de son bon profil de tolérance. Ainsi, l'immunothérapie constitue une possibilité d'association dans cette indication. Un grand nombre de thérapies vaccinales sont en voie d'évaluation pour stimuler la reconnaissance des Ag tumoraux dans les cancers de la prostate. Le vaccin GVAX composé de cellules tumorales allogéniques transfectées par le gène du GM-CSF a été étudié récemment dans deux

études de phase III. La première étude (VITAL-1) a été fermée au recrutement en juillet 2007 après l'inclusion de 626 patients asymptomatiques métastasés hormono-résistants qui ont été randomisés entre vaccination ou chimiothérapie par docetaxel. La deuxième étude (VITAL-2) avait quant à elle l'objectif d'évaluer le bénéfice de l'association vaccin + docetaxel comparativement à la chimiothérapie seule. Il faut souligner que l'étude VITAL-2 a dû être fermée prématurément le 27 août 2008 en raison d'un excès d'évènements indésirables graves dans le bras combiné. De plus, les résultats d'une analyse statistique intermédiaire effectuée pour VITAL-1 ont montré que cet essai n'atteindrait vraisemblablement pas son objectif d'efficacité, en l'occurrence une augmentation de la survie de 33 %. L'échec des tentatives de vaccination par ce type d'approche renvoie à l'impérieuse nécessité de l'exploration de nouvelles pistes d'immunothérapie.

2. Production et analyse de cellules dendritiques dotées de propriétés migratoires propices à leur efficacité clinique (article 2)

Depuis les années 1990, les thérapies cellulaires vaccinales à base de cellules dendritiques ont été développées chez des patients porteurs de cancers évolués. L'utilisation de DC en clinique a été rendue possible grâce à la connaissance récente de la physiologie des DC et aux nouvelles technologies qui ont permis la génération de grands nombres de DC autologues à partir de progéniteurs CD34+ [Caux *et al.*, 1996 et 1997 ; Siena *et al.*, 1995] ou de monocytes [Sallusto et Lanzavecchia, 1994 ; Zhou et Tedder, 1996 ; Romani *et al.*, 1994 ; Bernard *et al.*, 1998] sanguins.

L'intérêt manifesté pour les DC dans cette stratégie thérapeutique vaccinale repose sur leur rôle unique d'adjuvant naturel de l'immunité. Ces cellules présentatrices professionnelles de l'antigène sont, en effet, les seules capables d'induire une réponse immune primaire au niveau des organes lymphoïdes secondaires (ganglions), capacité reposant sur leur mobilité qui leur permet d'aller des tissus périphériques où elles captent les antigènes aux organes lymphoïdes secondaires où elles activent les lymphocytes T spécifiques. La preuve de concept apportant la démonstration formelle *in vivo* de l'immunogénicité des DC chargées par un antigène a été initialement rapportée par Dhodapkar *et al.* [1999] qui ont montré qu'une injection unique de DC chargées induisait rapidement une réponse lymphocytaire T spécifique contrairement à l'injection de l'antigène seul. Cependant, les essais cliniques révèlent une réponse immunologique chez

les patients, rarement accompagnée d'une régression tumorale objective. Deux paramètres peuvent rendre compte de la faible efficacité des cellules vaccinales injectées au patient : une faible migration des DC du site d'injection vers les ganglions proximaux, et un potentiel d'activation insuffisant compte tenu de la faible immunogénicité des antigènes exprimés par les cellules malignes et des mécanismes d'échappement mis en place par la tumeur.

Parallèlement à l'optimisation des capacités immunostimulatrices des DC, l'exploration de leurs propriétés migratoires apparaît donc comme stratégiquement critique pour accroître leur efficacité clinique. Après conditionnement *ex vivo*, les cellules du produit vaccinal injecté doivent être capables de migrer du site d'injection vers les organes lymphoïdes secondaires pour exercer leur fonction. La mobilité des DC se fait par une série d'attachements et de détachements à la matrice extracellulaire et par des passages vasculaires. Nous avons différencié et maturé des DC à partir de monocytes sanguins issus de donneurs sains en présence du cocktail GM-CSF et IL-4, additionné de TNF- α et PGE2. Les mDC ainsi obtenues présentent un profil enzymatique particulièrement favorable à leur migration (haute mobilité, forte expression de MMP-9 et faible taux de TIMP-1) au travers des tissus à partir du site d'injection, contrairement aux iDC.

Sur le plan des essais thérapeutiques, l'insuffisance de maturation des DC réinjectées peut expliquer, en partie, la faiblesse des résultats observés. La prise en compte des capacités de migration du produit cellulaire dendritique à injecter devrait faire l'objet du contrôle de qualité de toute thérapeutique vaccinale. Ce travail établit ainsi des conditions de culture GMP et de contrôle qui permettent d'accéder à des DC de grade clinique satisfaisant au cahier des charges requis.

Cette exploration des capacités migratoires des DC soulève le problème clinique de la voie optimale d'injection thérapeutique pour une meilleure mobilité de ces cellules. Les modèles murins permettent de comparer directement différentes voies d'injection en terme d'efficacité : ils mettent ainsi en évidence une supériorité de l'injection *in situ* sur la voie sous-cutanée [Saika *et al.*, 2004], elle-même plus efficace que la voie IV [Huck *et al.*, 2008]. La transposition à l'homme est difficile mais des comparaisons indirectes ont été faites très récemment dans un article de synthèse qui regroupait 38 études pour un total de 626 patients traités par DC pour un mélanome [Engell-Noerregaard *et al.*, 2009]. Les auteurs concluent à l'absence de supériorité apparente d'une voie spécifique d'injection mais émettent des réserves liées aux nombreuses déviations mineures en rapport avec les différents schémas thérapeutiques réalisés. Ce point mérite des études de biodistribution comparée des différents types d'injections vaccinales dendritiques chez l'homme.

3. Amplification de l'immunité anti-tumorale de donneurs sains par des DC allogéniques (article 3)

Dans cette étude fondamentale, nous avons d'abord établi clairement que des DC d'un donneur sain A pulsées avec le peptide MART-1 induisent une réponse lymphocytaire T CD8+ spécifique d'un répondeur B, si et seulement si, les sujets A et B partagent la molécule HLA de classe I qui restreint la présentation du peptide d'intérêt, en l'occurrence HLA-A2 pour MART-1. Ce résultat a été retrouvé avec d'autres peptides tumoraux et viraux (ACE, Influenza M1) et élargi à d'autres cellules présentatrices d'antigènes (monocytes, macrophages).

Pour déterminer si des DC allogéniques peuvent influencer une réponse concomitante, et éventuellement augmenter le nombre d'effecteurs spécifiques générés, les lymphocytes de 30 sujets sains ont été cultivés en présence de DC autologues ou allogéniques pulsées avec le peptide MART-1. Globalement les DC allogéniques induisent en moyenne 3,5 fois plus d'effecteurs T CD8+ spécifiques que les cellules autologues. Cependant, cette augmentation moyenne masque des variations individuelles remarquables : la présentation allogénique induit, dans certains cas, des réponses de l'ordre de celles observées en présence de DC autologues, alors que dans d'autres cas une forte amplification de la réponse est observée de l'ordre de 14 fois par rapport au contrôle autologue. L'étude a été répétée sur une autre cohorte de 34 sujets sains en réponse au peptide Influenza M1 : elle confirme l'augmentation moyenne de près de 4 fois avec l'induction dendritique allogénique et à nouveau de fortes variations individuelles sont générées avec des amplifications proches d'un facteur 20 dans les meilleurs cas.

Le modèle de réponse observé dans les 2 cohortes précédentes nous a amenés à examiner les réponses d'un même répondeur face à un panel de DC issues de donneurs sains différents. Les lymphocytes de quelques sujets ont été stimulés dans une série de cultures parallèles en présence de DC pulsées provenant de 12 donneurs différents. L'analyse des résultats révèle que l'amplitude de la réponse T spécifique induite dans de telles conditions est propre à chaque combinaison ; en d'autres termes, un même répondeur génère une réponse T spécifique variant considérablement en fonction du donneur utilisé comme source de cellules présentatrices. Dans notre étude, la variation du nombre de lymphocytes T CD8+ spécifiques générés chez le même répondeur peut atteindre un facteur de 45 en fonction du donneur dont sont issues les DC. Au sein des 12

donneurs testés, on peut donc sélectionner un donneur dont les DC produisent chez le répondeur considéré 2190 effecteurs T CD8+ spécifiques alors que ses propres CPA (autologues) n'en génèrent que 160 dans les mêmes conditions. Ce type de résultat a été reproduit chez 2 autres répondeurs stimulés par des DC issues de panels de donneurs différents.

L'activité de cytolyse anti-tumorale médiée par les lymphocytes T ainsi stimulés en présence de DC allogéniques a été évaluée vis-à-vis de la lignée T2 (HLA-A2+) pulsée avec le peptide d'intérêt MART-1. Nous avons pu démontrer que les lymphocytes T CD8+ générés par les DC allogéniques sont fonctionnels, leur expansion s'accompagnant d'une potentialisation de l'activité cytolytique avec une augmentation du nombre d'unités lytiques générées de 2,1 fois par rapport à la présentation par des cellules autologues.

La polarisation des réponses immunes observées en présence de DC allogéniques a été analysée par le dosage de cytokines dans les surnageants de cultures. Nous avons trouvé que deux cytokines, TNF- α et IL-2, étaient présentes à des concentrations très élevées atteignant un facteur 100 pour les DC allogéniques les plus efficaces alors que la concentration en IL-4 était réduite. Ce profil montre que les effecteurs cytotoxiques allo-induits secrètent préférentiellement des cytokines de type 1 qui favorisent la réponse immune cellulaire souhaitée.

Sur le plan phénotypique, les lymphocytes impliqués dans les réponses allo-amplifiées se distinguent globalement par un degré d'activation élevé et l'expression à plus haute fréquence des marqueurs de mémoire. Cette observation a inspiré une étude fonctionnelle pour évaluer la capacité de réponse mémoire de lymphocytes activés en contexte allogénique. Une semaine après un priming en présence de cellules autologues ou allogéniques, les lymphocytes de 4 sujets ont été boostés par des DC autologues pulsées avec le même peptide. L'étude révèle que la réponse mémoire spécifique, évaluée par la technique des tétramères, est en moyenne 2 fois supérieure après un priming en condition allogénique. Au-delà de l'amplification du nombre des effecteurs générés, la réponse primaire induite par des DC allogéniques présente donc d'autres caractéristiques favorables sur le plan vaccinal.

Les fractions lymphocytaires produites par élutriation associent les populations T, NK et NKT dans des proportions équivalentes à celles du sang. Nous avons donc pu analyser l'incidence de l'allo-stimulation dendritique sur les réponses NK et NKT. L'expansion NK en présence de DC allogéniques est en moyenne près de 3 fois supérieure à celle observée dans les cultures en situation autologue. En terme de cytolyse d'une lignée NK sensible,

l'activité cytolytique est, dans les mêmes cultures, augmentée jusqu'à 5 fois pour un donneur.

Des expériences similaires montrent que certaines DC allogéniques sont capables d'induire une expansion NKT de plus de 10 fois celle observée dans les cultures autologues contrôles.

Ce travail a donc permis de réunir un ensemble de données originales dans le domaine, encore peu investi dans la littérature, de l'allo-activation *ex vivo* des réponses immunes antitumorales. Cette expertise unique ouvre plusieurs perspectives d'études fondamentales.

Mécanismes impliqués dans la disparité du potentiel adjuvant des DC issues de donneurs différents.

Deux hypothèses non mutuellement exclusives peuvent rendre compte de la disparité des DC allogéniques à potentialiser la réponse d'un individu donné :

- L'incompatibilité HLA entre les lymphocytes du sujet répondeur et les DC du sujet activateur. Totalement aléatoire dans notre expérimentation, ce contexte d'alloréactivité propre à chaque combinaison peut conditionner de manière singulière le microenvironnement, avec une incidence particulière sur la réponse immune anti-tumorale concomitante. L'investigation de la première hypothèse pourrait être menée en collaboration étroite avec un groupe maîtrisant l'histocompatibilité et la transplantation.
- L'existence de performances propres aux DC de chaque individu. Ainsi, des molécules clé de l'adhésion et de la co-activation impliquées dans le dialogue avec les lymphocytes pourraient être plus ou moins bien exprimées en fonction des DC, créant des niveaux de compétences fonctionnelles différents. Cette seconde hypothèse pourrait être explorée grâce aux lots de DC "haute et basse performances" stockés dans la collection à constituer.

Mémoire T et caractérisation des TCR

L'évolution de la réponse T spécifique sera évaluée au cours de plusieurs cycles de réactivation par des DC allogéniques provenant du donneur utilisé pour le priming ou issues de donneurs différents. L'objectif est de déterminer la meilleure stratégie d'utilisation des DC pour favoriser les réponses mémoires. L'évolution du répertoire TCR au cours du temps pourra être analysé et comparé à celui des cultures activées en présence de DC autologues dans le cadre d'une collaboration avec Pedro Romero (Institut Ludwig,

Lausanne). Les expérimentations seront menées à l'aide de lots cellulaires choisis de la collection à constituer selon les procédures de screening.

Prise en compte des effecteurs tolérogènes

Deux processus immuns peuvent limiter les réponses anti-tumorales induites par la stratégie des DC allogéniques : d'une part la différenciation d'effecteurs impliqués physiologiquement dans l'extinction des réactions immunitaires et, d'autre part, la libération dans le microenvironnement de facteurs anergisants ou suppresseurs par les cellules malignes. Un projet d'étude en cours d'élaboration vise à analyser l'émergence de la réponse T régulatrice et à tenter d'en limiter le développement dans le cadre d'une collaboration avec Hélène Lebuanec et Armand Bensussan (unité INSERM 448, faculté de Médecine, Créteil).

4. Amplification des réponses anti-tumorales de patients par des DC issues de donneurs sains (article 4)

Nous avons tenté de transposer chez le patient les résultats obtenus chez les donneurs sains dans le cadre d'une étude clinique avec consentement éclairé écrit, le protocole ALLOVACS, incluant soit des femmes opérées d'un cancer du sein avant chimiothérapie adjuvante, soit des hommes porteurs d'un cancer de la prostate métastasé hormono-résistant aptes à recevoir une première ligne de chimiothérapie. Les critères d'inclusion reposaient sur un phénotypage HLA-A2 positif, un état général conservé (PS < 2), des constantes biologiques satisfaisantes (hématocrite > 37 %, leucocytes > $4 \times 10^9/l$, plaquettes > $150 \times 10^9/l$; créatinine < 125 $\mu\text{mol/l}$, bilirubine totale < 18 $\mu\text{mol/l}$). Les critères d'exclusions étaient représentés par une chimiothérapie antérieure ou une corticothérapie au long cours, une positivité pour les sérologies hépatitiques ou HIV, la présence de comorbidités significatives. Cette étude a reçu un avis favorable du Comité de Protection des Personnes de Champagne Ardenne et a permis d'analyser les collections de cellules immuno-compétentes de 12 femmes et 3 hommes.

Les lymphocytes de chaque patient ont alors été stimulés en présence soit de DC autologues, soit de DC provenant d'un donneur sain HLA-A2+, préalablement pulsées avec le peptide tumoral. La réponse T spécifique induite par les DC allogéniques se révèle en moyenne 3,5 fois supérieure à celle observée en présence des DC du patient. Comme dans l'étude précédente, l'utilisation d'un panel de DC issues de donneurs sains différents

permet de sélectionner des donneurs capables d'induire une plus grande amplification de la réponse T spécifique du patient, phénomène d'autant plus conséquent que le nombre de donneurs du panel est plus élevé. A titre d'exemple, l'amplification observée chez les patients évalués en réponse à des cellules stimulatrices provenant de 9 donneurs sains est de 4 à 35 fois supérieure à la réponse en présence de cellules autologues. Ces résultats préliminaires montrent qu'il est toujours possible d'amplifier la réponse anti-tumorale du patient, et que la poursuite de l'étude pourrait faire émerger la notion de "bons" et "mauvais" répondeurs parmi les patients testés. Cette amplification des lymphocytes T CD8+ spécifiques caractérisés par la technique des tétramères s'accompagne d'une augmentation de l'activité cytolytique (3,5 fois en moyenne et jusqu'à 10,5 fois pour un patient), par rapport à l'activation par les cellules du patient. A nouveau, nous avons mis en évidence une amplification des lymphocytes T "central memory".

L'expansion des lymphocytes NK et NKT a été évaluée après culture en présence de DC préalablement screenées, puis comparée à l'expansion induite dans les cultures contrôles en présence de DC autologues. Chez les patients testés, les cellules allogéniques provoquent une forte expansion NK, de 4 à 8 fois supérieure à celle des cultures contrôles. Dans la même étude, le nombre de cellules NKT générées dans les cultures allogéniques est toujours supérieur à celui des contrôles autologues, avec un gain qui peut atteindre 14 fois pour un patient.

Au total, cette approche menée *ex vivo* permet, au regard d'un patient donné, d'identifier dans une collection de DC allogéniques des cellules vaccinales candidates "haute performance" capables d'amplifier considérablement la réponse induite physiologiquement par ses propres DC.

Cependant, malgré l'importance du potentiel adjuvant de l'alloréaction démontrée dans notre travail, il ne nous paraît pas pertinent à court terme de projeter un essai thérapeutique d'immunothérapie basé sur la simple injection aux patients de DC allogéniques. Le principal argument en faveur de cette réflexion réside dans le fait que le programme de recherches qui reste à mener devrait apporter des éléments clés qui permettront de concevoir une stratégie d'immuno-intervention exploitant de manière plus rationnelle et opportune l'alloréaction au bénéfice des défenses immunitaires anti-tumorales du patient.

Nous disposons par contre d'un outil permettant d'analyser les répercussions fonctionnelles de la chimiothérapie sur la réponse immune anti-tumorale. En effet, le protocole ALLOVACS prévoyait la réalisation d'un deuxième prélèvement sanguin un mois après la 6^{ème} cure de chimiothérapie dans les deux groupes de patients suivis. Une

collection cellulaire parallèle post-chimiothérapie a donc été constituée pour chaque patient. L'analyse comparative des échantillons cryoconservés pré- et post-chimiothérapie est prévue début 2009 et devrait permettre la mise en évidence d'éventuels déficits fonctionnels imputables à la chimiothérapie. Notre modèle d'étude *ex vivo* indiquera en outre si l'utilisation de DC allogéniques "haute performance" a la capacité de restaurer ou d'amplifier la réponse anti-tumorale des lymphocytes du patient. Par voie de conséquence, des informations expérimentales pourraient être déduites sur la chronologie optimale de réalisation d'une vaccination thérapeutique dans le cadre d'une association séquentielle chimiothérapie et vaccination.

A moyen terme, une des premières pistes cliniques pouvant être envisagées dans l'optique d'une stratégie d'immuno-intervention pourrait consister en l'injection intra-tumorale de DC allogéniques. Les nodules cutanés secondaires de mélanome représenteraient ainsi une cible conceptuellement idéale. Cette étude pourrait permettre d'établir clairement la preuve de concept en cas de régression partielle ou totale du nodule traité.

Notre système d'amplification de la réponse T anti-tumorale pourrait être également décliné pour la production de lymphocytes autologues à visée thérapeutique (LAK et TIL) selon le principe initialement développé par S. Rosenberg. En effet, il peut permettre la sélection d'une préparation de DC "haute performance", au sein d'une collection de cellules cryoconservées, capables de générer une expansion lymphocytaires beaucoup importante que celle obtenue normalement en présence de DC autologues.

CONCLUSIONS

IV. CONCLUSIONS

La chimiothérapie constitue actuellement le traitement de référence des formes avancées des cancers du sein ou de la prostate hormono-résistant et sert de pivot pour les études d'association visant à améliorer l'efficacité anti-tumorale.

Au travers d'un essai clinique mené dans le cancer de la prostate hormono-résistant, nous avons vu la difficulté de mettre en évidence un bénéfice clinique franc par la combinaison avec un cytotoxique classique. Les études d'association de la chimiothérapie à de nouvelles modalités thérapeutiques comme les thérapies ciblées ou l'immunothérapie semblent plus prometteuses conceptuellement et sont actuellement en plein développement.

Les essais de thérapie vaccinale basée sur l'utilisation de cellules dendritiques, qui ont été effectués jusqu'à présent ont le mérite d'avoir montré la faisabilité de cette approche innovante, mais une efficacité limitée est actuellement constatée. Ce travail établit des conditions de cultures qui permettent de produire des DC matures de grade clinique dotées de propriétés invasives favorisant leur migration à partir du site d'injection. *A priori*, ces DC pourraient donc se révéler plus performantes et sont de meilleures candidates pour la vaccination.

Ce mémoire réunit en outre un ensemble de données originales dans le domaine encore peu investi dans la littérature de l'alloactivation des réponses immunes anti-tumorales. Ainsi sont démontrées pour la première fois :

- les conditions de faisabilité du concept,
- la supériorité du contexte allogénique, par rapport à la situation autologue, pour l'immunogénicité des antigènes tumoraux,
- par voie de conséquence, l'opportunité de sélectionner, au sein d'une collection de DC issues de donneurs sains, des cellules vaccinales "haute performance" capables d'optimiser les diverses composantes de l'immunité anti-tumorale d'un patient donné.

Ces données peuvent ouvrir de nouvelles perspectives de thérapie cellulaire.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Allemand H, Seradour B, Weill A, *et al.* Baisse de l'incidence des cancers du sein en 2005 et 2006 en France : un phénomène paradoxal. *Bull Cancer* 2008 ; 95 : 11-5.
2. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity (review of 103 refs). *Nature* 1998; 392: 245-52.
3. Baxevanis CN, Voutsas IF, Tsitsilonis OE, *et al.* Tumor-specific CD4⁺ T lymphocytes from cancer patients are required for optimal induction of cytotoxic T cells against the autologous tumor. *J Immunol* 2000; 164: 3902-12.
4. Belot A, Grosclaude P, Bossard N, *et al.* Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2008; 56: 159-75.
5. Bernard J, Ittelet D, Christoph A, *et al.* Adherent-free generation of functional dendritic cells from purified blood monocytes in view of potential clinical use. *Hematol Cell Ther* 1998; 40: 17-26.
6. Berthold DR, Pond GR, Soban F, *et al.* Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated survival in the TAX 327 study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 242-5.
7. Bevan MJ. High determinant density may explain the phenomenon of alloreactivity. *Immunol Today* 1984; 5: 128-30.
8. Bolla M, Collette L, Blank L, *et al.* Long-term results with immediate androgen suppression and external irradiation in patients with locally advanced prostate cancer (an EORTC study): a phase III randomised trial. *Lancet*. 2002; 360: 103-6.
9. Bolla M, Van Tienhoven G, de Reijke T, *et al.* Concomitant and adjuvant androgen deprivation (ADT) with external beam irradiation for locally advanced prostate cancer: 6 months versus 3 years ADT, results of the randomized EORTC phase III trial 22961. *J Clin Oncol* 2007, ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. 2007; 25: Abst. 5014.
10. Bosland MC. The role of steroid hormones in prostate carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2000; 27: 39-66.
11. Bubley GJ, Carducci M, Dahut W, *et al.* Eligibility and response guidelines for phase II clinical trials in androgen-independent prostate cancer: Recommendations from the Prostate-Specific Antigen Working Group. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3461-7.
12. Burnet FM. Immunological surveillance in neoplasia. *Transplant Rev* 1971; 7: 3-25.
13. Burrows SR, Khanna R, Burrows JM, *et al.* An alloresponse in humans is dominated by cytotoxic T lymphocytes (CTL) cross-reactive with a single Epstein-Barr virus CTL epitope: implications for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 1994; 179: 1155-61.
14. Caffo O, Sava T, Comploj E, *et al.* Docetaxel, with or without estramustine phosphate, as first-line chemotherapy for hormone-refractory prostate cancer: results of a multicentre, randomized phase II trial. *BJU Int* 2008 May 15. [Epub ahead of print].
15. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, *et al.* GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 1992; 360: 258-61.

16. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, *et al.* CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 1997; 90: 1458-70.
17. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, *et al.* CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF + TNF alpha. *J Exp Med* 1996; 184: 695-706.
18. Cella M, Engering A, Pinet V, *et al.* Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997; 388: 782-7.
19. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 10-6.
20. Chang CC, Wright A, Punnonen J. Monocyte-derived CD1a+ and CD1a- dendritic cell subsets differ in their cytokine production profiles, susceptibilities to transfection, and capacities to direct Th cell differentiation *J Immunol* 2000; 165: 3584-91.
21. Chapuis F, Rosenzwajg M, Yagello M, *et al.* Differentiation of human dendritic cells from monocytes *in vitro*. *Eur J Immunol* 1997; 27: 431-41.
22. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res* 1991; 262: 3-11.
23. Cumberbatch M, Kimber I. Dermal tumour necrosis factor-alpha induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans' cell migration. *Immunology* 1992; 75: 257-63.
24. Dahllof B, Billstrom A, Cabral F, *et al.* Estramustine depolymerizes microtubules by binding to tubulin. *Cancer Res* 1993; 53: 4573-81.
25. Dhodapkar MV, Steinman RM, Sapp M, *et al.* Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J Clin Invest* 1999; 104: 173-80.
26. Dillman RO, Beutel LD, Barth NM, *et al.* Irradiated cells from autologous tumor cell lines as patient-specific vaccine therapy in 125 patients with metastatic cancer: induction of delayed-type hypersensitivity to autologous tumor is associated with improved survival. *Cancer Biother Radiopharm* 2002; 17: 51-66.
27. Dohnal AM, Graffi S, Witt V, *et al.* Comparative evaluation of techniques for the manufacturing of dendritic cell-based cancer vaccines. *J Cell Mol Med* 2008 Mar 17 [Epub ahead of print]
28. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, *et al.* Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3: 991-8.
29. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:329-60.
30. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomized trials. *Lancet* 1998; 351:1451-67.

31. El Hage F, Abouzahr-Rifai S, Meslin F, *et al.* Réponse immune et cancer. Bull Cancer 2008 ; 95 : 57-67.
32. Engell-Noerregaard L, Hansen TH, Andersen MH, *et al.* Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma: assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters. Cancer Immunol Immunother 2009; 58:1-14. Epub 2008 Aug 22.
33. Eymard JC, Bernard J. Thérapie cellulaire et cancer de la prostate. Bull Cancer 2003; 90: 734-43.
34. Eymard JC, Lopez M, Cattani A, *et al.* Phase I/II trial of autologous activated macrophages in advanced colorectal cancer. Eur J Cancer 1996; 31: 1905-11.
35. Fabre JW. The allogeneic response and tumor immunity. Nat Med 2001; 7: 649-52.
36. Fearon ER, Pardoll DM, Itaya T, *et al.* Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. Cell 1990; 60: 397-403.
37. Fidgor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ, *et al.* Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. Nat Med 2004; 10: 475-80.
38. Fizazi K, Le Maitre A, Hudes G, *et al.* Addition of estramustine to chemotherapy and survival of patients with castration-refractory prostate cancer: a meta-analysis of individual patient data. Lancet 2007; 370: 994-1000.
39. Foley EJ. Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. Cancer Res 1953; 13: 835-7.
40. Friedland D, Cohen J, Miller Jr. R, *et al.* A phase II trial of docetaxel (Taxotere) in hormone-refractory prostate cancer: correlation of antitumor effect to phosphorylation of Bcl-2. Semin Oncol 1999; 26: 19-23.
41. Gjertsen HA, Lundin KE, Hansen T, *et al.* T cells specific for viral antigens presented by HLA-Dw4 recognize DR13 on allogeneic cells: a possible mechanism for induction of rejection. Transpl Immunol 1993; 1:126-31.
42. Goss PE, Ingle JN, Martino S, *et al.* Randomized trial of letrozole following tamoxifen as extended adjuvant therapy in receptor-positive breast cancer: updated findings from NCIC CTG MA.17. J Natl Cancer Inst 2005; 97: 1262-71.
43. Guyre C, Fisher J, Waugh M, *et al.* Advantages of hydrophobic culture bags over flasks for the generation of monocyte-derived dendritic cells for clinical applications. J Immunol Methods 2002; 262: 85-94.
44. Hamilton A, Muggia F. Estramustine potentiates taxane in prostate and refractory breast cancers. Oncology 2001; 15(5 Suppl 7): 40-3.
45. Hanks GE, Pajak TF, Porter A, *et al.* Phase III trial of long-term adjuvant androgen deprivation after neoadjuvant hormonal cytorreduction and radiotherapy in locally advanced carcinoma of the prostate: the Radiation Therapy Oncology Group Protocol 92-02. J Clin Oncol 2003; 21: 3972-8. Erratum in: J Clin Oncol 2004; 22: 386.

46. Hewitt HB, Blake ER, Walder AS. A critique of the evidence for active host defense against cancer, based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin. *Br J Cancer* 1976; 33: 241-59.
47. Huck SP, Tang SC, Andrew KA, *et al.* Activation and route of administration both determine the ability of bone marrow-derived dendritic cells to accumulate in secondary lymphoid organs and prime CD8⁺ T cells against tumors. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57: 63-71.
48. Hudes G. Estramustine-based chemotherapy. *Semin Urol Oncol* 1997; 15: 13-9.
49. Huggins C, Hodges CV. Studies of prostatic cancer. Effect of castration, oestrogens and androgen injections on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res* 1941; 1: 293-307.
50. Joly F, Tannock IF. Chemotherapy for patients with hormone-refractory prostate cancer. *Ann Oncol* 2004; 15: 1582-4.
51. Keene JA, Forman J. Helper activity is required for the *in vivo* generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1982; 155: 768-82.
52. Kochman S, Bernard J. Antitumour immune response and cancer vaccination: The critical role of dendritic cells. *Curr Med Res Opin* 1999; 15: 321-6.
53. Kraus LA, Samuel SK, Schmid SM, *et al.* The mechanism of action of docetaxel (Taxotere) in xenograft models is not limited to bcl-2 phosphorylation. *Invest New Drugs* 2003; 21: 259-68.
54. Kreis W, Budman DR, Fetten J, *et al.* Phase I trial of the combination of daily estramustine phosphate and intermittent docetaxel in patients with metastatic hormone refractory prostate carcinoma. *Ann Oncol* 1999; 10: 33-8.
55. Lacassagne A. Hormonal pathogenesis of adenocarcinoma of the breast. *Amer J Cancer* 1936; 27: 217-28.
56. Laing N, Dahllof B, Hartley-Asp B, *et al.* Interaction of estramustine with tubulin isotypes. *Biochemistry* 1997; 36: 871-8.
57. Lanzavecchia A. Licence to kill. *Nature* 1998; 393: 413-4.
58. Lechler RI, Lombardi G, Batchelor JR, *et al.* The molecular basis of alloreactivity. *Immunol Today* 1990; 11: 83-8.
59. Lesimple T, Moisan A, Guillé F, *et al.* Treatment of metastatic renal cell carcinoma with activated autologous macrophages and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunother* 2000; 23: 275-9.
60. Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 776-81.
61. Logothetis CJ, Millikan R. Chemotherapy for advanced prostate cancer: 25 years later. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2423-4.

62. Machiels JP, Mazzeo F, Clausse M, *et al.* Prospective randomized study comparing docetaxel, estramustine, and prednisone with docetaxel and prednisone in metastatic hormone-refractory prostate cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5261-8.
63. McLeod DG, See WA, Klimberg I, *et al.* The bicalutamide 150 mg early prostate cancer program: findings of the North American trial at 7.7-year median followup. *J Urol* 2006; 176: 75-80.
64. Marchand M, van Baren N, Weynants P, *et al.* Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 1999; 80: 219-30.
65. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Ann Rev Immunol* 1997; 11: 129-63.
66. Messing EM, Manola J, Sarosdy M, *et al.* Immediate hormonal therapy compared with observation after radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy in men with node-positive prostate cancer. *N Engl J Med* 1999; 341: 1781-8.
67. Messing EM, Manola J, Yao J, *et al.* Immediate versus deferred androgen deprivation treatment in patients with node-positive prostate cancer after radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy. *Lancet Oncol* 2006; 7: 472-9.
68. Moolten FL, Wells JM, Heyman RA, *et al.* Lymphoma regression induced by ganciclovir in mice bearing a herpes thymidine kinase transgene. *Hum Gene Ther* 1990; 1: 125-34.
69. Moore MJ, Osoba D, Murphy K, *et al.* Use of palliative end points to evaluate the effects of mitoxantrone and low-dose prednisone in patients with hormonally resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12: 689-94.
70. Moser M, Stornasse T, De Smedt T, *et al.* Dendritic cells can be used as physiological adjuvant in vivo. *Adv Exp Med Biol* 1995; 378: 501-5.
71. Murphy G, Tjoa B, Ragde H, *et al.* Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate* 1996; 29: 371-80.
72. Murphy GP, Tjoa BA, Simmons SJ, *et al.* Infusion of dendritic cells pulsed with HLA-A2-specific prostate-specific membrane antigen peptides: a phase II prostate cancer vaccine trial involving patients with hormone-refractory metastatic disease. *Prostate* 1999; 38: 73-8.
73. Murphy GP, Tjoa BA, Simmons SJ, *et al.* Higher-dose and less frequent dendritic cell infusions with PSMA peptides in hormone-refractory metastatic prostate cancer patients. *Prostate* 2000; 43: 59-62.
74. Osoba D, Tannock IF, Ernst DS, *et al.* Health-related quality of life in men with metastatic prostate cancer treated with prednisone alone or mitoxantrone and prednisone. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1654-63.
75. Oudard S, Banu E, Beuzeboc P, *et al.* Multicenter randomized phase II study of two schedules of docetaxel, estramustine, and prednisone versus mitoxantrone plus prednisone in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *J Clin Oncol* 2005; 20: 3343-51.

76. Oudard S, Legrier ME, Boye K, *et al.* Activity of docetaxel with or without estramustine phosphate versus mitoxantrone in androgen dependent and independent human prostate cancer xenografts. *J Urol* 2003; 169: 1729-34.
77. Petrylak DP, Macarthur RB, O'Connor J, *et al.* Phase I trial of docetaxel with estramustine in androgen-independent prostate cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 958-67.
78. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MHA, *et al.* Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 1513-20.
79. Phillips JH, Lanier LL. Dissection of the lymphokine-activated killer phenomenon: relative contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytotoxicity. *J Exp Med* 1986; 164:814-25.
80. Picus J, Schultz M. Docetaxel (Taxotere) as monotherapy in the treatment of hormone-refractory prostate cancer: preliminary results. *Semin Oncol* 1999; 26:14-8.
81. Pierre P, Turley SJ, Gatti E, *et al.* Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 1997; 388: 787-92.
82. Pilepich MV, Winter K, Lawton CA, *et al.* Androgen suppression adjuvant to definitive radiotherapy in prostate carcinoma – long-term results of phase III RTOG 85-31. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 61: 1285-90.
83. Rapport de l'AFSSAPS. Mise au point actualisé sur le traitement hormonal de la ménopause (THM). Juin 2006. Disponible sur : http://agmed.sante.gouv.fr/htm/10/thm/thm_mise_aupoint.pdf
84. Reiser JB, Darnault C, Guimezanes A, *et al.* Crystal structure of a T cell receptor bound to an allogeneic MHC molecule. *Nat Immunol* 2000; 1: 291-7.
85. Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 1998; 393: 474-8.
86. Rini BI, Weinberg V, Fong L, *et al.* Combination immunotherapy with prostatic acid phosphatase pulsed antigen-presenting cells (Provenge) plus bevacizumab in patients with serologic progression of prostate cancer after definitive local therapy. *Cancer* 2006; 107: 67-74.
87. Romani N, Gruner S, Brang D, *et al.* Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 180: 83-93.
88. Romero P, Cerottini JC, Waanders GA. Novel methods to monitor antigen-specific cytotoxic T-cell responses in cancer immunotherapy. *Mol Med Today* 1998; 4: 305-12.
89. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004; 10: 909-15.
90. Rosenstein M, Yron I, Kaufman Y, *et al.* Lymphokine-activated killer cells: lysis of fresh syngeneic natural killer-resistant murine tumor cells by lymphocytes cultured in interleukin-2. *Cancer Res* 1984; 44: 1946-53.

91. Rouard H, Marquet J, Leon A, *et al.* IL-12 secreting dendritic cells are required for optimum activation of human secondary lymphoid tissue T cells. *J Immunother* 2002; 25: 324-33.
92. Saika T, Satoh T, Kusaka N, *et al.* Route of administration influences the antitumor effects of bone marrow-derived dendritic cells engineered to produce interleukin-12 in a metastatic mouse prostate cancer model. *Cancer Gene Ther* 2004; 11: 317-24.
93. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J Exp Med* 1994 ; 179 : 1109-18.
94. Savarese DM, Halabi S, Hars V, *et al.* Phase II study of docetaxel, estramustine, and low-dose hydrocortisone in men with hormone-refractory prostate cancer: a final report of CALGB 9780. Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2509–16.
95. Siena S, Di Nicola M, Bregni M, *et al.* Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34⁺ blood progenitors for anticancer therapy. *Exp Hematol* 1995; 23: 1463-71.
96. Sinibaldi VJ, Carducci MA, Moore-Cooper S, *et al.* Phase II evaluation of docetaxel plus one-day oral estramustine phosphate in the treatment of patients with androgen independent prostate carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 1457–65.
97. Sitka Copur M, Ledakis P, Lynch J, *et al.* Weekly docetaxel and estramustine in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Semin Oncol* 2001; 28(4 Suppl 15): 16–21.
98. Slingluff CL Jr, Yamshchikov G, Neese P, *et al.* Phase I trial of a melanoma vaccine with gp100(280-288) peptide and tetanus helper peptide in adjuvant: immunologic and clinical outcomes. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3012-24.
99. Smaletz O, Scher HI, Small EJ, *et al.* Nomogram for overall survival of patients with progressive metastatic prostate cancer after castration. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3972-82.
100. Small EJ, Fratesi P, Reese DM, *et al.* Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3894-903.
101. Small EJ, Schellhammer PF, Higano CS, *et al.* Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with Sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3089-94.
102. Smith DC, Dunn RL, Strawderman MS, *et al.* Change in serum prostate-specific antigen as a marker of response to cytotoxic therapy for hormone-refractory prostate cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1835-43.
103. Speicher LA, Laing N, Barone LR, *et al.* Interaction of an estramustine photoaffinity analogue with cytoskeletal proteins in prostate carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 1994; 46: 866-72.
104. Steinman RM, Witmer-Pack M, Inaba K. Dendritic cells: antigen presentation, accessory function and clinical relevance. *Adv Exp Med Biol* 1993; 329: 1-9.
105. Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, *et al.* Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J Immunol* 2001; 166: 973-81.

106. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, *et al.* Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 1502–12.
107. Tannock IF, Osoba D, Stockler MR, *et al.* Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1756-64.
108. Tew KD, Glusker JP, Hartley-Asp B, *et al.* Preclinical and clinical perspectives on the use of estramustine as an antimitotic drug. *Pharmacol Ther* 1992; 56: 323-39.
109. Tjoa BA, Simmons SJ, Bowes VA, *et al.* Evaluation of phase I/II clinical trials in prostate cancer with dendritic cells and PSMA peptides. *Prostate* 1998; 36: 39-44.
110. Tjoa BA, Simmons SJ, Elgamal A, *et al.* Follow-up evaluation of a phase II prostate cancer vaccine trial. *Prostate* 1999; 40: 125-9.
111. Topalian SL, Kasid A, Rosenberg SA. Immunoselection of a human melanoma resistant to specific lysis by autologous tumor-infiltrating lymphocytes. Possible mechanisms for immunotherapy failures. *J Immunol* 1990; 144: 4487-95.
112. Townsend SE, Allison JP. Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science* 1993; 259: 368-70.
113. Wallack MK, Scoggin SD, Sivanandham M. Active specific immunotherapy with vaccinia melanoma oncolysate. *Mt Sinai J Med* 1992; 59: 227-33.
114. Wang F, Bade E, Kuniyoshi C, *et al.* Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund's adjuvant for resected high-risk melanoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2756-65.
115. Ward JE, McNeel DG. GVAX: an allogeneic, whole-cell, GM-CSF-secreting cellular immunotherapy for the treatment of prostate cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7: 1893-902.
116. Watts C. Immunology. Inside the gearbox of the dendritic cell. *Nature* 1997; 388: 724-5.
117. Weitzman AL, Shelton G, Zuech N, *et al.* Dexamethasone does not significantly contribute to the response rate of docetaxel and estramustine in androgen independent prostate cancer. *J Urol* 2000; 163: 834–7.
118. Williams JF, Muenchen HJ, Kamradt JM *et al.* Treatment of androgen-independent prostate cancer using antimicrotubule agents docetaxel and estramustine in combination: an experimental study. *Prostate* 2000; 44: 275–8.
119. Wirth MP, See WA, McLeod DG, *et al.* Bicalutamide 150 mg in addition to standard care in patients with localized or locally advanced prostate cancer: results from the second analysis of the early prostate cancer program at median followup of 5.4 years. *J Urol* 2004; 172: 1865-70.
120. Yagoda A, Petrylak D. Cytotoxic chemotherapy for advanced hormone-resistant prostate cancer. *Cancer* 1993; 71: 1098-109.
121. Zagury D, Bernard J, Jeannesson P, *et al.* Studies on the mechanisms of T cell-mediated lysis at the single effector cell level. *J Immunol* 1979; 123: 1604-9.

122. Zhou LJ, Tedder TF. CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2588-92.
123. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 715-27.

RESUME

La chimiothérapie des cancers au stade métastatique reste largement non curative malgré l'amélioration de la survie globale des patients. Ce constat justifie la recherche de progrès thérapeutiques par l'optimisation de traitements standard et l'exploration de nouvelles stratégies. Dans cet esprit, ce travail regroupe les résultats de quatre études menées sur le plan de la pathologie auprès de patients porteurs d'un cancer de la prostate ou du sein.

L'étude de phase II conduite chez des patients avec un cancer prostatique hormono-résistant a évalué l'addition d'estramustine sur l'efficacité de la chimiothérapie standard par docetaxel. Une réponse biologique nettement augmentée a été objectivée avec l'association, sans bénéfice apparent sur la survie globale.

Par ailleurs, les travaux entrepris pour améliorer les performances vaccinales des cellules dendritiques à visée thérapeutique ont établi clairement des conditions de culture et de maturation qui favorisent leurs propriétés invasives, facilitant de la sorte leur migration chez le patient après injection. Ces cellules ont été utilisées pour explorer *ex vivo* une stratégie innovante visant à potentialiser la fonction adjuvante des cellules dendritiques et à amplifier ainsi la réponse immune anti-tumorale qu'elles induisent. Le principe consiste à activer la réponse lymphocytaire d'un patient par des cellules dendritiques allogéniques provenant d'un donneur sain. Les résultats démontrent pour la première fois la supériorité du contexte allogénique qui se traduit par une forte amplification des réponses anti-tumorales. Ces données nouvelles ouvrent de multiples perspectives sur le plan fondamental comme au niveau clinique.

Mots-clés : cancer du sein ; cancer de la prostate ; chimiothérapie ; immunothérapie ; thérapie cellulaire ; cellules dendritiques ; alloréactivité ; réponse T spécifique ; immunité anti-tumorale.