



HAL
open science

Génération et mécanismes d'action anti-tumorale d'effecteurs lymphocytaires T CD4+ dans les lymphomes B malins

Jian-Qing Mi

► **To cite this version:**

Jian-Qing Mi. Génération et mécanismes d'action anti-tumorale d'effecteurs lymphocytaires T CD4+ dans les lymphomes B malins . Immunologie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT: . tel-00011308

HAL Id: tel-00011308

<https://theses.hal.science/tel-00011308>

Submitted on 6 Jan 2006

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

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

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE 1

(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 Mars 1992)

Discipline : Biologie

Présentée et soutenue publiquement

Par

Jian-Qing MI

Le 14 Octobre 2005

Génération et mécanismes d'action anti-tumorale d'effecteurs lymphocytaires T CD4⁺ dans les lymphomes B malins

Directeur de Thèse : Pr. Jean-Jacques SOTTO
Responsable scientifique : Dr. Thierry BONNEFOIX

Jury composé de :

Pr. Marie-Christine BENE	Rapporteur
Dr. Thierry BONNEFOIX	Examineur
Dr. John DE VOS	Examineur
Pr. Thierry FEST	Rapporteur
Pr. Patrice MARCHE	Examineur
Pr. Jean-Jacques SOTTO	Directeur de Thèse

Thèse préparée au sein du laboratoire Groupe de Recherche sur les Lymphomes
Base Moléculaire de la Progression Tumorale – IMSERM EMI 0353
Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier – Grenoble

**A mon maître Pr. ZhenYi WANG
Et à mon épouse Jin**

Tout d'abord, je tiens à remercier du fond du cœur le Pr. Jean-Jacques SOTTO, qui m'a transmis des connaissances solides en clinique médicale et m'a donné l'envie de faire cette thèse de science. Qu'il trouve ici l'expression de toutes mes reconnaissances.

Je suis profondément reconnaissant au Pr. Dominique LEROUX de m'avoir accueilli dans son laboratoire et ainsi de m'avoir permis de réaliser ce travail passionnant.

Je suis très reconnaissant à Madame Marie-Christine BENE, professeur à l'université Henri Poincaré Nancy I, Monsieur Thierry FEST, professeur à l'université Rennes I et Monsieur John DE VOS, maître de conférence à l'université Montpellier I, de me faire l'honneur de participer au jury et d'être rapporteurs.

Je remercie Monsieur le Pr. Jean-Claude BENSA, directeur scientifique de l'EFS Rhône-Alpes, qui m'a bien soutenu et qui m'a fait profiter de ses connaissances. Grâce à son soutien, j'ai pu réaliser une grande partie de manipulations de mes travaux à l'EFS Rhône-Alpes, site Grenoble. Qu'il trouve ici l'expression de tous mes respects pour sa sagesse et sa gentillesse.

Je remercie le Dr Thierry BONNEFOIX pour avoir encadrer ma thèse et je le remercie également de m'avoir apporté toutes ses connaissances et son expérience en biologie. Ses compétences en bio-mathématique m'a toujours bien impressionné. Surtout, le plus important, il m'a appris la démarche scientifique qui pourrait me servir tout au long de ma vie professionnelle.

Je remercie sincèrement tous ceux qui ont soutenu financièrement ce travail : l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC N°4391), l'association ARAMIS et la région Rhône-Alpes.

Je remercie Monsieur Pascal PERRON pour son aide. J'admire toujours son efficacité et sa rapidité technique.

J'exprime mes reconnaissances au Dr. Mary CANALLAN, qui m'a montré son haut niveau scientifique dans le domaine de biologie moléculaire.

J'adresse mes sincères remerciements à M. Patrice N. MARCHE, directeur de l'Inserm U538 et Mme. Evelyne JOUVIN-MARCHE, directeur scientifique adjoint au CNRS, pour leur précieuse aide technique, leur aimable collaboration et leur encouragement.

J'exprime particulièrement mes reconnaissances au Dr. Marie-Christine JACOB qui a toujours fait preuve d'une grande patience et d'une gentillesse à mon égard. J'ai pu découvrir son haut niveau scientifique et sa fine qualité de travail. Je remercie également toute son équipe.

J'adresse aussi mes remerciements au Dr. Martine PERROLET qui m'a aidé pour la préparation du matériel à l'EFS Rhône-Alpes, site Grenoble.

Je remercie mes amies Agnès COLOMAR et Sylvie GLAIZAL pour leurs aides à l'EFS, leurs grandes gentillesses et leurs amitiés.

Merci également à David LAURIN et Pierre RAY pour leurs conseils pertinents. Ils trouvent ici toutes mes amitiés.

Je n'oublie pas non plus l'aide de François COUSIN et Anne CASTINEL, ainsi que leur soutien moral.

Merci à Sylvie FULGET, pour sa gentillesse, son dynamisme pour tout le labo.

Je tiens à exprimer toutes mes reconnaissances à tous les thésards du laboratoire que j'ai pu rencontrer, pour leur aide et leur complicité. Certains sont déjà partis (Isabelle, 'Momos' Pascal Mossuz, Nico, Leïla...), d'autres restent encore : la jolie et rigolote Juliana, la charmante et humoriste Anne M., la douce et travailleuse Alex. Bon courage pour vous.

Je remercie aussi l'aide de Sieme et Anne F. pour la préparation de mes dernières manips et leur sympathie. Je leur souhaite à toutes les deux un très bon avenir.

Merci à Marie-Anne et Alicia pour leur encouragement et gentillesse.

Merci à Laetitia V. pour sa gentillesse et sa complicité.

Un merci tout spécial à Samuel qui était ‘mon secrétaire privé’ : je te souhaite très bonne chance pour ton avenir et tu auras ton poste d’ingénieur avec tes doubles compétences en biologie et en informatique.

Merci à tous les autres « jeunes » : Aude, Edwige, Anne-Laure, Benoît, Sandrine, Jérôme, Fabienne H... Merci à tout le personnel de l’IAB que j’ai pu côtoyer au cours de mon séjour.

Merci à Lysiane, Brigitte, Rémy, Caro et toute l’équipe clinique pour leur sympathie et encouragements.

Je remercie aussi Mmes Marie-France SOTTO et Martine BLANC pour leurs soutiens tout au long de ces années où je réside en France et de leurs gentilleses.

Enfin, Je voudrais remercier spécialement deux personnes, deux grands amis que j’ai rencontré en France : Olivier Manches, qui a initié ma voie scientifique et m’a impressionné par la qualité de sa personnalité exceptionnelle. Pierre-Yves Perche, qui m’a accompagné pour perfectionner le français de ce manuscrit. Son soutien m’encourage, ses conseils m’enrichissent.

Si on a un vrai ami dans la vie, on n’a pas loupé sa vie (**proverbe chinois**). Et quand on en possède deux, c’est un luxe.

Sommaire

Sommaire	1
Résumé	3
Liste des figures	4
Liste des abréviations	6
Introduction	9
1. Système immunitaire et Tumeurs	10
1-1 Immunité innée	11
1-1.1 Reconnaissance des cellules tumorales par les cellules NK	11
1-1.2 Les NKT se présentent comme des effecteurs anti-tumoraux	12
1-2 Immunité adaptative	13
1-2.1 les Cellules présentatrices d'antigènes	14
1-2.2 Molécules de costimulation	14
1-2.3 La synapse immunologique	16
1-2.4 Les lymphocytes T CD8+ et leurs mécanismes de cytotoxicité	18
1-2.5 Fonction de lymphocytes T CD4+ dans l'immunité anti-tumoral	24
1-2.5.1 Les sous-populations de lymphocytes T CD4+	24
1-2.5.2 Rôle crucial des lymphocytes T CD4+ dans l'immunité spécifique anti-tumorale	25
2. Echappement de la tumeur	28
2-1 Altération de la présentation d'antigène	29
2-2 Inhibition de l'apoptose induite par les lymphocytes T spécifiques	31
2-2.1 Inhibition directe	31
2-2.2 Inhibition indirecte	33
2-3 Sécrétion de molécules immunosuppressives	35
2-4 Défaut d'activation lymphocytaire	37
3. Immunothérapie	38
3-1 Immunothérapie passive	38
3-1.1 CD20 et rituximab	38
3-1.2 Her-2 et trastuzumab	42
3-1.3 Autres	43

3-2 Immunothérapie adoptive	44
3-2.1 Les cellules souches hématopoïétiques et lymphocytes T allogéniques	44
3-2.2 Les lymphocytes autologues	46
3-3 Immunothérapie active non spécifique	48
3-4 Immunothérapie active spécifique	49
3-4.1 La vaccination par antigènes tumoraux	49
3-4.2 La vaccination par cellules dendritiques	51
4. Les lymphomes B	53
4-1 Différenciation des lymphocytes B normaux	53
4-1.1 phase antigène indépendante	53
4-1.2 phase antigène dépendante	55
4-2. Développement et classification des lymphomes B	57
Objectif du travail de thèse	62
Chapitre 1	65
Introduction	66
Résultats	67
Discussion	71
Chapitre 2	75
Introduction	76
Résultats et Discussion	78
Conclusions et Perspectives	109
Bibliographies	113
Annexe :	
Diaporama-présentation orale de la thèse	141

Résumé

Le rôle des lymphocytes T CD4+ dans la réponse immune anti-tumorale s'est révélé être de plus en plus important au cours de ces dix dernières années. Nous nous sommes attachés à l'étude de leur fonction dans les lymphomes malins non hodgkiniens de type B.

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons étudié un modèle à partir des cellules fraîches splénique d'un patient porteur d'un lymphome B splénique de la zone marginale. Nous avons pu déterminer un effet fonctionnel des lymphocytes T CD4+ réactifs par rapport aux cellules malignes B autologues. Ces cellules T CD4+ sont capables d'induire une différenciation des lymphocytes B tumoraux en plasmocytes, et cette induction a été dévoilée pour la première fois dans un système cellulaire autologue.

Nous avons ensuite étudié la capacité fonctionnelle des lymphocytes T CD4+ réactifs sur une lignée de lymphome B folliculaire obtenue dans notre laboratoire. Nous avons obtenu un effet cytotoxique par les cellules T CD4+ totales autologues venant des lymphocytes du sang périphérique. Cependant, cette cytotoxicité s'est montrée à la fois sur les cellules B malignes et les cellules B normales lymphoblastoïdes. Un clonage a été ensuite réalisé dans le but d'écarter les clones non spécifiques et de trouver des clones T cytotoxiques spécifiques des cellules malignes. Parmi les six clones obtenus, trois sont spécifiques et ils possèdent un TCR identique V β 17-D β 1-J β 1.2. Ces clones exercent une cytotoxicité contre les cellules tumorales en reconnaissant l'antigène tumoral présenté par la molécule HLA-II DP et leur mécanisme de lyse correspond à la voie perforine/granzymes.

Ces deux résultats nous ont permis de conclure que les cellules T CD4+ peuvent induire un effet direct anti-tumoral avec des mécanismes variés. Ce travail donne de nouveaux arguments concernant le rôle pivot des lymphocytes T CD4+ dans l'immunité anti-tumorale et permet d'envisager l'identification de l'antigène tumoral.

Liste des Figures

Figure 1 : Schéma général de contrôle des cellules tumorales par le système immunitaire	Page 10
Figure 2 : Vue générale de la synapse immunologique mature	Page 17
Figure 3 : Perforine et granzymes sont libérées au niveau de la synapse immunologique	Page 20
Figure 4 : Induction de l'apoptose par FasL	Page 22
Figure 5 : Rôle des cellules T CD4+ dans la modulation des réponses immunes anti-tumorales.	Page 28
Figure 6 : Schéma général de l'adressage intracellulaire des peptides associés aux molécules du CMH de classe I	Page 30
Figure 7 : L'apoptose des lymphocytes T induite par le FasL	Page 34
Figure 8 : L'Inhibition de la réponse anti-tumorale par TGF- β	Page 36
Figure 9 : La CDC induite par le rituximab	Page 41
Figure 10 : Différentes catégories d'antigènes tumoraux	Page 50
Figure 11 : Différenciation des lymphocytes B.	Page 55
Figure 12 : Trois voies possibles quand les cellules B naïves rencontrent l'antigène	Page 56

Figure 13a : Correspondance entre les cellules B normales et les différents syndromes lymphoprolifératifs	Page 59
Figure 13b : Origine, caractère et fréquence des lymphomes de type B	Page 60
Figure 14 : Les classifications des lymphomes B Kiel, REAL et WHO	Page 61
Figure 15 : Expression des principaux facteurs de transcription concernés dans la régulation du développement terminal des lymphocytes B	Page 72

Liste des abréviations

α -GalCer : α -Galactosylceramide

ADCC : Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity

ADED : Anti-apoptotic Death Effector Domain

AID : Activation-Induced Deaminase

AIF : Apoptosis inducing-factor

Apaf-1: Apoptosis protease-activating factor-1

BCG : Bacille de Calmette et Guérin

CD: Cluster of Differentiation

CDC : complemen dependant cytolysis

CDs : cellules dendritiques

CMH : Complex Majeur d'Histocompatibilité

CMV: CytoMégaloVirus

CPAs: Cellules Présentatrices de l'Antigène

CR1 : Complement Receptor type 1

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

CTLs : lymphocytes T cytotoxiques

DAF : Decay Accelerating Factor

DcR3: Decoy receptor 3

DED : Death Effector Domain

DISC : Death-Inducing Signaling Complex

DLI: Donor Lymphocyte Infusions

EBV : Virus d'Epstein -Barr

ER: Endoplasmatic Reticulum

FADD: Fas Associated Death Domain

FLICE: FADD-like IL1 β -converting enzyme

FLIP: FLICE caspase-8-Inhibitory Proteins

G-CSF : Granulocyte Colony-Stimulating Factor

GELA: Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte

GM-CSF: Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor

GVH: Graft-Versus-Host

GVT: Graft-Versus-Tumour

HLA: Human Leucocyte Antigene

HIV: Human Immunodeficiency Virus
IAP: Inhibitor of apoptosis Protein
Ig: Immunoglobuline
IL: Interleukine
INF- γ : Interféron γ
KAR: Killing activating receptor
KIRs: Killer cell Inhibitory Receptors
LAK : Lymphokine Activated Killer
LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde
LMNH: Lymphome Malin Non-Hodgkinien
LLC : leucémie lymphocytaire chronique
MAC : Membrane Attack Complex
MTOC: MicroTubule-Organizing Centre
MCP : Membrane Cofactor Protein
MIP-3 α : Macrophage Inflammatory Protein-3 alpha
MIRL : Membrane Inhibitor of Reactive Lysis
NK: Natural Killer
NHL: Non-Hodgkin Lymphomas
PBL: Peripheral Blood Lymphocytes
PCR: Polymerase Chain Reaction
PSMA : Prostate-Specific Membrane Antigen
Rae1: Retinoic acid early-1 proteins
RAG : Recombinaison Activating Genes
REAL : Revised European American lymphoma
RCAS1 : Receptor-binding Cancer Antigen expressed on SiSo cells
SCID: Severe Combined Immune Deficiency
SEREX: serological expression cloning of human tumor antigens
TAP: Transporter Activated Peptide
TCM: central memory T cells
TCR: T Cell Recepteur
TdT : Terminal deoxynucleotidyl Transferase
TEM : effector memory T cells
TGF- β : Transforming Growth Factor- β

Th: T help

TIL: Lymphocytes infiltrant les tumeurs

TNF: Tumor Necrosis Factor

TNFR-1: récepteur du TNF de type 1

TRAIL: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

TRAIL-R: TRAIL receptor

SCID: Severe Combined Immune Deficiency

ULBPs : UL16-Binding Proteins

VEGF : vascular endothelial growth factor

WHO: World Health Organization

INTRODUCTION

1. Système Immunitaire et Tumeurs

Le concept de l'Immunosurveillance, défini par Burnet FM en 1967 (Burnet 1967), propose la capacité du système immunitaire à détecter les cellules tumorales et à les détruire. Cette hypothèse est en partie soutenue par le fait que les individus présentant un déficit congénital ou acquis du système immunitaire possèdent une plus grande fréquence de malignité (McClain 1997) (Smyth, Godfrey et al. 2001). Cependant, cette observation, aussi bien chez les individus immunodéficients que chez les souris, ne semble être valable que dans le cas des tumeurs associées à un virus, suggérant que l'immunosurveillance semble être cruciale dans le contrôle des tumeurs associées à un virus. Au contraire, le système immunitaire ne répond habituellement pas aux nouveaux antigènes dérivant des multiples altérations génétiques dans les tumeurs spontanées (Janeway 2001).

L'immunité anti-tumorale, comme toute réponse immune, implique la sollicitation séquentielle et coordonnée des mécanismes de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. (Figure 1)

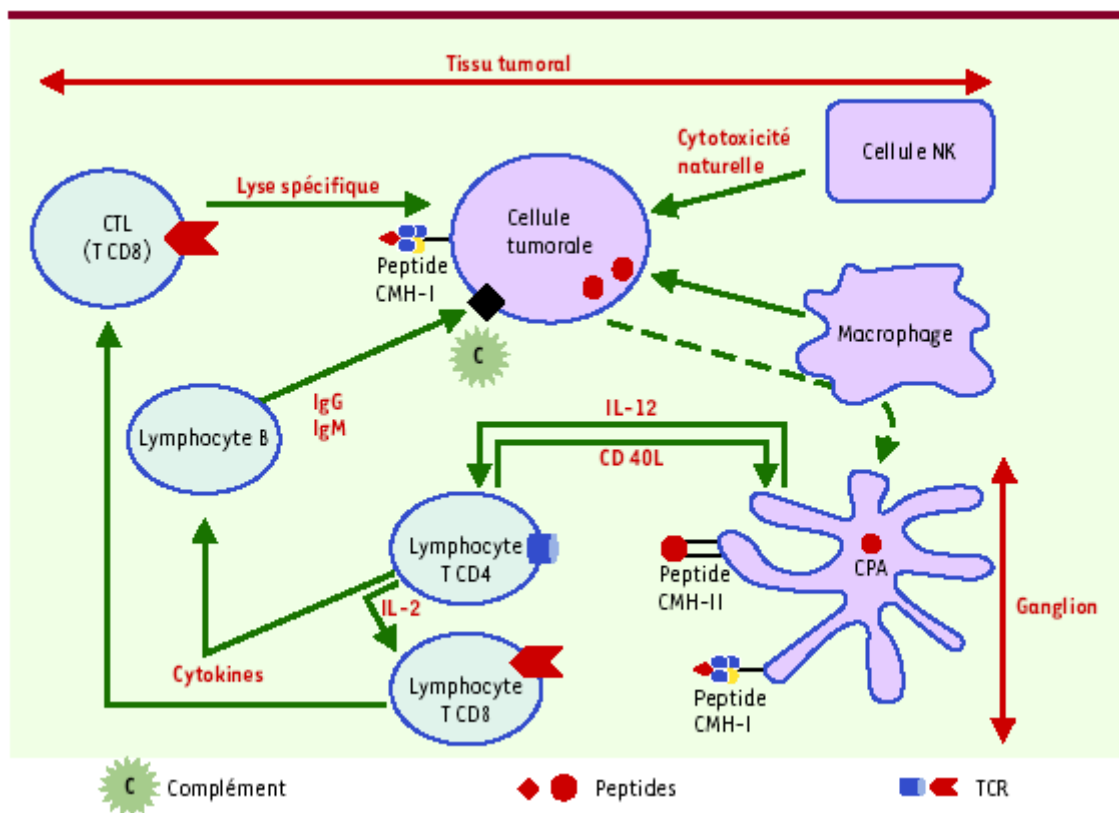


Figure 1 Contrôle des cellules tumorales par le système immunitaire. D'après (Catros-Quemener, Bouet et al. 2003)

Les cellules présentatrices d'antigène (CPA) déclenchent la réponse immunitaire spécifique dans les aires T des ganglions lymphatiques. Les cellules tumorales exposent des peptides associés à des molécules HLA de classe I à leur surface. La reconnaissance de ces antigènes par des lymphocytes T CD8 spécifiques entraîne leur lyse. Les macrophages sont des cellules spécialisées dans la phagocytose, mais possèdent également, comme les cellules NK, une capacité cytotoxique naturelle. Dans un contexte «cytokinique» favorable, des lymphocytes B peuvent sécréter des anticorps capables de reconnaître les cellules tumorales et les lyser en présence de complément (ou par des mécanismes d'ADCC, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*).

1-1 Immunité Innée

L'immunité innée, du fait qu'elle implique l'utilisation de récepteurs relativement invariants, et d'effecteurs immédiatement activables, est généralement considérée comme pré-existante et antérieure à l'installation d'une immunité adaptative spécifique. Elle implique un grand nombre de cellules différentes comme les cellules épithéliales, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les leucocytes polynucléaires, les cellules natural killer (NK), des sous-populations de lymphocytes (les cellules B-1, les cellules NKT, les lymphocytes T exprimant le récepteur $\gamma\delta$), ainsi que les granulocytes basophiles et éosinophiles.

1-1.1 La reconnaissance des cellules tumorales par les cellules NK

Des études ont clairement montré que les cellules des lignées tumorales ayant un déficit en molécules HLA-I peuvent être rejetées par les cellules NK (Piontek, Taniguchi et al. 1985; Karre, Ljunggren et al. 1986). Cependant, cet effet anti-tumoral peut être inhibé si l'expression de CMH de classe I sur les cellules tumorales est restaurée (Ljunggren, Sturmhofel et al. 1990) (Franksson, George et al. 1993).

Ce mécanisme de reconnaissance s'appelle « Missing self recognition », modèle de l'inhibition des effecteurs. Nous savons que les cellules NK possèdent deux catégories de récepteurs de surface qui contrôlent leur activité cytotoxique : Récepteurs inhibiteurs et activateurs. Trois familles de récepteurs inhibiteurs ont été identifiées : Ly49 chez la souris (Yokoyama, Jacobs et al. 1989) (Karlhofer, Ribaldo et al. 1992), récepteurs inhibiteurs cytotoxiques (KIRs, killer cell inhibitory receptors) chez l'homme (Moretta, Vitale et al.

1993) (Colonna and Samaridis 1995) (Wagtman, Rajagopalan et al. 1995), et récepteurs CD94/NKG2A chez la souris et l'homme (Lazetic, Chang et al. 1996) (Carretero, Cantoni et al. 1997). Ils sont capables d'inhiber l'activité cytotoxique des cellules NK : comme ces récepteurs sont spécifiques des allèles du CMH de classe I, chez l'homme, les molécules de CMH de classe I sur les cellules normales sont reconnues par les cellules NK par intermédiaires de Kirs ou des récepteurs CD94/NKG2A et ceux-ci inhibent les signaux des récepteurs activateurs. À l'inverse, les cellules NK éliminent les cellules anormales qui n'expriment pas les molécules de CMH de classe I ou en faible densité.

Il existe aussi un autre mécanisme dans le cadre de la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules NK : « Induced-self recognition ». Il implique les récepteurs activateurs (KARs, Killing activating receptors) et leurs ligands (Diefenbach and Raulat 2001) qui ont été aussi identifiés ces dernières années. Parmi tous les récepteurs activateurs, le récepteur NKG2D et ses ligands sont les plus caractéristiques. Le récepteur NKG2D s'associe à la molécule adaptatrice DAP10 qui transmet le signal à l'intérieur de la cellule en activant la voie P13-kinase (Wu, Song et al. 1999). Ce complexe est exprimé non seulement sur les cellules NK, mais aussi sur les lymphocytes T $\gamma\delta$, les macrophages et les lymphocytes T CD8 $\alpha\beta^+$. Leurs ligands, comme Rae1 (retinoic acid early-1 proteins) (Diefenbach, Jamieson et al. 2000) et H60 (Malarkannan, Shih et al. 1998; Diefenbach, Jensen et al. 2001) chez la souris, MICA/B (the stress-inducible molecules MHC class I chain-related A and B) et ULBPs (UL16-binding proteins) chez l'homme (Bauer, Groh et al. 1999) (Cosman, Mullberg et al. 2001) (Sutherland, Chalupny et al. 2002) (Pende, Rivera et al. 2002), ne sont souvent exprimés que par les cellules tumorales, infectées ou 'stressées'. Ils se lient au récepteur NKG2D et déclenchent la cytotoxicité des cellules NK, même si les cellules tumorales expriment des molécules de CMH de classe I, parce que cette activation est capable de surmonter le signal d'inhibition dû à l'engagement des récepteurs inhibiteurs KIR par les molécules de CMH de classe I (Wu, Song et al. 1999). De plus, Diefenbach et al. ont montré que la transfection de ligands comme H60 ou Rae1 dans des mélanomes ou lymphomes murins conférait aux cellules NK la capacité de reconnaître ces cellules tumorales et de prévenir in vivo la progression tumorale (Diefenbach, Jensen et al. 2001). Dans cette étude, ce deuxième mécanisme induit non seulement la réponse immunitaire innée, mais il induit et intensifie aussi la réponse immunitaire adaptative.

1-1.2 Les cellules NKT se présentent comme des effecteurs anti-tumoraux

Une sous-population de lymphocytes T, qui exprime certains marqueurs des cellules NK (cellules NKT) dont CD161 est le plus caractéristique, possède une activité anti-tumorale similaire aux cellules NK (Bendelac, Rivera et al. 1997) (Godfrey, MacDonald et al. 2004). Ces cellules ont un répertoire de TCR limité et présentent souvent le réarrangement caractéristique $V\alpha 14$ - $J\alpha 18$ associé à $V\beta 8.2$, $V\beta 7$ et $V\beta 2$ chez la souris, ou bien $V\alpha 24$ - $J\alpha 18$ associé à $V\beta 11$ chez l'homme (Lantz and Bendelac 1994) (Godfrey, Hammond et al. 2000).

Dans le système murin, l'administration de l'IL-12 est maintenant connue pour induire un effet anti-tumoral (Trinchieri and Scott 1999). Des études ont montré que l'IL-12 peut conduire à une activation de cellules NKT $V\alpha 14$. Cela suggère une fonction importante de cellules NKT dans l'effet anti-tumoral (Hashimoto, Takeda et al. 1995) (Takahashi, Ogasawara et al. 1996). L'équipe de Taniguchi au Japon a confirmé cette hypothèse en 1997 : les souris démunies de cellules NKT $V\alpha 14$ ne présentent pas d'effet anti-tumoral induit par IL-12 (Cui, Shin et al. 1997). L'activation des cellules NKT $V\alpha 14$ pourrait passer par la structure CD1.1 (CD1d chez l'homme) présentant des glycosylceramides. L' α -GalCer (α -galactosylceramide) pourrait se présenter comme un ligand potentiel du CD1d sur les cellules dendritiques responsable de l'activation des cellules NKT $V\alpha 14$ (Kawano, Cui et al. 1997) (Burdin, Brossay et al. 1998). En effet, l'injection de α -GalCer in vivo peut activer les NKT et prévenir les métastases tumorales (Kawano, Cui et al. 1998). Chez l'homme, les mêmes observations ont été rapportées: les cellules humaines NKT $V\alpha 24$ activées par α -GalCer déploient une cytotoxicité dépendante de la voie perforine-granzyme contre plusieurs sortes de lignées tumorales humaines (Kawano, Nakayama et al. 1999). Enfin, en l'absence de stimulateur potentiel comme l'IL-12 et α -GalCer, les cellules NKT peuvent aussi avoir un effet anti-tumoral (Smyth, Thia et al. 2000).

Les cellules NKT jouent non seulement un rôle direct dans la réponse anti-tumorale, mais aussi dans la réponse immunitaire adaptative en intervenant lors de l'activation de certaines cellules présentatrices de l'antigène, comme les cellules dendritiques.

1-2 Immunité adaptative

L'immunité innée n'est pas forcément efficace pour l'éradication ou le contrôle des cellules tumorales. L'immunité adaptative, caractérisée par l'expansion et la différenciation de lymphocytes spécifiques de l'antigène, constitue une deuxième ligne de défense anti-tumorale.

1-2.1 Les Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPAs)

L'activation des cellules spécialisées dans la présentation de l'antigène est la première étape indispensable à l'induction de l'immunité adaptative (Janeway 2001). Lorsque ces cellules spécialisées captent un antigène, elles sont activées et se dirigent vers le ganglion lymphatique le plus proche où elles se différencient en Cellules présentatrices d'antigènes (CPAs). Les CPAs sont constituées principalement par les cellules dendritiques (CDs), les macrophages et les cellules B, toutes issues des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Parmi ces trois types cellulaires, les cellules dendritiques sont considérées comme les plus stimulantes, parce qu'elles sont capables d'activer les lymphocytes T naïfs (Banchereau and Steinman 1998), et sont appelées pour cela cellules présentatrices d'antigènes professionnelles.

Une des caractéristiques des CPAs est leur expression constitutive des molécules du CMH de classe II. La présentation des peptides exogènes par les molécules de CMH de classe II conduit à l'activation des lymphocytes T CD4 spécifiques de ces antigènes (Toes, Ossendorp et al. 1999) (Turley, Inaba et al. 2000). Les CPAs peuvent non seulement présenter des antigènes endogènes comme toutes les autres cellules nucléées de l'organisme, mais aussi des antigènes exogènes par les molécules de CMH de classe I, selon un processus spécialisé appelé « **cross-presentation** » (Albert, Sauter et al. 1998). Ces peptides conduisent à l'activation des lymphocytes T CD8 avec ou sans l'aide des lymphocytes T CD4 spécifiques (Rocha and Tanchot 2004)

La reconnaissance du complexe CMH-peptide par le TCR spécifique de l'antigène constitue **un premier signal** de l'activation des lymphocytes T. Cependant, ce signal ne suffit pas à induire l'activation fonctionnelle des lymphocytes T. Il doit être renforcé par **un deuxième signal** dit de costimulation, délivré aussi par les CPAs via des molécules accessoires. Ces deux signaux favorisent la formation d'une synapse immunologique stable, qui amplifie et prolonge la signalisation par le TCR (Huppa and Davis 2003).

1-2.2 Molécules de costimulation

L'activation complète des lymphocytes T nécessite des seconds signaux, appelé **signaux de costimulations**. Actuellement, les molécules de costimulation les mieux caractérisées, et parmi les plus importantes, sont CD80 et CD86 (appelés aussi B7-1 et B7-2 ou B7) (Freedman, Freeman et al. 1987) (Freeman, Gray et al. 1991) (Lenschow, Walunas et al. 1996). Ces molécules B7 engagent le récepteur CD28 sur le lymphocyte T (Green, Noel et al. 1994). Le signal de costimulation induit par CD28 peut augmenter la production de l'IL2 par le lymphocyte T (Fraser, Irving et al. 1991) (Wells, Gudmundsdottir et al. 1997) et l'expression du récepteur de forte affinité pour l'IL2 (Shahinian, Pfeffer et al. 1993). Nous savons que la synthèse de l'IL2 est déterminante dans la prolifération des cellules T (Schwartz 1992) (Minami, Kono et al. 1993). La stimulation de CD28 par son ligand B7 pourrait agir aussi sur la survie des lymphocytes activés en augmentant l'expression du gène anti-apoptotique Bcl-X_L (Boise, Minn et al. 1995). De nombreux effets directs et indirects de CD28 ont été bien décrits dans la revue de O. Acuto et F. Michel et le terme 'second wave' a été utilisé pour décrire l'induction de l'expression des récepteurs des autres molécules de costimulation par la stimulation de CD28 (Acuto and Michel 2003).

L'expression optimale de B7 par la CPA, comme certaines autres molécules de costimulation (ICOSL, OX40L, etc...), dépend également de la stimulation du récepteur CD40 de la CPA par le CD40L du lymphocyte T engagé dans un processus d'activation réciproque (Banchereau, Bazan et al. 1994) (Acuto and Michel 2003). Certaines molécules sont impliquées plus spécifiquement dans l'interaction entre les CPAs et les sous-populations des lymphocytes T : CD40, comme OX40L, a une action préférentielle sur les cellules T CD4 ; 4-1BBL sur les lymphocytes T CD8 ; et ICOSL sur les lymphocytes TFH qui aident les lymphocytes B dans les centres germinatifs à se différencier (Whitmire, Flavell et al. 1999) (Murata, Ishii et al. 2000) (DeBenedette, Wen et al. 1999) (Tan, Whitmire et al. 1999) (Breitfeld, Ohl et al. 2000) (Whitmire and Ahmed 2000).

Une molécule présentant des homologies avec CD28, est le CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4, CD152). Cette molécule s'exprime tardivement après l'activation des lymphocytes T et elle partage avec CD28 la reconnaissance des ligands B7. CTLA-4 joue un rôle opposé par rapport au CD28. La liaison de CTLA-4 –B7, qui possède une avidité vingt fois plus fort

que celle de CD28-B7, envoie un signal inhibiteur au lymphocyte T activé qui limite sa réponse proliférative induite par l'antigène spécifique et CD28 (Allison and Krummel 1995) (Waterhouse, Marengere et al. 1996) (Chambers, Kuhns et al. 2001). Des souris Knock-out pour le gène CTLA-4 développent une maladie mortelle en 3-4 semaines caractérisée par une prolifération lymphocytaire massive (Waterhouse, Penninger et al. 1995).

1-2.3 La synapse immunologique

Le terme de synapse immunologique a été proposé pour la première fois par M.Norcross en décrivant l'interaction entre les CPA et les lymphocytes T (Norcross 1984). Bien qu'il ait été évoqué dès 1984, ce concept immunologique n'a été largement accepté que depuis une dizaine d'années (Monks, Freiberg et al. 1998) (Grakoui, Bromley et al. 1999) (Delon and Germain 2000). La synapse immune est une interface cellulaire organisée, qui se forme à la jonction entre la membrane de la CPA et celle du lymphocyte T (**Figure 2a**). Les complexes CMH I ou II –peptide /TCR-CD3 ainsi que certaines molécules de costimulation avec leurs récepteurs (CD80/CD86-CD28, CD80/CD86-CTLA4) s'accumulent au centre d'un anneau bordé des molécules d'adhérence (LFA1-ICAM1, CD2-CD48/CD59). Cette structure exclut des molécules à fort encombrement stérique telles que CD43 ou CD45 de la zone de contact avec les CPA (Johnson, Bromley et al. 2000) (Delon, Kaibuchi et al. 2001) (Savage, Kimzey et al. 2002). (**Figure 2b**)

La formation de la synapse immunologique s'accompagne aussi d'un remaniement du cytosquelette d'actine (Dustin and Cooper 2000) et d'une polarisation de l'appareil sécrétoire du lymphocyte T vers la CPA (van Der Merwe and Davis 2002). Cette formation est organisée et modulée dans le temps et dans l'espace et elle facilite la transmission efficace du signal d'activation aux lymphocytes T. La stabilité de synapse mature peut durer quelques minutes et même aller jusqu'à plusieurs heures (Huppa and Davis 2003). Finalement, le déclenchement de la mitose et l'augmentation de l'expression de CTLA-4 provoquée par l'activation cellulaire vont contribuer à la déstructuration de la synapse et l'arrêt du signal d'activation (Lee, Chuang et al. 1998) (Egen and Allison 2002).

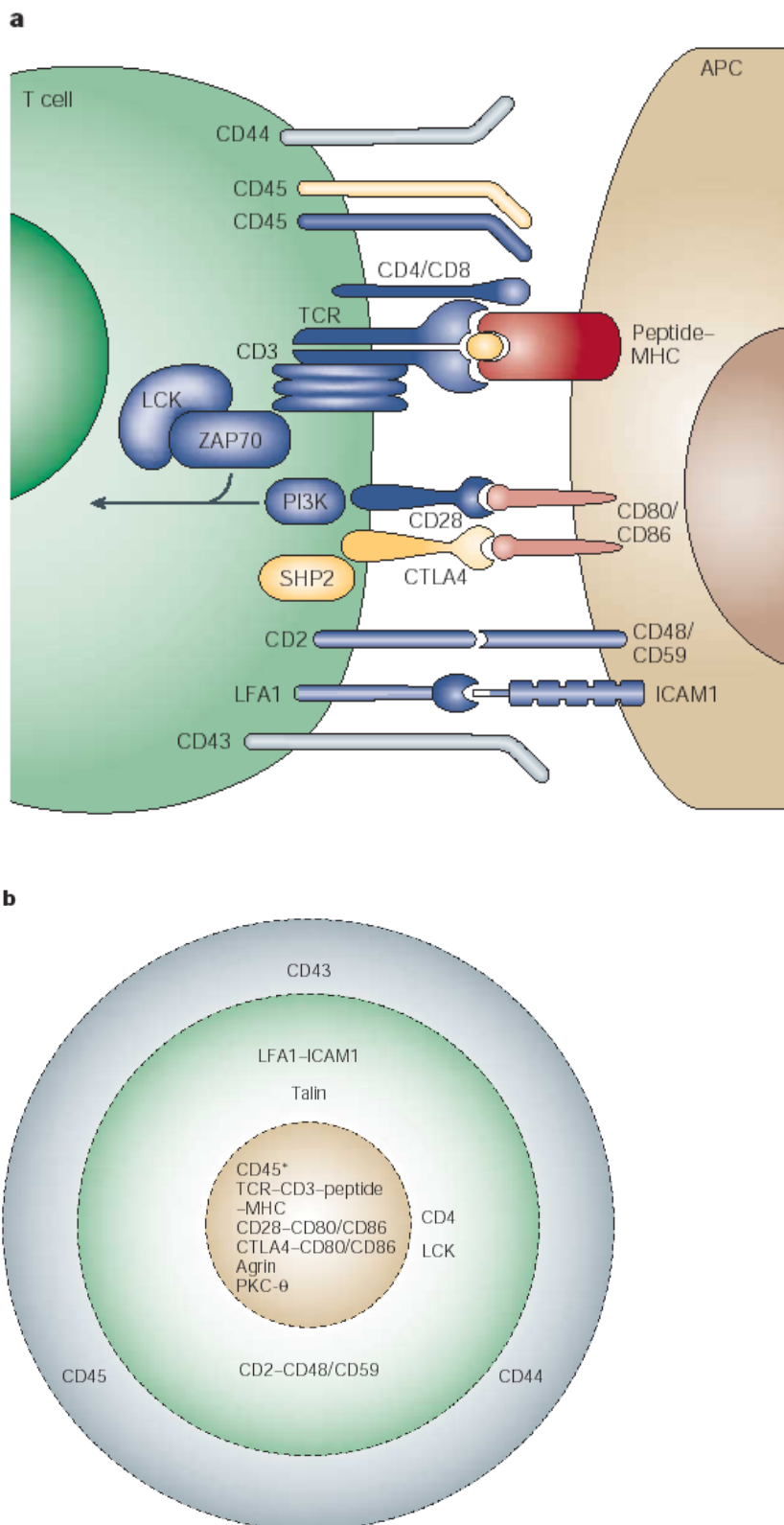


Figure 2 Vue générale de la synapse immunologique mature. D’après (Huppa and Davis 2003)

1-2.4 Les lymphocytes T CD8⁺ et leurs mécanismes de cytotoxicité

Après leur activation et leur prolifération, les lymphocytes T CD8⁺ naïfs se différencient en cellules effectrices ou en cellules mémoires.

Les cellules T mémoires peuvent être réparties en deux sous-population : cellules T mémoires effectrices (TEM) et centrales (TCM) (Hamann, Baars et al. 1997) (Sallusto, Lenig et al. 1999). Les TEM sont capables de répondre rapidement à une stimulation antigénique, les TCM n'exercent pas de fonctions directes et peuvent se différencier en TEM sous stimulation. Cela signifie que ces deux populations représentent deux stades successifs de différenciation, et que les TCM soutiennent la réponse plus tardivement et à régénèrent la population de TEM (Lanzavecchia and Sallusto 2000).

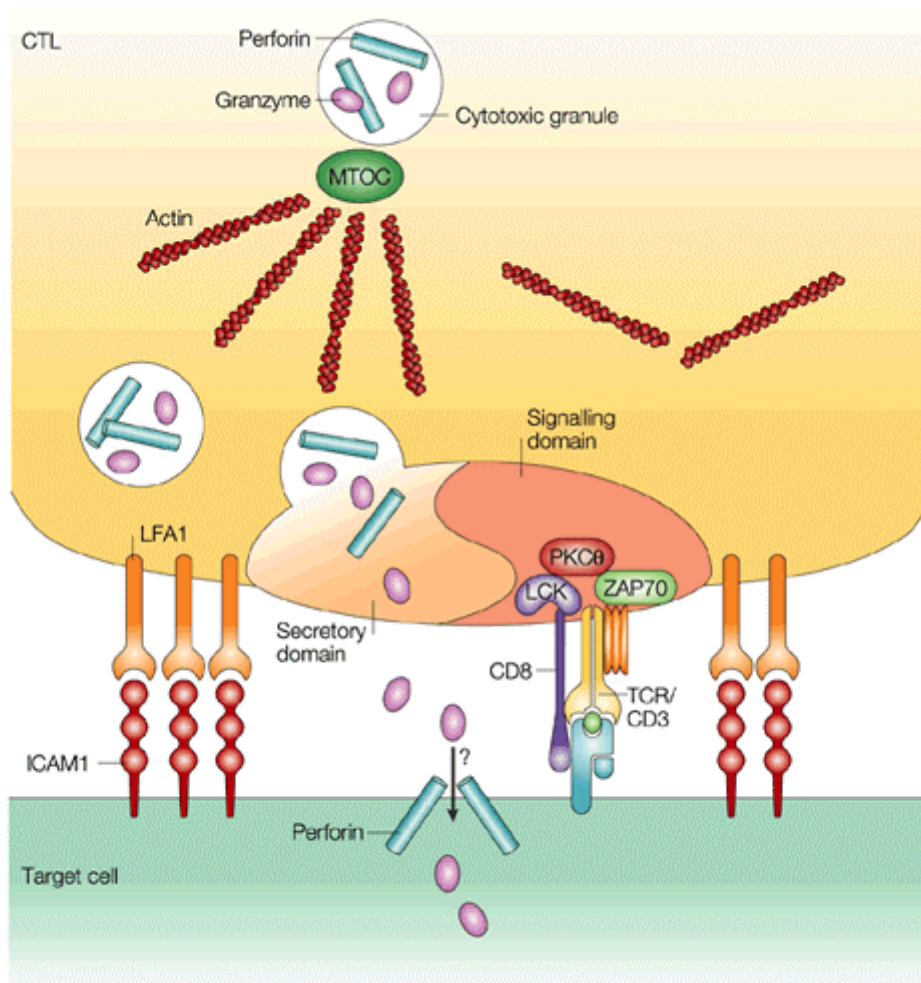
L'effet cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs est la principale fonction du système immunitaire adaptatif contre les tumeurs. Ce rôle majeur a été bien montré dans des modèles expérimentaux murins ainsi que dans de nombreuses observations cliniques chez l'homme (Itoh, Platsoucas et al. 1988) (Belldegrun, Muul et al. 1988) (Lurquin, Van Pel et al. 1989) (Mandelboim, Berke et al. 1994) (Mackensen, Carcelain et al. 1994). Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques sont efficaces en déclenchant l'apoptose des cellules cibles via de multiples voies de lyse.

(a) Voie lytique Perforine /Granzime

L'un des principaux mécanismes d'action des CTLs est la libération dépendante du calcium de granules lytiques spécialisés suite à la reconnaissance de l'antigène à la surface de la cellule cible. Après l'engagement du TCR des CTLs, il est intéressant de noter les réorganisations importantes du cytosquelette d'actine : En effet, le centre organisateur des microtubules (MTOC) se ré-orienté vers la synapse et intervient dans la ségrégation des molécules de signalisation, dans la relocalisation de l'appareil sécrétoire et dans la libération polarisée des lymphokines et des granules cytolytiques dans l'espace délimité par la synapse (Kuhn and Poenie 2002). **(Figure 3)**

Les protéines et les enzymes effectrices cytotoxiques qui induisent l'apoptose sont stockées dans ces granules. Parmi celles-ci, la perforine et les granzymes (dont les mieux caractérisés sont les granzymes A et B) sont les plus connues. La perforine est capable de se polymériser en présence de calcium pour former des pores à travers la membrane des cibles, cependant la fonction précise de ces pores n'est pas encore clarifiée (Lieberman 2003). Depuis longtemps, il était admis que les granzymes ne pénétraient dans les cellules cible qu'à travers ces pores transmembranaires formés par la perforine (Janeway 2001). Ce concept a été bouleversé par l'internalisation du granzyme B dans la cellule cible en l'absence de perforine (Pinkoski, Hobman et al. 1998). Plus précisément, le récepteur du granzyme B à la surface de la cellule cible, qui permet l'entrée de la molécule par endocytose, a été identifié (Motyka, Korbitt et al. 2000): c'est le récepteur du mannose 6 phosphate (MPR), déjà connu pour cibler les acides hydrolases vers les lysosomes à la sortie du trans Golgi, ainsi que les granzymes A et B vers les granules cytotoxiques (Griffiths and Isaaz 1993) Cependant le mécanisme exact concernant l'endocytose des granzymes et de perforine n'est pas clair (Trapani and Smyth 2002). Une fois que ces granzymes entrent dans les cellules cible, ils déclenchent l'apoptose avec l'aide de la perforine (Heusel, Wesselschmidt et al. 1994) (Trapani, Davis et al. 2000).

De nombreuses autres protéines sont présentes dans les granules d'exocytose des CTLs et possèdent aussi leur rôle dans l'activité cytotoxique (Lieberman 2003). Parmi lesquelles, il faut citer la granulysine, une protéine toxique qui détruit directement les membranes bactériennes (Pena and Krensky 1997) et induit l'apoptose de lignées tumorales in vitro sous forme recombinante (Wang, Choice et al. 2000).



Nature Reviews | Immunology

Figure 3 La perforine et les granzymes sont libérés au niveau de la synapse immunologique. D'après (Lieberman 2003)

(b) Voie apoptotique Fas/Fas ligand

Les CTLs peuvent également déclencher l'apoptose via la voie Fas/Fas Ligand qui ne dépend pas de la perforine ni du calcium, bien que ce dernier soit nécessaire pour la synthèse et la mobilisation intracellulaire de FasL (Helgason, Prendergast et al. 1992) (Rouvier, Luciani et al. 1993).

Les CTLs expriment à leur surface les molécules qui appartiennent à la superfamille du TNF et qui sont actives sous forme trimérique comme FasL (Nagata and Golstein 1995). FasL vise

des cibles moléculaires Fas qui font partie du groupe du récepteur du TNF comme TNFR-1 (récepteur du TNF de type 1). FasL induit la trimérisation du récepteur FAS (CD95) et donc de ses trois domaines de mort (Death domain) (Itoh and Nagata 1993), puis entraîne l'association avec la protéine adaptatrice FADD (Fas associated death domain) (Chinnaiyan, O'Rourke et al. 1995). FADD, par l'intermédiaire de son domaine NH₂-terminal appelé DED (death effector domain), s'associe avec le domaine DED du prodomaine de la procaspase-8 et l'active (Muzio, Chinnaiyan et al. 1996). Le complexe multiprotéique formé à la membrane par Fas, FADD et la caspase-8 est appelé le DISC (death-inducing signaling complex) (Kischkel, Hellbardt et al. 1995). La caspase-8 déclenche deux voies de signalisations -directe ou indirecte- de la caspase-3 pour aboutir à l'apoptose (Scaffidi, Fulda et al. 1998): **dans la voie directe**, la caspase-8 activée peut induire une cascade d'activation de caspases qui activent directement la caspase 3, à condition que sa quantité soit suffisante (système de type I) ; **dans la voie indirecte**, la caspase-8 activée peut, par l'intermédiaire du clivage de la protéine pro-apoptotique Bid (Li, Zhu et al. 1998) (Luo, Budihardjo et al. 1998), induire la relocalisation de BAX au niveau de la membrane mitochondriale ; ensuite, le cytochrome C, libéré par la mitochondrie, interagit avec Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor-1) et la procaspase-9. Cette interaction entraîne l'activation de la procaspase-9 en caspase-9 qui elle-même est responsable de l'activation de la caspase-3 (système de type II) (Chinnaiyan, O'Rourke et al. 1997) (Daugas, Nochy et al. 2000) (Lenardo, Chan et al. 1999). **(Figure 4)** Une autre protéine AIF (Apoptosis inducing factor) pourrait être libérée par la mitochondrie pour déclencher directement l'apoptose, indépendamment de l'activation des caspases (Daugas, Nochy et al. 2000) (Joza, Susin et al. 2001).

D'autres molécules parmi les homologues de TNF peuvent jouer aussi un rôle cytotoxique. Leurs récepteurs possèdent un domaine cytoplasmique homologue à celui de Fas, responsable de la transduction du signal menant à l'apoptose, et parmi ces récepteurs, certains ont été bien caractérisés, comme TNFR1, DR3 ou Apo3, DR4 ou Apo2/TrailR1, DR5 ou TrailR2, DR6 (Ashkenazi and Dixit 1998).

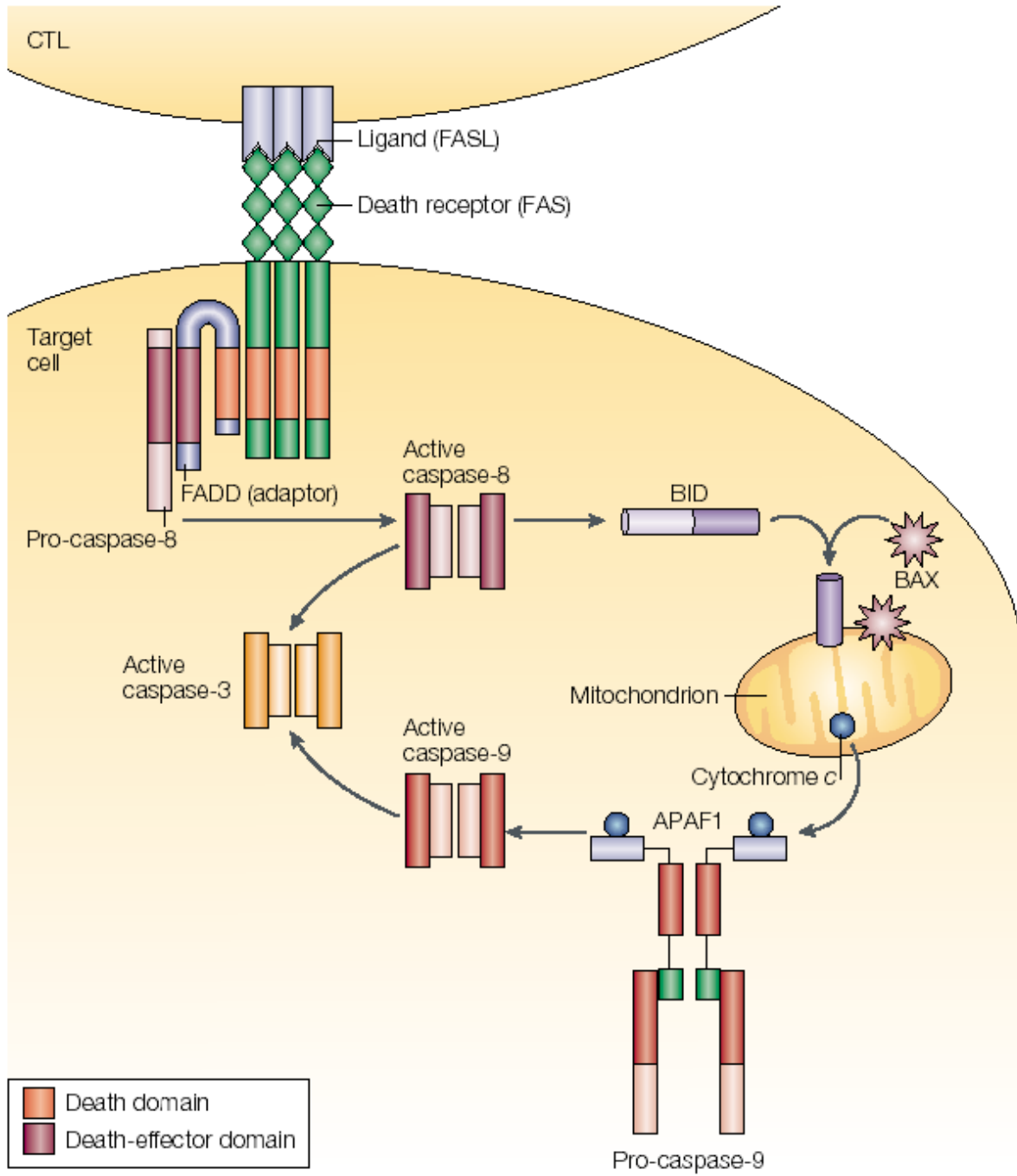


Figure 4 Induction de l'apoptose par FasL. D'après (Barry and Bleackley 2002)

(c) Autres voies

Les CTLs peuvent aussi exprimer leur cytotoxicité par la sécrétion des cytokines comme l'IFN- γ , le TNF- α et le TNF- β qui contribuent à la défense anti-tumorale par différents mécanismes. L'IFN- γ , souvent associé aux TNF, peut avoir une activité cytotoxique directe contre certaines tumeurs (Williamson, Carswell et al. 1983) (Fransen, Van der Heyden et al. 1986). Il inhibe la prolifération des cellules tumorales (Pfizenmaier, Bartsch et al. 1985) (Coughlin, Salhany et al. 1998), active également les macrophages (Boehm, Klamp et al. 1997) et induit une augmentation de l'expression des molécules du CMH améliorant ainsi la reconnaissance des antigènes par les CTLs (Greenberg 1991) (Janeway 2001). Si l'IFN- γ est connu pour intervenir dans la cytotoxicité anti-tumorale, on notera par ailleurs que cette cytokine est impliquée dans l'inhibition de l'angiogenèse tumorale (Qin, Schwartzkopff et al. 2003). Les TNF possèdent des fonctions anti-tumorales en interagissant avec les TNFR-1 ou TNFR-2. Ils pourraient aussi agir en synergie avec l'IFN- γ lors de l'activation du macrophage (Barth, Mule et al. 1991) (Poehlein, Hu et al. 2003) (Aggarwal 2003).

En conclusion, les CTLs sont capables de déclencher l'apoptose au travers de plusieurs voies, activées indépendamment dans des contextes différents, mais qui pourraient aussi se réunir pour agir de concert.

1-2.5 Fonction de lymphocytes T CD4+ dans l'immunité anti-tumorale

Le rôle des lymphocytes T CD8+ a particulièrement focalisé l'attention des chercheurs, non seulement parce que la plupart de tumeurs n'expriment que les molécules de CMH classe I et sans classe II, mais aussi parce que les cellules T CD8+ sont capables de lyser directement les cellules tumorales. De plus à partir des lymphocytes CD8+ spécifiques cytotoxiques anti-tumoraux, il est possible d'identifier les antigènes tumoraux (Van Der Bruggen, Zhang et al. 2002). L'importance de la place des lymphocytes T CD4+ dans la réponse immune anti-tumorale n'a été révélée que depuis ces dix dernières années (Ossendorp, Toes et al. 2000), bien que l'initiation de l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) CD8 par les cellules T CD4+ ait été documenté dès 1982 (Keene and Forman 1982).

1-2.5.1 Les sous-populations de lymphocytes T CD4+

Les lymphocytes T CD4+ peuvent se différencier en plusieurs sous-populations. Les deux sous-populations les plus connues sont **Th1** et **Th2**. Les cellules Th1 secrètent principalement de l'INF- γ , de l'IL2, du TNF- α et du TNF- β et conduisent à une immunité de type cellulaire. Elles jouent un rôle dans l'activation des cellules NK, dans l'amplification des fonctions des macrophages et dans la différenciation des cellules cytolytiques. Elles contribuent également à l'élimination des pathogènes intracellulaires. Par contre, Les cellules Th2 produisent préférentiellement de l'IL4, de l'IL5, de l'IL10, de l'IL13 et du TGF- β et elles mènent plutôt à une immunité de type humorale. Elles sont chargées de l'activation des lymphocytes B, de l'induction de la sécrétion d'immunoglobulines, de l'activation de mastocytes et éosinophiles et elles sont aussi antagonistes des Th1 par l'effet de l'IL4 (Mosmann, Li et al. 1997) (Romagnani 1997).

Actuellement, les mécanismes qui déterminent si une cellule T CD4+ va se différencier en Th1 ou Th2 ne sont pas entièrement définis. Cependant, nous connaissons quelques paramètres qui peuvent fortement influencer la décision de cette différenciation: certaines cytokines présentes dans les phases initiales de la différenciation (Comme l'IL12 pour Th1 ou l'IL4 pour TH2) (Liew 2002) (Trinchieri 2003); l'affinité du TCR et la quantité d'Ag présentée par les CPAs (Faible affinité et/ou quantité pour les Th2) (Blander, Sant'Angelo et al. 2000; Boonstra, Asselin-Paturel et al. 2003); des cosignaux rencontrés lors de l'activation

des lymphocytes T CD4⁺ (B7-CD28 ou ICOSL-ICOS pour les Th2) (Kuchroo, Das et al. 1995) (Coyle, Lehar et al. 2000); et la cinétique d'activation des CPAs (Une courte durée pour les Th1) (Langenkamp, Messi et al. 2000).

Il existe aussi d'autres sous-populations de CD4 : Une population nommée **Th3** a été découverte par l'équipe de H.L. Weiner dans le contexte de la tolérance orale (Khoury, Hancock et al. 1992) (Chen, Kuchroo et al. 1994) (Fukaura, Kent et al. 1996). Le profil de production des cytokines de Th3 est caractérisé par la sécrétion de quantité élevées de TGF- β . Les clones T CD4 obtenus par l'équipe de H. Groux, qui possèdent une propriété suppressive de la prolifération des lymphocytes T effecteurs, ont été dénommés **Tr1**. Ceux-ci sont capables de produire une quantité élevée d'IL10 et d'IL5, un faible taux de TGF- β et d'IL2, mais pas d'IL4 ou d'IFN- γ (Groux, O'Garra et al. 1997).

Une autre sous-population de T CD4, appelée **Treg**, exprime constitutivement la chaîne α du récepteur à l'IL2 (CD25) et la molécule CTLA-4. Elle secrète après activation des quantités élevées de cytokines immunosuppressives comme l'IL10 ou le TGF- β (Jonuleit, Schmitt et al. 2002) (Fehervari and Sakaguchi 2004).

1-2.5.2 Rôle crucial des lymphocytes T CD4⁺ dans l'immunité spécifique anti-tumorale

Dans la plupart des cas de tumeurs dans un contexte non inflammatoire, les lymphocytes T CD8⁺ naïfs sont initiés par les cellules T CD4⁺ spécifiques avec comme intermédiaire commun les CPAs, bien que ces mécanismes ne soient pas tout à fait clarifiés (Huang, Golumbek et al. 1994) (Toes, Ossendorp et al. 1999). Cette initiation a été bien démontrée dans le modèle des souris knock-out pour le gène CD4 ou par la méthode de déplétion des cellules T CD4⁺ par les anticorps anti-CD4 (Hung, Hayashi et al. 1998). Depuis les années 90, on a découvert que l'interaction entre la molécule CD40 exprimée par les CPAs et leur ligand CD40L (CD154) exprimé par les T CD4⁺ est impliquée dans l'immunité protectrice anti-tumorale (Mackey, Gunn et al. 1997) (Mackey, Gunn et al. 1998). En plus, cette interaction joue un rôle crucial dans l'initiation et l'activation des T CD8⁺ (Ridge, Di Rosa et al. 1998) (Schoenberger, Toes et al. 1998) (Bennett, Carbone et al. 1998) : les lymphocytes T

CD4⁺ sont activés successivement par l'antigène présenté par les molécules de CMH classe II des CPAs, puis par un signal de costimulation venant des CPAs. Ensuite, à l'inverse, **ces CPAs peuvent être activées** par les T CD4⁺ avec l'interaction CD40L-CD40 et devenir compétentes pour initier les T CD8⁺ par la voie CMH classe I restreinte (Banchereau and Steinman 1998) (Ridge, Di Rosa et al. 1998) (Schoenberger, Toes et al. 1998) (Bennett, Carbone et al. 1998).

En dehors du rôle important concernant l'initiation des lymphocytes T CD8⁺, les cellules T CD4⁺ sont aussi essentielles dans la maintenance de la prolifération et des fonctions des effecteurs T CD8⁺ (CTLs) **via la sécrétion des cytokines** dont l'IL-2 est la plus connue. IL-2 participe à la différenciation et à la survie des CTLs, elle contribue à leur protection contre l'apoptose et l'anergie, à la maintenance de leur capacité cytotoxique et au support de leur production de cytokines (Fearon, Pardoll et al. 1990) (Rosenberg, Yang et al. 1998).

Récemment, Giuntoli et ses collègues ont découvert qu'il existe **une activation directe des CTLs** par les T CD4⁺ : l'effet cytotoxique des CTLs peut être augmenté par les T CD4⁺ au travers des molécules de costimulation (par exemple : CD27, CD134 et CMH classe II) (Giuntoli, Lu et al. 2002). Les autres études ont démontré que les lymphocytes T CD4⁺ non seulement arrivent à maintenir le nombre des lymphocytes T CD8⁺, mais également à moduler l'environnement tumoral pour favoriser l'infiltration des T CD8⁺ (Marzo, Kinnear et al. 2000) et à réactiver des CTLs mémoires (Gao, Khammanivong et al. 2002). Les T CD4⁺ peuvent aussi éradiquer les cellules tumorales au travers du recrutement et de **l'activation des autres cellules effectrices** comme les macrophages et les éosinophiles (Hung, Hayashi et al. 1998) (Mattes, Hulett et al. 2003). Dans l'inhibition de la croissance de tumeurs, le rôle pivot des cellules T CD4⁺ a été démontré par différentes approches expérimentales. D'une part, en absence des lymphocytes T CD8⁺, lymphocytes B et cellules NK, les cellules T CD4⁺ peuvent toutes seules inhiber la prolifération des cellules tumorales *in vivo*, et même les lyser *in vitro* dans les modèles murins (Lundin, Hofgaard et al. 2003) (Flynn and Stockinger 2003). D'autre part, chez la souris knock-out pour le gène CD4 la croissance de la tumeur est mal contrôlée (Hung, Hayashi et al. 1998). Les T CD4⁺ peuvent aussi induire une cytotoxicité directe au travers la voie Trail (Thomas and Hersey 1998) ou perforine /granzymes (Echchakir, Bagot et al. 2000) dans des modèles tumoraux différents. Certaines cytokines comme IFN- γ , qui sont sécrétées par les lymphocytes T CD4⁺, pourraient être impliquées dans les activités anti-tumorales et dans la destruction de la vascularisation tumorale

(Mumberg, Monach et al. 1999) (Qin and Blankenstein 2000). Récemment, l'équipe de JY Niederkorn a découvert que dans un modèle de tumeur intra-oculaire l'IFN- γ secrété par les cellules T CD4+ elles-mêmes est indispensable quand les T CD4+ lysent les cellules tumorales via la voie Trail/TrailR (Wang, Boonman et al. 2003).

Toutes les propriétés décrites ci-dessus concernent plutôt les cellules CD4+ Th1. Si les T CD4+ Th1 participent principalement à l'immunité cellulaire, les Th2 peuvent eux **activer les lymphocytes B** qui se différencient en plasmocytes. Les anticorps secrétés par ces plasmocytes contribuent à la réponse humorale anti-tumorale (Glennie and Johnson 2000). De plus, on a démontré une collaboration entre l'immunité anti-tumorale cellulaire et humorale dans certains modèles (Reilly, Machiels et al. 2001).

En conclusion, les cellules T CD4+ peuvent induire un effet anti-tumoral avec des mécanismes variés. Elles peuvent jouer un rôle crucial dans l'initiation des T CD8+ en assurant un apprêtement de CPAs via l'interaction CD40L et CD40. Elles secrètent des cytokines pour maintenir la fonction et la prolifération des CTLs, elles inhibent aussi la croissance de tumeurs directement ou indirectement et apportent une aide indispensable pour l'activation des lymphocytes B (Wang 2001). **(Figure 5)**

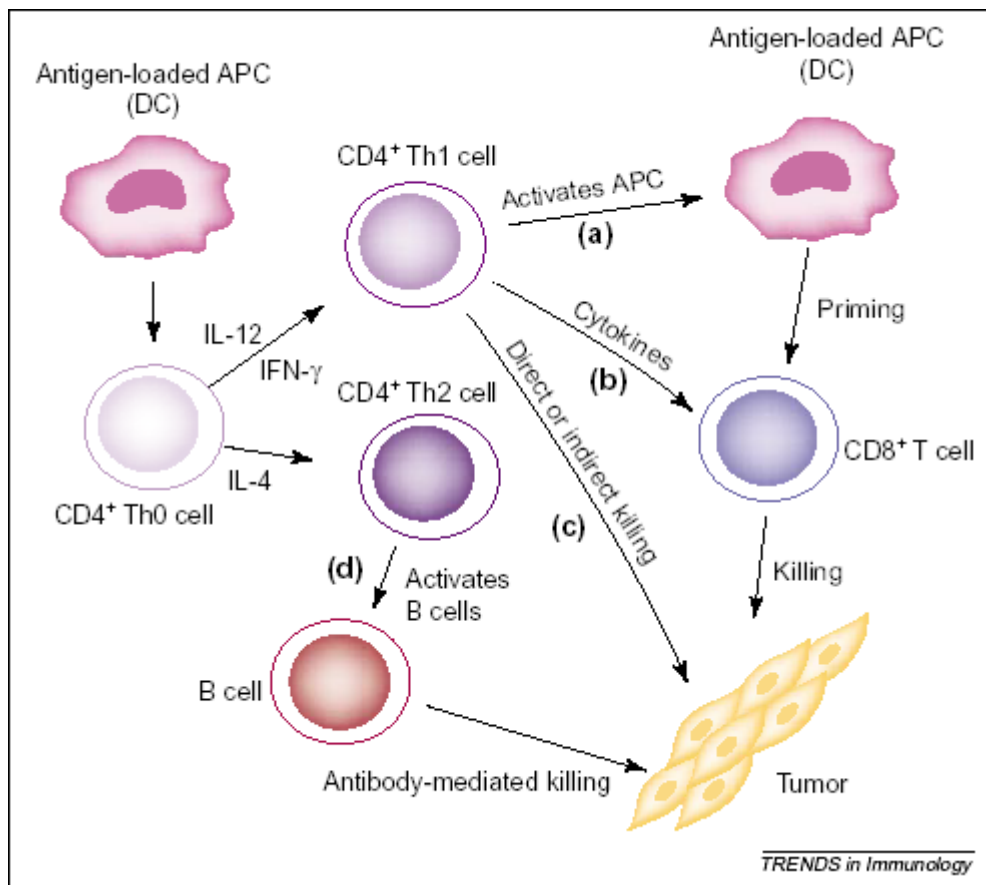


Figure 5 Rôle des cellules T CD4+ dans la modulation des réponses immunes anti-tumorales. D'après (Wang 2001)

2 Échappement de la tumeur par le système immunitaire

Il est donc bien établi que les cellules tumorales peuvent être reconnues par des cellules effectrices du système immunitaire. Cependant, les tumeurs continuent de se développer et des métastases envahissent les différents organes chez les patients. En effet, ces tumeurs, qui apparaissent cliniquement, ont déjà été sélectionnées pour échapper au système immunitaire inné et adaptatif (Pardoll 2003). Les mécanismes d'échappement sont multiples et peuvent se cumuler.

2-1 Altération de la présentation d'antigène

La perte partielle ou complète de l'expression de la molécule du CMH de classe I représente un mécanisme classique d'échappement tumoral pour résister à la lyse par les lymphocytes T CD8 spécifiques (Seliger, Cabrera et al. 2002).

Les mécanismes liés à cette perte d'expression peuvent être multiples, ils peuvent trouver leur origine dans une mutation ou une délétion de la β 2-microglobuline qui est indispensable pour la formation et l'expression des molécules du CMH de classe I. Ces phénomènes ont été trouvés dans de nombreuses tumeurs et surtout chez le mélanome et le carcinome colorectal (D'Urso, Wang et al. 1991; Gattoni-Celli, Kirsch et al. 1992) (Bicknell, Rowan et al. 1994). Il peut exister aussi une absence des molécules transporter activated peptide (TAP), ces molécules participent activement au transport des peptides du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique où les peptides peuvent s'associer aux molécules de CMH. Cette association est essentielle et permet l'expression du message antigénique spécifique et la stabilisation des complexes CMH-peptides à la surface cellulaire. Quand il y a des mutations dans TAP1 ou TAP2, les molécules du CMH de classe I dans le réticulum endoplasmique sont instables et sont éventuellement dirigées vers le cytosol, où elles sont dégradées (Restifo, Esquivel et al. 1993) (Cromme, Airey et al. 1994) (Chen, Gabrilovich et al. 1996). D'autres anomalies peuvent survenir à toutes les étapes de cet adressage intracellulaire : non seulement des mutations portant sur les gènes de β 2-microglobuline, des transporteurs TAP, mais également d'autres altérations tout au long de cet apprêtement des antigènes tumoraux (Garcia-Lora, Algarra et al. 2003). **(Figure 6)**

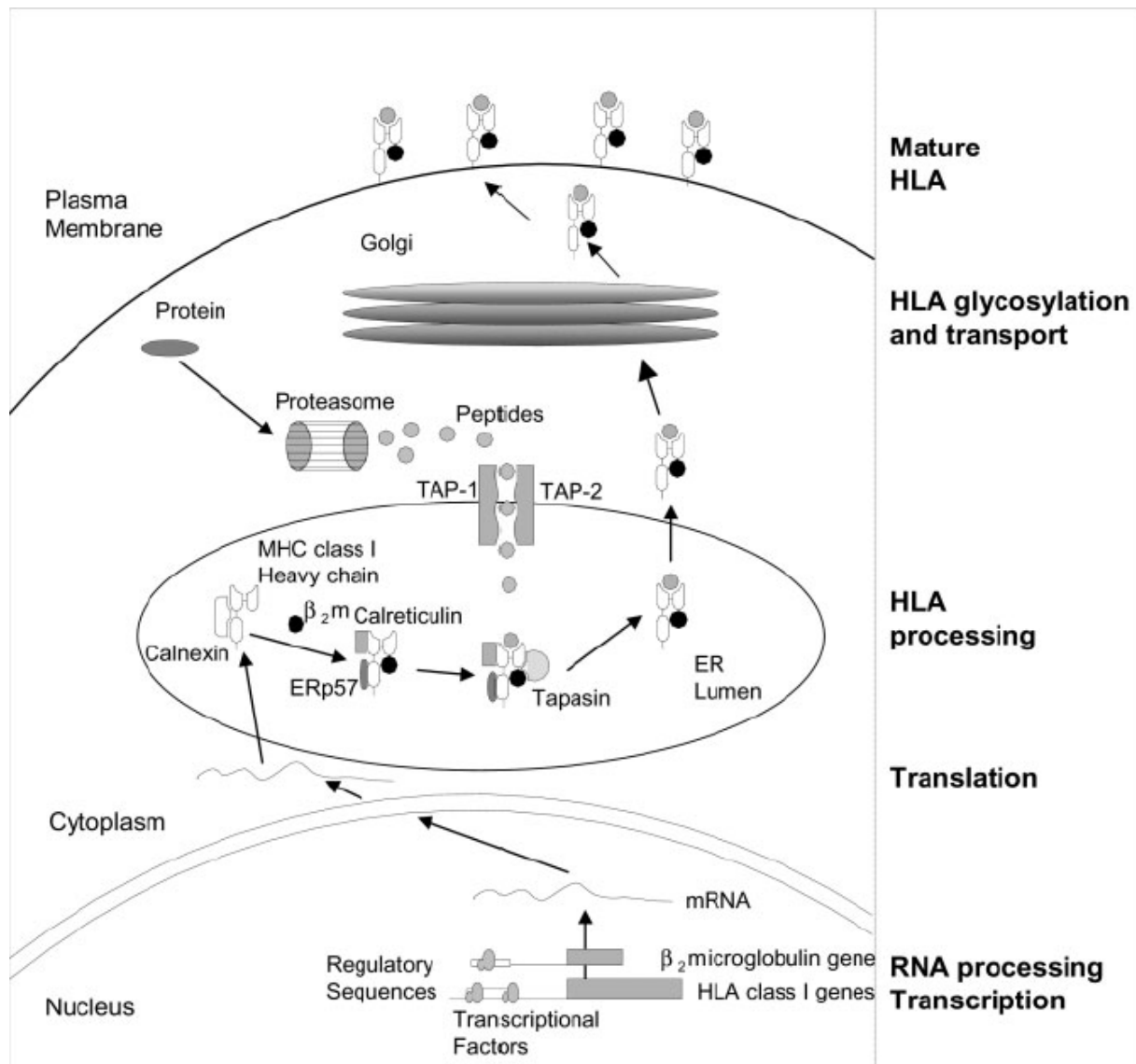


Figure 6 Schéma général de l'adressage intracellulaire des peptides associés aux molécules du CMH de classe I. ER : endoplasmatic reticulum. D'après (Garcia-Lora, Algarra et al. 2003)

Etant donnée que les cellules NK peuvent être activées via le système 'Missing self recognition', la perte totale de molécules du CMH de classe I est moins avantageuse pour la tumeur. Les altérations de l'expression des molécules du CMH sont de temps en temps plus fines, comme les pertes de l'haplotype, du locus même d'un simple allèle (Garrido, Ruiz-Cabello et al. 1997). Cette perte partielle de l'expression de la molécule du CMH contribue à

abolir l'immunogénéicité à l'égard des lymphocytes T en inhibant la présentation d'un ou plusieurs épitopes dominants, tout en conservant aux cellules tumorales leur aptitude à stimuler certains récepteurs des lymphocytes NK inhibant la mise en jeu de ce type de lyse (Garcia-Lora, Algarra et al. 2003).

Le mécanisme « Antigenic drift », qui avait été décrit dans l'échappement de la reconnaissance immune pour les virus (Ciurea, Hunziker et al. 2001), a été montré récemment dans les tumeurs : les multiples mutations tumorales peuvent conduire à une perte de l'antigénicité initiale et expliquent la faible efficacité d'une réponse cellulaire anti-tumorale (Bai, Liu et al. 2003). Le taux d'expression protéique est aussi un paramètre important, la reconnaissance et la lyse par les CTLs spécifiques d'un complexe CMH-peptide des cellules tumorales nécessitant une quantité suffisante d'antigènes (Labarriere, Diez et al. 1997).

2-2 Inhibition de l'apoptose induite par les lymphocytes T spécifiques

La voie FasL/Fas a une importance cruciale dans la réponse immunitaire en induisant l'apoptose des cellules tumorales. Cependant, ces dernières sont capables de détourner cette machinerie en utilisant différentes méthodes.

2-2.1 Inhibition directe

L'inhibition de l'apoptose peut avoir lieu au niveau du récepteur Fas s'exprimant sur les cellules tumorales par le biais de plusieurs mécanismes : Gronbaek et al ont montré des mutations du gène Fas dans les lymphomes malins non-hodgkiniens (LMNH) (Gronbaek, Straten et al. 1998) ; il existe aussi une inhibition de l'expression du récepteur Fas par l'oncogène RAS (Fenton, Hixon et al. 1998) (Peli, Schroter et al. 1999) ; on a découvert également une internalisation du Fas avec destruction dans les lysosomes dans des cellules infectées par un adénovirus (Tollefson, Hermiston et al. 1998). Ces mécanismes peuvent aussi être trouvés dans le cas de l'apoptose médiée par TRAIL-R (Hersey and Zhang 2001).

Certaines cellules tumorales arrivent à sécréter les récepteurs Fas solubles afin d'empêcher des lymphocytes T FasL+ d'atteindre leur cible cellulaire exprimant Fas. Cette stratégie

nommée « leurres » ('decoy'), aide les cellules tumorales à neutraliser les FasL des cellules effectrices par leurs molécules solubles sécrétées sans transmettre le signal de mort. Par exemple, DcR3 (Decoy receptor 3) possède la partie extracellulaire de Fas, et cependant il est dépourvu de région transmembranaire. L'expression de cette molécule a été décrite dans de nombreuses tumeurs comme les cancers du côlon et du poumon (Pitti, Marsters et al. 1998), les gliomes malins (Roth, Isenmann et al. 2001). Takahama et al ont montré une expression forte de DcR3 chez 25% des patients atteints de cancer gastrique. Elle est corrélée à une survie plus courte (Takahama, Yamada et al. 2002).

Dans la cascade intracellulaire de l'apoptose induite par Fas ou TRAIL-R, la surexpression des inhibiteurs de l'apoptose peut conférer aux cellules une résistance à l'apoptose. La molécule FLIP (FADD-like IL1 β -converting enzyme [FLICE] /caspase-8-inhibitory proteins), un inhibiteur de l'apoptose de la famille ADED (Anti-apoptotic death effector domain), est capable de s'associer à FADD ou à la caspase-8 en utilisant ces deux domaines DED afin d'inhiber le recrutement et l'activation de la caspase-8 au niveau du DISC (Irmeler, Thome et al. 1997). Thome et al ont montré une expression élevée de FLIP dans les mélanomes, ce qui a conduit à l'hypothèse selon laquelle FLIP pouvait aider les cellules tumorales à échapper au contrôle du système immunitaire (Thome, Schneider et al. 1997). Cette hypothèse a été confirmée par deux équipes indépendantes en 1999 (French and Tschopp 1999). Ces études indiquent que les cellules tumorales transfectées avec le gène codant pour le FLIP viral (Djerbi, Screpanti et al. 1999) ou cellulaire (Medema, de Jong et al. 1999), comparées avec les mêmes cellules tumorales transfectées avec un vecteur vide, avaient un avantage de croissance très significatif lorsqu'elles étaient injectées chez des souris immunocompétentes syngéniques ou semi-allogéniques. En revanche, aucune différence de comportement n'était observée quand ces cellules étaient injectées à des souris immunodéficientes SCID. Ces observations suggèrent que les lymphocytes T sont capables de rejeter les cellules tumorales n'exprimant pas FLIP chez les souris immunocompétentes et confirment le rôle de la surexpression de FLIP dans l'échappement tumoral.

La survivine, une protéine de la famille IAP (inhibitor of apoptosis protein) et inhibitrice des caspases-3, -7 et -9, est fortement exprimée durant la vie fœtale et n'est pratiquement pas détectable dans les cellules normales chez l'adulte (Deveraux and Reed 1999). Ambrosini et al ont décrit dans de nombreuses tumeurs une surexpression de la survivine qui pourrait aider les tumeurs à résister à l'apoptose (Ambrosini, Adida et al. 1997).

Les membres de la famille Bcl-2 jouent un rôle important dans la régulation des voies de signalisation de la mort cellulaire (Adams and Cory 1998) (Reed 1998). Cette famille comprend des protéines anti-apoptotiques (comme Bcl-2, Bcl-X_L) et des protéines pro-apoptotiques (comme Bax, Bak, Bad, Bid, Bim) La surexpression des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 dans certaines tumeurs (Rochaix, Krajewski et al. 1999) (Borner, Brousset et al. 1999) ou l'inactivation du gène des protéines pro-apoptotiques comme celui de Bax (Yin, Knudson et al. 1997) contribuent à bloquer l'action du système immunitaire.

2-2.2 Inhibition indirecte

Si l'inhibition directe de l'apoptose induite par les lymphocytes T se traduit par l'échappement des cellules tumorales elles-mêmes vis-à-vis des lymphocytes T, l'inhibition indirecte constitue une autre stratégie induisant la mort des cellules effectrices du système immunitaire.

En 1996, Hahne et al. ont découvert une expression tumorale de la molécule FasL chez des patients atteints de mélanome, cette expression se traduit par une apoptose massive de TIL péri-tumoraux chez la souris. Ces données ont été confirmées par des expériences d'inhibition d'apoptose des TIL en présence d'anticorps anti-FasL *in vitro*, et par l'absence de développement des cellules tumorales FasL⁺ injectées chez les souris *lpr* (modèle murin de déficit en protéine Fas, lymphocytes T Fas négatifs) *in vivo* (Hahne, Rimoldi et al. 1996). Dans la même année, l'étude anatomopathologique d'une équipe allemande a montré une expression du FasL en périphérie de la tumeur et dans les zones de contact avec les TIL dont la majorité est apoptotique dans les tumeurs pulmonaires et hépatiques (Strand, Hofmann et al. 1996). L'expression tumorale de FasL peut être aussi révélée dans d'autres tumeurs comme le cancer du côlon (O'Connell, O'Sullivan et al. 1996) et les gliomes (Saas, Walker et al. 1997; Walker, Saas et al. 1997). L'ensemble de ces données démontre que l'expression tumorale de FasL participe au processus d'échappement tumoral à la reconnaissance immunitaire. Cependant, le processus de la mort des lymphocytes T reste contesté.

L'hypothèse de **contre-attaque** ('**counterattack**') est soutenue et largement documentée par l'équipe irlandaise d'O'Connell. (O'Connell, Bennett et al. 1999) (O'Connell, Houston et al. 2001), elle explique que l'expression de FasL par les cellules tumorales constitue un moyen de contre-attaque utilisé par ces dernières pour induire l'apoptose des lymphocytes T. (**Figure 7a**) Cependant, l'autre modèle alternatif défendu par l'équipe de Restifo à l'Institut National des Cancers aux USA, soutient que le FasL est exprimé par les cellules T activées qui reconnaissent la tumeur, ce qui déclenche leur auto-apoptose ou apoptose mutuelle (Chappell, Zaks et al. 1999) (Restifo 2000) (Restifo 2001). (**Figure 7b**)

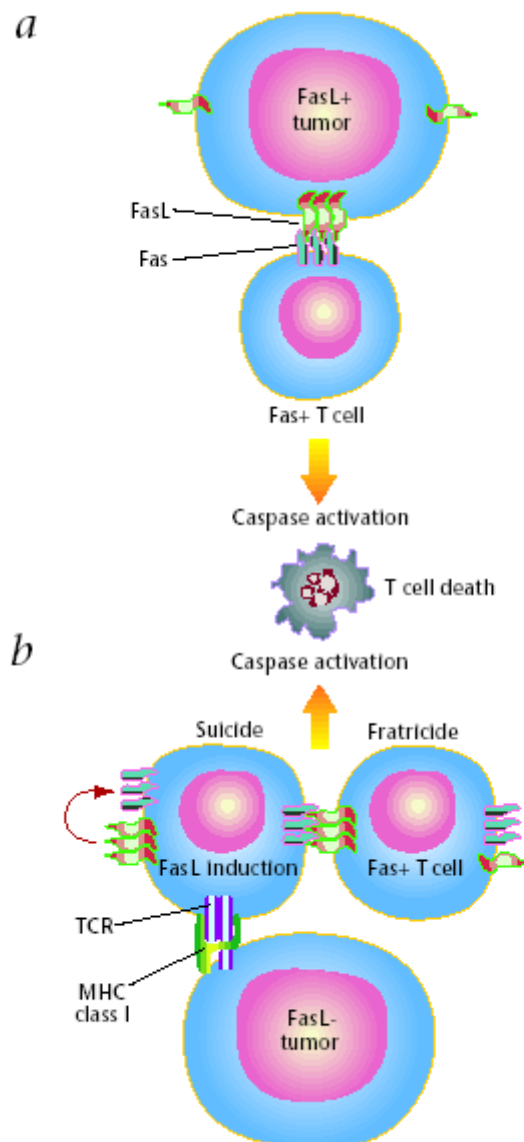


Figure 7 L'apoptose des lymphocytes T induite par le FasL. D'après (Restifo 2000)

Une autre molécule transmembranaire analogue à FasL, le RCAS1 (receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells), pourrait également être impliquée dans l'inhibition de la réponse cytotoxique (Nakashima, Sonoda et al. 1999). L'expression de RCAS1 a pu être mise en évidence dans les cancers de l'ovaire et de l'utérus (Nakashima, Sonoda et al. 1999) ainsi que dans les tumeurs hépatiques, pulmonaires et pancréatiques (Iwasaki, Nakashima et al. 2000) (Noguchi, Enjoji et al. 2001) (Akashi, Oimomi et al. 2003).

Enfin, B7-H1, un membre de la famille des co-stimulateurs B7, est exprimé préférentiellement dans les tissus tumoraux (Strome, Dong et al. 2003) (Dong and Chen 2003) (Wintterle, Schreiner et al. 2003). Dong et al ont montré que B7-H1 peut accroître l'apoptose des cellules T *in vitro* et que la tumeur P815 transfectée avec B7-H1 n'est plus rejetée *in vivo* dans le modèle murin (Dong, Strome et al. 2002).

2-3 Sécrétion de molécules immunosuppressives

Les cellules tumorales sont capables de sécréter de molécules immunosuppressives qui contribuent à l'évasion du système immunitaire anti-tumoral.

Parmi ces molécules, le facteur de croissance transformant- β (TGF- β , transforming growth factor- β) est la cytokine la plus caractérisée, qui a été identifiée en premier dans le surnageant de culture de cellules de gliomes (Pasche 2001). Gorelik L et al ont schématisé les principaux effets de TGF- β dans l'inhibition de réponse anti-tumorale (Gorelik and Flavell 2002):

(Figure 8)

- a)** Le TGF- β inhibe la maturation et la présentation d'antigène des CPA et cette inhibition diminue leurs fonctions stimulantes vis-à-vis des lymphocytes T.
- b)** La source de TGF- β n'est pas toujours claire. Le TGF- β peut être produit par de nombreuses cellules au site de la tumeur (par exemple les APCs) et **c)** par les cellules tumorales.
- d)** Le micro-environnement tumoral peut favoriser la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes à fonction régulatrice (Treg) qui sont caractérisés par la sécrétion des cytokines immunosuppressives comme TGF- β .

e) Le TGF- β permet l'inhibition de la différenciation des CTLs.

Le TGF- β affecte aussi la prolifération et l'activation des TIL, inhibe la sécrétion des cytokines anti-tumorales et supprime l'effet de l'IL12 sur la prolifération des lymphocytes T (Blobe, Schiemann et al. 2000).

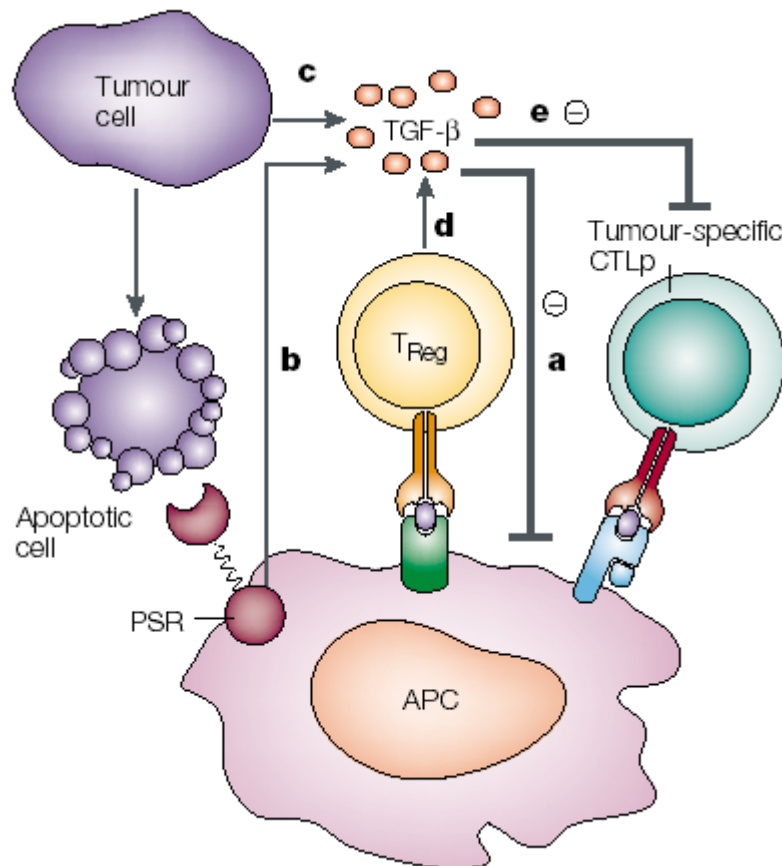


Figure 8 L'Inhibition de la réponse anti-tumorale par TGF- β . D'après (Gorelik and Flavell 2002)

Parmi les autres cytokines immunosuppressives, l'IL-10 a été aussi bien étudiée : elle permet la diminution de la présentation d'antigène par les CPA, l'inhibition de la réponse des lymphocytes T de type Th1, l'extinction de l'activité cytotoxique des CTLs et la résistance des cellules tumorales à la lyse par les CTLs (Chouaib, Asselin-Paturel et al. 1997) (Sharma, Stolina et al. 1999). La molécule « vascular endothelial growth factor » (VEGF) est sécrétée

par beaucoup de tumeurs (Toi, Taniguchi et al. 1996), elle est non seulement importante pour la vascularisation tumorale, mais possède également un rôle immunosuppresseur : elle inhibe la reconnaissance immunitaire et empêche aussi la maturation des CPAs en réprimant l'activité du facteur de transcription NF- κ B (Ohm and Carbone 2001) (Oyama, Ran et al. 1998).

Certaines tumeurs sont également capables de sécréter des molécules solubles pour neutraliser MICA et MICB (ligands de NKG2D) afin de provoquer une diminution de l'expression de NKG2D sur les cellules NK ou certains lymphocytes T CD8+. De cette façon, la cytotoxicité anti-tumorale associée à l'engagement du récepteur NKG2D est limitée (Groh, Wu et al. 2002).

2-4 Défaut d'activation lymphocytaire

Les mécanismes de stimulation faisant intervenir des cellules présentatrices d'antigènes peuvent être déficients. Les molécules de costimulation comme B7 à la surface des cellules dendritiques, nécessaires au second signal d'activation des lymphocytes T spécifiques, sont souvent absentes ou sous-exprimées dans les situation tumorales. L'absence de ce signal de costimulation entraîne une anergie du lymphocyte T (Chaux, Favre et al. 1997). De plus, les macrophages, une autre catégorie de CPA, pourraient inhiber l'activation des cellules T au site tumoral (Attwood and Munn 1999).

Il peut également exister des altérations des signaux de transduction des lymphocytes T. Des diminutions partielles ou complètes d'expression de plusieurs protéines (zeta, P56lck, fyn) impliquées dans la transduction du signal via le récepteur T ont été rapportées au niveau des TIL et des lymphocytes T CD8+ au cours du développement de cancers (Tartour, Latour et al. 1995) (Whiteside 1999).

En conclusion, les tumeurs ont acquis la capacité de se développer en utilisant de nombreux mécanismes visant à déréguler la machinerie cellulaire du système immunitaire et les processus impliqués forment un réseau complexe d'évènements faisant intervenir des multiples effecteurs cellulaires ou protéiques qui conduisent à la croissance maligne.

3. Immunothérapie

Le concept d'immunothérapie est une thérapie sélective, sa stratégie est d'activer le système immunitaire pour aboutir à l'éradication de la tumeur sans affecter les cellules normales. Elle se traduit par l'amplification sur le plan qualitatif et quantitatif, *in vitro* ou *in vivo*, des effecteurs de la réponse immunitaire. Les approches de cette thérapie peuvent être variées. On peut distinguer plusieurs types d'immunothérapie : immunothérapie passive, immunothérapie adoptive, immunothérapie active spécifique et immunothérapie active non spécifique.

3-1 Immunothérapie passive

L'immunothérapie passive consiste à injecter des anticorps monoclonaux spécifiques. La première injection a eu lieu en 1982 : Levy et al. ont administré l'anticorps monoclonal anti-idiotypique d'immunoglobuline à un patient autologue atteint de lymphome B. Il s'en est suivi une rémission complète (Miller, Maloney et al. 1982). Cette approche a montré une efficacité dans le cadre du traitement de lymphomes B (Kwak, Campbell et al. 1992) (Hsu, Caspar et al. 1997). Cette stratégie indique une spécificité individuelle anti-tumorale, parce que les molécules d'idiotypique d'immunoglobuline exprimées sur les cellules tumorales B sont différentes pour chaque patient. Cependant son inconvénient est sa lourdeur technologique et son coût. De plus, son efficacité est limitée, parce que l'apparition de clones tumoraux variants exprimant des immunoglobulines de surface mutées au niveau de leur région variable ou bien n'exprimant plus d'immunoglobuline, permettent au lymphome B d'échapper à cette immunothérapie ciblée. Aujourd'hui, cette stratégie n'est mise en œuvre que dans quelques centres (Press, Leonard et al. 2001).

Une autre démarche se focalisant, elle, sur **les cibles stables communes** à une ou plusieurs tumeurs s'est bien développée ces dernières années. Les exemples les plus connus et les plus utilisés sont **le CD20 et le Her-2/neu**.

3-1.1 CD20 et rituximab

Le CD20 est un marqueur spécifique des lymphocytes B, il est exprimé du stade pré-B jusqu'au stade de lymphocytes B mature et activé. En revanche, son expression est absente à

la surface des cellules souches hématopoïétiques, des cellules pro-B et elle est aussi perdue lors de la différenciation en plasmocytes. De plus, ce marqueur est exprimé par la plupart des lymphomes B non-hodgkiniens. Ceci en fait une cible idéale, puisque d'un côté, son expression est quasi-ubiquitaire dans les lymphomes de type B, de l'autre côté, la reconstitution du répertoire B n'est pas perturbée si on injecte l'anticorps anti-CD20.

Le rituximab, le premier anticorps monoclonal approuvé par la FDA (l'administration américaine de la sécurité alimentaire et pharmaceutique) en 1997 dans le cadre du traitement des maladies cancéreuses, est un anticorps monoclonal chimérique spécifique pour le CD20 humain. Cet anticorps a été produit par fusion des gènes codant les régions variables d'un anticorps murin anti-CD20 avec des fragments constants d'une chaîne lourde humaine et associé à une chaîne légère kappa (Johnson and Glennie 2001). Deux études pilotes ont confirmé l'efficacité du rituximab en monothérapie chez des patients atteints de lymphomes folliculaires non prétraités (Hainsworth, Burris et al. 2000) (Colombat, Salles et al. 2001). Par la suite, l'association de rituximab à une chimiothérapie conventionnelle a été testée : l'équipe GELA (Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte en France) a mené en 2002 une étude prospective randomisée entre CHOP (une chimiothérapie composée de vincristine, cyclophosphamide, adriamycine et prednisone), et CHOP + Rituximab chez des patients âgés de 60 à 80 ans présentant un lymphome B diffus à grandes cellules, dans une cohorte de 479 patients totaux. Une rémission complète est obtenue chez 76 % des patients traités par CHOP + rituximab contre 63 % dans le groupe CHOP. La différence est statistiquement significative. Une meilleure survie est aussi constatée dans le groupe CHOP + rituximab. Ce travail a réussi à imposer le traitement par CHOP + rituximab comme un traitement standard des patients de plus de 60 ans présentant un LMNH diffus à grandes cellules prouvé histologiquement (Coiffier, Lepage et al. 2002). Récemment, une équipe anglaise a rapporté une étude de phase III comparant CVP (cyclophosphamide, vincristine et prednisone) à l'association CVP-rituximab chez des patients atteints de lymphomes folliculaires au stade III-IV et sans antécédent thérapeutique. Les pourcentages de réponses globales et de rémission complète dans les groupes CVP-R et CVP étaient respectivement de 81 % et 41 % et de 57 % et 10 %. La différence était nettement significative (Marcus, Imrie et al. 2005). Le rituximab est aussi appliqué dans les autres types de lymphomes B (Dimopoulos, Zervas et al. 2002) (Byrd, Rai et al. 2005) (Conconi, Martinelli et al. 2003). Actuellement, ce produit est incontournable dans le traitement de différents types des lymphomes B.

Les mécanismes d'action du rituximab ont été étudiés. Schématiquement, il existe au moins trois mécanismes permettant de détruire les cellules B tumorales (Johnson and Glennie 2003) (Bannerji, Kitada et al. 2003) : l'apoptose, la cytotoxicité complément-dépendante (CDC, complement dependant cytolysis) et la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC, antibody-dependant cellular cytolysis).

-----L'apoptose

L'apoptose induite par le rituximab est liée essentiellement à la voie mitochondriale, la libération du cytochrome C aboutit à l'activation de la caspase 3 (Shan, Ledbetter et al. 1998) (Alas, Ng et al. 2002) (Byrd, Kitada et al. 2002). Dans un modèle de lymphome de Burkitt associé au VIH, Alas et al. ont démontré que le rituximab est aussi responsable de l'inhibition de la synthèse autocrine/paracrine d'IL-10 par les cellules tumorales, ce qui aboutit à la réduction de l'expression de Bcl-2 (Alas, Emmanouilides et al. 2001) (Alas and Bonavida 2001). La diminution de l'expression des autres molécules anti-apoptiques comme XIAP (Liston, Roy et al. 1996) et Mcl-1 (Zhou, Qian et al. 1997) liée au rituximab a été également rapportée (Byrd, Kitada et al. 2002) (Bannerji, Kitada et al. 2003). De plus, Mcl-1 est un facteur de résistance à la chimiothérapie (Kitada, Andersen et al. 1998).

-----La cytotoxicité dépendante du complément (CDC)

La CDC permet d'expliquer la lyse cellulaire par une activation du complément via la portion Fc de rituximab (Cartron, Watier et al. 2004). (**Figure 9**)

Ce mécanisme a été bien démontré dans les lignées tumorales de lymphome B (Reff, Carner et al. 1994) ainsi que dans cellules B tumorales fraîches (Golay, Zaffaroni et al. 2000) (Weng and Levy 2001) (Bellosillo, Villamor et al. 2001). Cette lyse est partiellement corrélée avec le niveau d'expression de CD20 sur les cellules tumorales (Golay, Lazzari et al. 2001) (Manches, Lui et al. 2003). La sensibilité à la CDC induite par le rituximab peut varier dans les différents sous-types de lymphome (Bellosillo, Villamor et al. 2001) (Manches, Lui et al. 2003). Cette sensibilité est également liée à sa capacité à induire le recrutement du CD20 dans les radeaux lipidiques « lipid raft » (Cragg, Morgan et al. 2003). De plus l'activation du complément pourrait provoquer certains effets secondaires surtout chez des patients atteints

de la LLC (leucémie lymphocytaire chronique) avec des leucocytes supérieurs à $50 \times 10^9/L$ (Winkler, Jensen et al. 1999) (Lim, Koh et al. 1999).

L'efficacité de la CDC pourrait être diminuée par les protéines inhibitrices du complément comme CD35 (CR1, complement receptor type 1), CD46 (MCP, membrane cofactor protein), CD55 (DAF, decay accelerating factor) et CD59 (MIRL, membrane inhibitor of reactive lysis) (Golay, Zaffaroni et al. 2000) (Cragg, Morgan et al. 2003). Cependant, la corrélation entre l'expression de ces protéines inhibitrices et l'efficacité clinique reste contestée (Golay, Lazzari et al. 2001) (Weng and Levy 2001) (Manches, Lui et al. 2003). La CDC semble s'impliquer non seulement dans la disparition immédiate des cellules tumorales, mais aussi dans leur élimination tardive (au moins 2 semaines). Cela s'explique par l'activation initiale du complément permettant le recrutement plus tardif d'effecteurs cellulaires (Di Gaetano, Cittera et al. 2003).

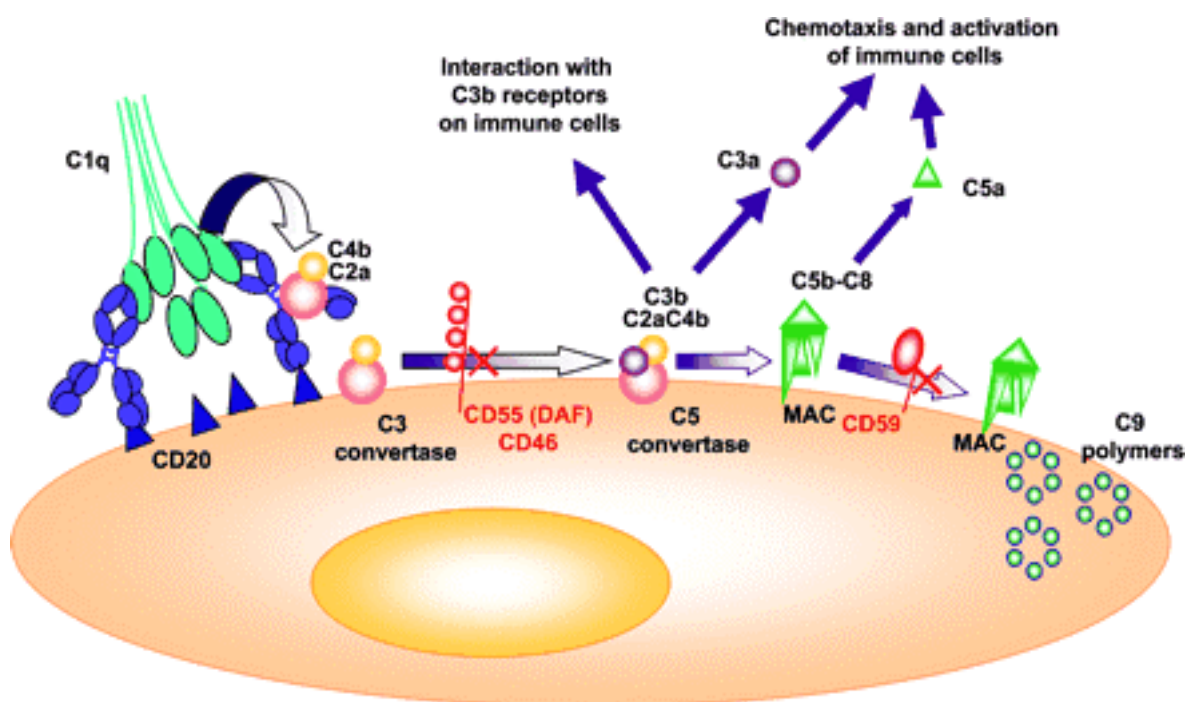


Figure 9 La CDC induite par le rituximab. MAC : membrane attack complex. D'après (Cartron, Watier et al. 2004)

----- La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)

Le rituximab active l'ADCC en reliant sa portion de Fc aux récepteurs des cellules cytotoxiques pour que ces dernières puissent induire l'attaque cytotoxique (Reff, Carner et al. 1994) (Flieger, Renoth et al. 2000) (Clynes, Towers et al. 2000). Il existe 3 sortes de récepteurs des portions Fc avec différentes affinités: CD16 (Fc γ -RIII), CD32 (Fc γ -RII) et CD64 (Fc γ -RI). Cette cytotoxicité est régulée par la nature et l'affinité de ces Fc γ -R dont le polymorphisme joue un rôle important. Le polymorphisme du récepteur Fc γ RIIIA (CD16), surtout exprimé au niveau des cellules NK, a été démontré comme influençant la réponse au Rituximab dans les lymphomes folliculaires (Cartron, Dacheux et al. 2002). Treon et al. ont démontré un phénomène identique dans la maladie de Waldenström (Treon, Hansen et al. 2005). En revanche, ce phénomène n'a pas été constaté dans la LLC (Farag, Flinn et al. 2004). L'ADCC peut également être régulée par la stimulation ou l'expansion des cellules NK et des macrophages induites par les cytokines. Parmi lesquelles, l'IL-2, l'IL-12, IFN- α , G-CSF et GM-CSF sont les plus connues (Phillips and Lanier 1986) (Wing, Magee et al. 1989) (Flieger, Spengler et al. 1999) (Trinchieri 2003).

De façon plus générale, tous ces mécanismes provoqués par le rituximab sont responsables de l'élimination des cellules B tumorales. Chaque mécanisme participe de façon additive ou synergique et peut-être séquentielle dans des contextes variés comme différents types de lymphomes ou différentes localisations (Johnson and Glennie 2003) (Cartron, Watier et al. 2004).

3-1.2 Her-2 et trastuzumab

Le Her-2/neu ou c-Erb-2 est un récepteur à activité tyrosine kinase. Il est surexprimé dans de nombreux adénocarcinomes qui aboutissent à la prolifération anarchique des cellules par rapport à leur équivalent normal, surtout dans les cancers mammaires et ovariens où sa présence est un élément pronostique défavorable (Bacus, Zelnick et al. 1994) (Slichenmyer and Fry 2001).

Le trastuzumab est un anticorps monoclonal recombinant de type IgG1 humanisé dirigé contre le récepteur transmembranaire Her-2. Les modèles pré-cliniques ont démontré que cet anticorps possède des propriétés cytostatiques et des activités cytotoxiques. Le trastuzumab possède également, en association avec certains agents cytotoxiques, une action synergique ou additive (Baselga, Norton et al. 1998) (Sliwkowski, Lofgren et al. 1999). Après avoir testé son efficacité en monothérapie chez les patientes atteints de cancer du sein métastatique (Baselga, Tripathy et al. 1996) (Cobleigh, Vogel et al. 1999), Salmon et al. ont mené une étude de phase III internationale, multicentrique, prospective, conduite chez 469 patientes présentant un cancer du sein métastatique, en première ou deuxième ligne du traitement, et surexprimant l'oncogène c-Erb-2. Les résultats sont statistiquement significatifs en faveur de l'association de la chimiothérapie au trastuzumab dans les différents paramètres, quel que soit le régime de chimiothérapie. Cependant, une augmentation de toxicité cardiaque a été aussi observée (Slamon, Leyland-Jones et al. 2001).

3-1.3 Autres

En dehors du rituximab et du trastuzumab, plusieurs autres anticorps sont à l'étude ou déjà commercialisés. Par exemple, l'anticorps anti-CD22 (epratuzumab) dans les LMNH indolents en rechute (Leonard, Coleman et al. 2003). L'anticorps anti-CD52 (Alezumab) dans la LLC réfractaire (Keating, Flinn et al. 2002) ou dans la leucémie prolymphocytaire T (Dearden, Matutes et al. 2001). L'anticorps humanisé anti-CD33 couplé à l'ozogamicine (Gemtuzumab ozogamicin) dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) en rechute ou réfractaires (Sievers, Larson et al. 2001) (Zwaan, Reinhardt et al. 2003), le Gemtuzumab cible spécifiquement l'antigène CD33, présent à la surface des blastes leucémiques dans 80 à 90 % des cas de LAM (Creutzig, Harbott et al. 1995). Après fixation au récepteur, le complexe moléculaire est rapidement internalisé. L'ozogamicine, un antibiotique de la famille des calichéamycines, est ensuite libérée à l'intérieur de la cellule où elle exerce ses effets cytotoxiques au niveau de l'ADN (Hinman, Hamann et al. 1993).

À partir de l'administration des anticorps spécifiques comme immunothérapie passive, le concept de radio-immunothérapie a été instauré comme « stratégie avancée » : des isotopes radioactifs émetteurs β (l'yttrium-90 ou l'iode-131) ont été combinés aux anticorps

monoclonaux. La stratégie thérapeutique est d'ajouter une radioactivité locale et ciblée en utilisant comme agent de vectorisation un anticorps monoclonal reconnaissant des antigènes tumoraux. Par exemple, une étude multicentrique randomisée comparant l'anticorps monoclonal anti-CD20 non marqué (rituximab) et celui marqué à l'yttrium-90 (Zevalin) a été menée aux USA parmi 143 LMNH de type B réfractaires de bas grade, folliculaires ou LMNH en transformation possédant les cellules B tumorales CD20+. Elle a montré une différence significative en terme de réponse : 80% de réponse globale avec 30% de réponse complète pour le groupe Zevalin (73 patients) contre 56% de réponse globale avec 16% de réponse complète pour le groupe rituximab (70 patients) (Witzig, Gordon et al. 2002).

3-2 Immunothérapie adoptive

L'immunothérapie adoptive consiste à manipuler des cellules effectrices du système immunitaire en dehors de l'organisme puis à les injecter au patient, telles que des cellules souches hématopoïétiques allogéniques, des lymphocytes allogéniques et des lymphocytes autologues.

3-2.1 Les cellules souches hématopoïétiques et les lymphocytes T allogéniques

Le concept de la transplantation **des cellules souches hématopoïétiques allogéniques** a été proposé par Branes en 1956 dans le modèle murin (Barnes, Corp et al. 1956). Cette approche thérapeutique, qui a été pratiquée dans les années suivantes, permet la guérison des hémopathies malignes incurables par la chimiothérapie conventionnelle. Son efficacité est liée à la fois au conditionnement myéloablatif et à la réaction du greffon contre la tumeur (GVT, graft-versus-tumour). Cependant, les toxicités sont majeures incluant la réaction du greffon contre l'hôte (GVH, graft-versus-host), la susceptibilité des patients aux infections opportunistes.

Depuis ces dernières années, une démarche de conditionnements essentiellement immunosuppresseurs et non myéloablatifs (dits d'intensité réduite) se développe. L'objectif est de favoriser l'émergence de l'effet GVT en réduisant les toxicités thérapeutiques.

Plusieurs études pilotes ont démontré la faisabilité, la tolérance et l'efficacité de ce type de conditionnement (Khouri, Saliba et al. 2001) (McSweeney, Niederwieser et al. 2001) (Branson, Chopra et al. 2002). En 2005, Alyea et al. ont rétrospectivement comparé les résultats d'une allogreffe avec conditionnement atténué effectuée chez 71 patients à une allogreffe conventionnelle réalisée chez 81 patients. La population des hémopathies était hétérogène. Bien que le conditionnement atténué donne des résultats au moins équivalents à ceux du conditionnement classique, les patients ayant un conditionnement atténué étaient plus souvent greffés avec un donneur non apparenté, avec une maladie plus souvent active et un antécédent plus lourd (Alyea, Kim et al. 2005).

Depuis 20 ans, nous savons que **les lymphocytes T allogéniques** sont responsables des effets GVH et GVT, parce que la déplétion en lymphocytes T du greffon augmente le taux de rechutes en réduisant aussi le risque de GVH (Maraninchi, Gluckman et al. 1987) (Goldman, Gale et al. 1988) et que le blocage fonctionnel des lymphocytes T par des anticorps monoclonaux anti-récepteurs de l'IL-2 conduit à la même observation (Blaise, Olive et al. 1995). Donc, lors de rechutes après la transplantation des cellules souches hématopoïétiques allogéniques, l'injection de lymphocytes du donneur (DLI, donor lymphocyte infusions) peut aboutir à la régression tumorale complète durable (Kolb, Simoes et al. 2004), plus particulièrement dans la leucémie myéloïde chronique (Kolb, Mittermuller et al. 1990) et les leucémies aiguës myéloïdes pédiatriques (Bader, Kreyenberg et al. 2004). Actuellement, La DLI est considérée comme une arme de plus en immunothérapie adoptive dans le but de permettre l'obtention d'une chimère hématopoïétique totale et l'éradication de la maladie complète. Cependant, personne n'est encore capable de bien distinguer des cellules responsables de GVH ou GVT, bien qu'il existe un modèle *in vitro* visant à séparer des effecteurs T CD4+ alloréactifs de type GVH et ceux de type GVT (Michalek, Collins et al. 2003).

L'utilisation de conditionnement atténué et l'administration de la DLI donnent aussi une stratégie thérapeutique intéressante dans le cadre du traitement de certaines tumeurs solides. Childs R et al. ont montré que les taux de réponse chez les patients atteints de cancers du rein métastatique sont plus importants que les taux conventionnels. (Childs, Clave et al. 1999) (Childs, Chernoff et al. 2000) Des résultats similaires ont été rapportés dans les cancers du sein (Ueno, Rondon et al. 1998) (Ueno, Shpall et al. 2004).

Aujourd'hui, l'allogreffe est une thérapie bien validée (Appelbaum 2001), cependant sa toxicité est toujours importante même après le conditionnement atténué. Parallèlement, éduquer des lymphocytes autologues vis-à-vis des cellules tumorales a constitué l'objectif de nombreuses recherches et les résultats encourageants obtenus en font une autre démarche intéressante.

3-2. 2 Les lymphocytes autologues

Dans les années 80, l'équipe de Steven Rosenberg a montré des résultats encourageants en utilisant **des cellules LAK** (Lymphokine Activated Killer) autologues, venant essentiellement de lymphocytes T activés isolés de sang périphérique du patient et cultivés en présence de fortes doses de l'IL-2 avant d'être réinjectés au patient, dans le traitement de mélanomes et de cancers du rein (Rosenberg, Lotze et al. 1987). Cependant, les cellules prélevées n'ont la plupart du temps pas été testées pour leur fonctionnalité, et l'activité anti-tumorale in vitro des cellules LAK injectées n'a généralement pas été vérifiée (Rosenberg 1992). Ces premiers essais qui s'avéraient prometteurs ont ensuite été poursuivis par de nombreuses équipes avec cependant des résultats décevants. Au final, le protocole de culture des cellules LAK ne semble pas adapté pour aboutir à la multiplication sélective des cellules spécifiques anti-tumorales. Aujourd'hui, cette approche est pratiquement abandonnée.

Une approche de l'utilisation des cellules T spécifiques ayant une activité anti-tumorale a donc émergée. Les études ont été ensuite dirigées vers **les TIL** qui ont montré une activité anti-tumorale 50 à 100 fois supérieure à celle des cellules LAK dans le modèle murin de l'adénocarcinome du côlon (Rosenberg, Spiess et al. 1986). Les protocoles de l'amplification des TIL en culture sont similaires à celles de cellules LAK, c'est-à-dire avec une utilisation de fortes doses d'IL-2. Cependant, l'efficacité de ce traitement chez l'homme en clinique mené par de nombreux centres est peu probante (Whiteside, Jost et al. 1992) (Cole, Taubenberger et al. 1994) (Ravaud, Legrand et al. 1995). En 1994, l'efficacité du traitement des mélanomes par les TIL activés in vitro chez 86 patients est rapportée comme étant fortement corrélée ($p < 0,001$) à la génération, au cours de l'activation des TIL, d'une cytotoxicité dirigée contre les cellules tumorales (Rosenberg, Yannelli et al. 1994). Ce résultat a apporté un argument solide à l'idée de générer des cellules cytotoxiques qui soient réellement spécifiques contre les

cellules malignes. Cependant, il y a dix ans, il était impossible de quantifier le nombre exact des TIL spécifiques de tumeurs qui étaient injectés.

Depuis ces dernières années, des méthodes de quantification des lymphocytes T spécifiques d'antigènes ou d'épitopes ont été mises au point, comme le marquage de lymphocytes spécifiques par des complexes CMH-peptides solubles (tétramères). Grâce à ces progrès, en 2002 c'est toujours le groupe de Steven Rosenberg qui a rapporté des résultats impressionnants comme la réponse complète ou partielle chez 6 patients sur 13 atteints de mélanome métastatique. Ils ont démontré la survie prolongée des TIL injectés (plus de 4 mois), et leur multiplication dans le sang des patients et leur migration dans la tumeur (Dudley, Wunderlich et al. 2002). De plus, pour essayer de contourner les mécanismes de suppression induits par les tumeurs (Anichini 1989) et (Chapitre 2-3, (Gorelik and Flavell 2002)), cette équipe a induit une déplétion lymphocytaire sévère des patients avec la cyclophosphamide et la fludarabine avant d'injecter des TIL préparés *in vitro*. Cependant, le risque de complication infectieuse ou cancéreuse lié à l'immunodépression reste un problème sérieux.

Dans la même année, l'équipe de Greenberg a publié une étude de thérapie adoptive de phase I, menée chez 10 patients atteints de mélanome métastatique (Yee, Thompson et al. 2002). Les lymphocytes T injectés ne sont pas de TIL mais des clones T CD8+ dérivés de PBL (lymphocytes du sang périphérique) des patients, sélectionnés pour leur spécificité pour les antigènes mélanocytaires MART-1 ou gp100, et sans conditionnement immunosupresseur préalable. Sur le plan clinique, les réponses observées dans cette étude consistent essentiellement en une stabilisation de la maladie jusqu'à 21 mois. Les auteurs mentionnent de plus la disparition de l'antigène cible dans la tumeur de trois patients sur cinq étudiés, suggérant que les clones injectés ont eu un effet cytotoxique directs sur les cellules tumorales exprimant l'antigène.

Durant cette thérapie adoptive, le rôle des lymphocytes T CD4+ a été reconsidéré : le groupe de Rosenberg a montré dans leur précédent essai une inefficacité thérapeutique de l'injection de clones T CD8+ spécifiques de l'antigène gp100 dérivés de TIL (Dudley, Wunderlich et al. 2002), et il suggère (Dudley, Wunderlich et al. 2002) que les cellules T CD4+ présentes parmi les TIL injectés contribuent à la survie (plus de 4 mois) des TIL CD8+ et donc à leur fonction. Cependant, le modèle de Greenberg infirme partiellement cette hypothèse, parce que leur

système ne possède pas de cellules T CD4+ et que la survie des clones T CD8+ injecté dérivés de PBL est d'environ 1 mois (Yee, Thompson et al. 2002).

En conclusion, cette démarche thérapeutique, qui utilise le transfert de lymphocytes T autologues spécifiques d'antigènes de tumeur, permet la migration de ces lymphocytes dans les tumeurs et l'induction de réponses cliniques. Il reste à mettre au point des protocoles plus sûrs et plus efficaces, qui pourraient aussi s'appliquer dans les autres pathologies cancéreuses différentes des mélanomes.

3-3 Immunothérapie active non spécifique

L'immunothérapie active non spécifique repose sur l'administration des activateurs de système immunitaire de manière systématique, comme des agents bactériens inactivés et des cytokines.

Un siècle après le concept initial de Paul Ehrlich et William Coley en 1890 (Waldmann 2003), HW Herr a utilisé le bacille de Calmette et Guérin (BCG) pour infecter des patients atteints de cancer de la vessie (Herr, Laudone et al. 1988). Bien que le mécanisme précis de l'action de ce bacille ne soit pas connu, il serait probablement en rapport avec l'inflammation vésicale qu'il provoque et qui fait rejeter les cellules anormales cancéreuses de la paroi vésicale (Alexandroff, Jackson et al. 1999). Aujourd'hui, le traitement standard des tumeurs superficielles de la vessie est toujours la résection endoscopique suivie de l'administration de BCG (Lamm, Blumenstein et al. 2000).

Les cytokines sont de petites molécules protéiques solubles (environ 25 Kda) qui sont libérées par diverses cellules de l'organisme habituellement en réponse à un signal d'activation et qui induisent des réponses par liaisons à des récepteurs spécifiques (Janeway 2001). Elles peuvent être utilisées en immunothérapie pour leur action directe sur les cellules malignes ou dans le but de stimuler la réponse immunitaire déficiente du patient ou d'augmenter la présentation des antigènes spécifiques de la tumeur de manière directe ou indirecte (Dranoff 2004). L'IL-2 et l'interféron- α sont les deux principales cytokines utilisées dans cette approche. L'IFN- α est utilisé en oncologie notamment dans les cancers du rein métastatique (Fossa, Kramar et al.

1994), les mélanomes malins (Kirkwood, Resnick et al. 1997) et les sarcomes de kaposi asymptomatiques évolutifs (Kirkwood 2002). L'IL-2 est administrée à des patients atteints de mélanomes (Dutcher 2002) et cancers du rein métastatique (Taneja, Pierce et al. 1995). Dans le cadre du traitement de cancers du rein métastatique, l'association de l'IL-2 et de l'IFN α a montré ces avantages par rapport aux cytokines seules en terme de taux de réponse et en terme de survie sans progression (Negrier, Escudier et al. 1998), ce qui suggère un effet synergique en utilisant ces cytokines. L'IL-12 peut être considérée comme stimulant des cellules NK et facteur de maturation des lymphocytes cytotoxiques. Son activité anti-tumorale et anti-métastatique a été bien démontrée par de nombreuses études dans le système murin (Trinchieri and Scott 1999). Après une dizaine d'essais cliniques de l'IL-12 en phase I dans différents centres (au moins 9 concernant les tumeurs solides et 3 avec les hémopathies) avec des réponses variables mais encourageantes, Younes et al. ont publié en 2004 une étude d'IL-12 en phase II chez 32 patients en rechute atteints de lymphomes non hodgkiniens et 10 porteurs d'un lymphome hodgkinien : une réponse était obtenue chez 6 des 29 patients évaluables avec lymphome non hodgkien, incluant 2 réponses complètes et 4 réponses partielles (taux de réponses de 21%); en revanche, pas d'effet sur les patients atteints de lymphomes hodgkiens (Younes, Pro et al. 2004).

Il est actuellement certain que la stimulation globale du système immunitaire montre une efficacité dans certaines tumeurs. Cependant, il semblerait plus élégant de stimuler uniquement les lymphocytes impliqués dans la reconnaissance des cellules tumorales, ce qui permettrait d'augmenter l'efficacité et de diminuer la toxicité engendrée principalement par la stimulation de cellules non impliquées dans la reconnaissance tumorale.

3-4 Immunothérapie active spécifique

3-4.1 La vaccination par antigènes tumoraux

Dans de nombreux cancers, les cellules tumorales portent à leur surface des antigènes reconnus par des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et nous pouvons distinguer six catégories différentes d'antigène tumoraux (**Figure 10**) (Janeway 2001). Donc, la vaccination

par de ces antigènes, dans un contexte HLA donné, peut susciter une réponse lymphocytaire T cytotoxique dirigée contre les cellules exprimant l'antigène, notamment les cellules tumorales (Boon, Coulie et al. 1997)

Les antigènes potentiels de rejet tumoral ont des origines diverses			
Classe d'antigène	Antigène (exemple)	Nature de l'antigène	Type de tumeur
Oncogène muté	Kinase 4 dépendante	Régulateur	Mélanome
spécifique des tumeurs	des cyclines	du cycle cellulaire	
ou suppresseur de tumeur	β -caténine	Relai dans la transduction du signal	Mélanome
	Caspase-8	Régulateur de l'apoptose	Epithélioma épidermoïde
Cellule germinale	MAGE-1	Protéines normales	Mélanome
	MAGE-3	des testicules	
Différentiation	Tyrosinase	Enzyme de la voie de synthèse de la mélanine	Mélanome
	Ig de surface	Anticorps spécifique après réarrangement génique dans les clones de cellule B	Lymphome
Expression anormale d'un gène	HER-2/neu	Récepteur tyrosine kinase	Sein Ovaire
Modification post-traductionnelle anormale	MUC-1	Mucine peu glycosylée	Sein Pancréas
Protéine oncovirale	HPV de type 16	Produits des gènes de la transformation virale	Carcinome cervical
	protéines E6 et E7		

Figure 10. Différentes catégories d'antigènes tumoraux. D'après (Janeway 2001).

La vaccination par antigènes tumoraux peut être réalisée sous plusieurs formes. Les cellules tumorales (autologues ou allogéniques) irradiées ou leurs lysats en combinaison ou non avec des adjuvants ont été utilisées depuis une dizaine d'années, bien que l'efficacité en clinique soit douteuse dans le mélanome malin (Wallack, Scoggin et al. 1992) (Sondak, Liu et al. 2002) (Dillman, Beutel et al. 2002) ou quasiment absente dans le cancer de la prostate (Simons, Mikhak et al. 1999).

L'autre approche consiste à utiliser des peptides antitumoraux avec des stratégies variées comme des peptides améliorés (analogues hétéroclitiques) (Tangri, Ishioka et al. 2001) et des peptides capables d'induire des cellules T CD8+ et CD4+ simultanément (Marchand, van Baren et al. 1999) (Zeng, Li et al. 2002). De plus l'ajout d'un adjuvant, dont l'adjuvant incomplet de Freund a été très utilisé dans le but d'augmenter l'immunogénicité (Rosenberg,

Yang et al. 1998) (Weber, Hua et al. 1999). La troisième approche consiste à administrer les cellules tumorales modifiées génétiquement *in vitro* : un gène codant pour des cytokines telles que GM-CSF ou IL-2 (Fearon, Pardoll et al. 1990), ou pour les molécules de costimulation comme B7 (Townsend and Allison 1993) est induit. Cependant, les résultats chez les patients sont actuellement plutôt modestes (Parmiani, Castelli et al. 2002).

Aujourd'hui, on s'oriente vers l'utilisation préférentielle d'un nombre plus important, voire de l'ensemble des antigènes tumoraux, parce qu'il existe une corrélation entre la réponse clinique et le nombre d'antigènes auxquels le patient oppose une réponse immune (Banchereau, Palucka et al. 2001). Cette stratégie permet de présenter des épitopes par les molécules HLA de classe I, ainsi que par les molécules HLA de classe II, ce qui permet la stimulation des lymphocytes T CD4+, cellules indispensables à l'instauration et au maintien de la réponse immunitaire (Chapitre 1-2.5). De plus, la recherche d'adjuvants idéaux qui arrivent à potentialiser la réponse immunitaire est toujours un des objectifs majeurs.

3-4. 2 La vaccination par cellules dendritiques

L'intérêt des cellules présentatrices d'antigène dans cette stratégie est soulevé. Parmi ces CPA, les cellules dendritiques sont les plus stimulantes. Elles pourraient représenter l'adjuvant naturel idéal, parce qu'elles sont capables d'activer des lymphocytes T naïfs et qu'elles jouent un rôle central dans l'induction d'une réponse immunitaire primaire (Moser, Sornasse et al. 1995). Elles peuvent aussi être chargées avec des extraits de cellules tumorales, des corps apoptotiques, des peptides tumoraux, des exosomes, ou même être fusionnées avec des cellules tumorales (Fong and Engleman 2000).

Dans le modèle murin, les comparaisons entre les diverses techniques semblent donner un avantage aux cellules dendritiques : la vaccination par cellules dendritiques plus antigènes est plus efficace que les témoins antigènes plus adjuvant conventionnel (Porgador and Gilboa 1995), les cellules dendritiques transfectées à l'aide d'un vecteur viral portant le gène immunisant sont plus efficaces que le vecteur injecté seul (Wan, Emtage et al. 1999) et aussi plus efficaces que les cellules malignes contenant un gène de cytokine comme le GM-CSF (Klein, Bueler et al. 2000). En 2004, une nouvelle stratégie concernant les cellules

dendritiques a été rapportée par une équipe de l'université Stanford chez la souris : les cellules dendritiques, stimulées *in vivo* par les séquences CpG déméthylées (produits caractéristiques des ADN bactériens) et la chémokine MIP-3 α (macrophage inflammatory protein-3alpha), sont capables d'activer les lymphocytes T CD8+ naïfs dans le mélanome et l'adénocarcinome du côlon (Furumoto, Soares et al. 2004).

Les premiers essais utilisant les cellules dendritiques à visée thérapeutique ont publié en 1996 (Murphy, Tjoa et al. 1996). Les auteurs ont traité les patients exprimant le CMH de classe I HLA-A2, atteints de cancer de la prostate métastatique par l'administration des cellules dendritiques autologues chargées avec peptides PSMA (Prostate-Specific Membrane Antigen) restreints par HLA-A2. Depuis, ce groupe a rapporté plusieurs études cliniques successives ayant permis la poursuite de la prise en charge des patients initiaux et l'entrée de nouveaux patients avec un résultat modeste mais encourageant (Ragde, Cavanagh et al. 2004). Schadendorf et al. ont fait une synthèse sur 240 patients atteints d'un mélanome de stade IV qui ont été inclus dans 15 essais cliniques de phase I et II, dont 214 sont considérés comme évaluables. 13 patients ont bénéficié d'une rémission complète et 11 patients ont présenté une réponse partielle, ce qui correspond à des taux de réponse objective de 11 % par rapport aux patients dits évaluables et de 10 % par rapport à l'ensemble des patients. Cependant, les taux de réponses s'échelonnent de 0 à 25 % selon les protocoles menés par de différents centres (Schadendorf and Nestle 2001). Parmi ces essais, il faut souligner que Nestle et al. ont montré l'intérêt de l'utilisation des cellules dendritiques chargées avec les lysats tumoraux, parce que cette utilisation présente l'avantage majeur d'être applicable presque à toutes les tumeurs, même si les antigènes de ces tumeurs ne sont pas identifiés et sans nécessité pour le patient d'appartenir à un groupe HLA particulier (Nestle, Aljagic et al. 1998).

Toutes les études récentes montrent que cette approche de vaccination par les cellules dendritiques permet d'induire chez les patients des réponses immunologiques ainsi que des réponses cliniques, bien que l'efficacité clinique soit moins évidente que la réponse immunologique chez de nombreux malades, et la confirmation dans les essais cliniques de phases III est nécessaire (Jefford, Maraskovsky et al. 2001).

Finalement, parmi les différents types d'immunothérapie abordées, mis à part la greffe allogénique dans les hémopathies et certaines immunothérapies passives telles que le

trastuzumab dans le cancer du sein, le rituximab, l'alemtuzumab et le gemtuzumab dans les hémopathies, le reste des immunothérapies s'intègre encore dans le domaine de la recherche clinique prospective sans franchir le cap d'une indication validée. À l'avenir, il est probable que la combinaison de différentes approches thérapeutiques soit mis en œuvre, comme cela a été le cas avec la chimiothérapie des cancers dans les années 70.

4. Les lymphomes B

4-1. Différenciation des lymphocytes B normaux

La lymphopoïèse B se fait en deux parties : la **première phase antigène indépendante** liant à la différenciation et la maturation des lymphocytes se situe dans la moelle osseuse et la **deuxième phase antigène dépendante** conduisant aux cellules produisant des immunoglobulines ou aux lymphocytes B mémoires a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires. (**Figure 11**)

4-1.1 Phase antigène indépendante

Les cellules pro-B sont dérivées des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes et elles possèdent une capacité limitée d'auto-renouvellement. A ce stade, le réarrangement du locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines se met en place : la jonction D_H à J_H au **stade précoce** de la cellule pro-B est suivie par la jonction V_H à DJ_H au **stade tardif** de la cellule pro-B. Les cellules pro-B sont caractérisées par l'expression membranaire des antigènes CD19 et CD10. La molécule CD19 qui apparaît à partir de ce stade est un marqueur Pan-B, en revanche, l'expression du CD10 est transitoire et s'éteint après cette étape. Les protéines de transduction du signal intracellulaire, $Ig\alpha$ (CD79a) et $Ig\beta$ (CD79b), sont exprimées faiblement à la surface des cellules pro-B en association avec la calnexine (Nagata, Nakamura et al. 1997). Normalement exprimée dans le réticulum endoplasmique (voir figure 6), la présence de la calnexine à la surface des cellules B ou T, apparaît comme une caractéristique des progéniteurs lymphoïdes, bien que son rôle dans le développement lymphocytaire précoce ne soit pas clarifié (Wiest, Bhandoola et al. 1997). Les cellules pro-B expriment à leur surface

une 'pseudo chaîne légère', composée des polypeptides V μ pré-B et λ 5 (lamda-like chez l'homme) (Karasuyama, Rolink et al. 1993) et elles expriment également une enzyme nucléaire TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase) qui ajoute des nucléotides à la jonction des segments réarrangés, augmentant ainsi leur diversité, et des protéines RAG-1 et RAG-2 (Recombinaison Activating Genes) qui interviennent dans la recombinaison spécifique des gènes des immunoglobulines (Oettinger, Schatz et al. 1990).

Le réarrangement productif du gène de la chaîne lourde μ définit le stade suivant, les **lymphocytes pré-B**. La chaîne μ dans les **grandes cellules pré-B** est exprimée à l'intérieur de la cellule et peut-être à sa surface en petites quantités, en combinaison avec la pseudo chaîne légère, et avec les protéines Ig α et Ig β , pour former le récepteur de la cellule pré-B (pré-BCR). Le pré-BCR joue un rôle crucial dans le développement des cellules B. Son expression à la surface permet à la cellule de passer au stade ultérieur de la différenciation (Melchers, Karasuyama et al. 1993). Le stade des **petites cellules pré-B** est marqué par le commencement du réarrangement de la chaîne légère et la ré-expression des gènes RAG.

Le stade des **cellules B immatures** est caractérisé par la production d'une chaîne légère classique qui remplace la pseudo chaîne légère et donne naissance à une IgM de surface qui confère à la cellule une spécificité donnée de reconnaissance de l'antigène. Avant que les cellules B immatures ne quittent la moelle osseuse, une sélection négative se réalise : les cellules B immatures possédant les Ig membranaires qui reconnaissent les antigènes du soi avec une grande affinité, sont éliminées par apoptose. Il est possible pour ces cellules de réaliser de réarrangements secondaires au locus de chaînes légères et ainsi de changer la spécificité de leurs récepteurs. Ce phénomène est nommé 'Receptor editing' (Tiegs, Russell et al. 1993) (Dorner, Foster et al. 1998). Après avoir subi cette sélection négative, les cellules B immature quittent la moelle osseuse pour gagner les organes lymphoïdes périphériques où elles subissent les dernières étapes de maturation (Osmond 1991).

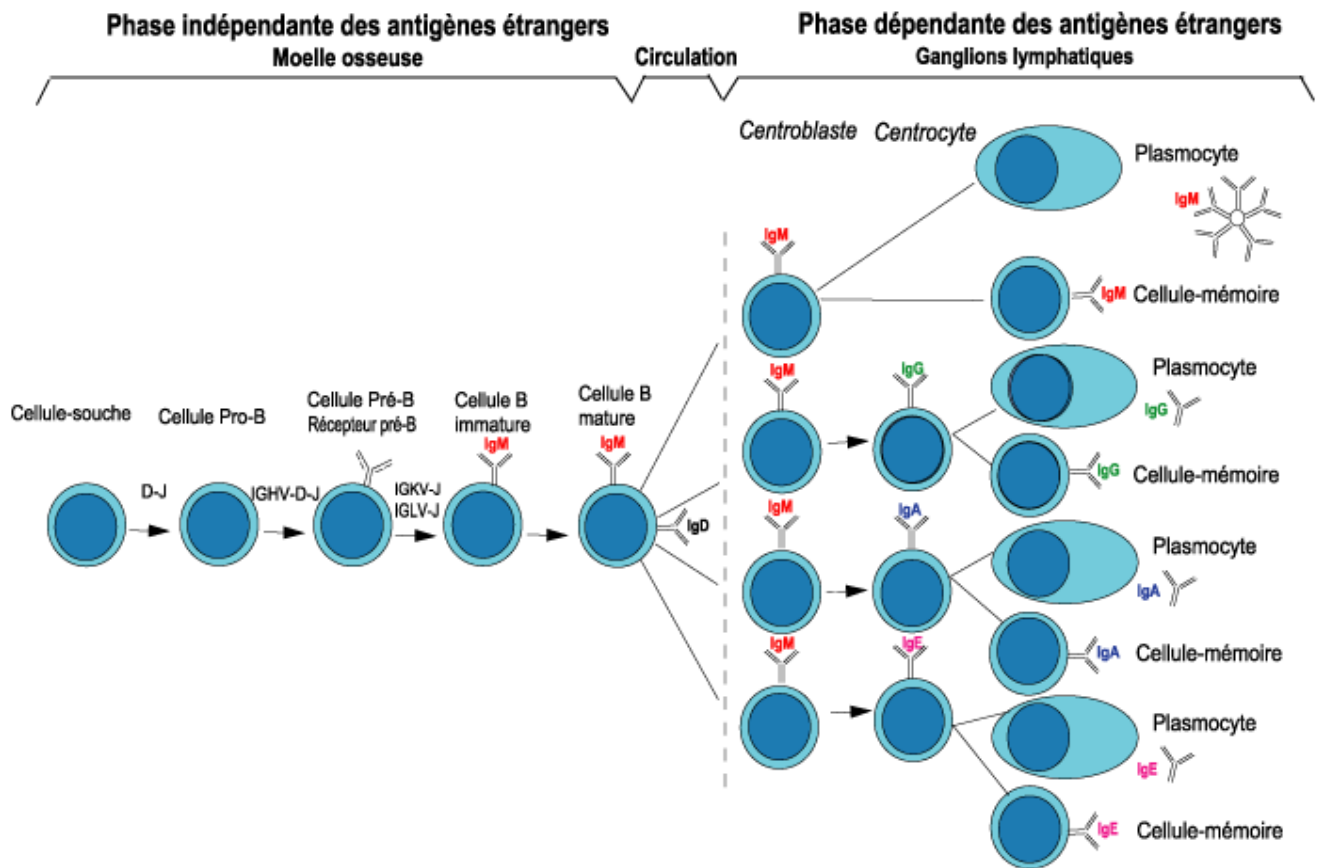


Figure 11. Différenciation des lymphocytes B. D'après Lefranc M.-P. et Lefranc G., IMGT, the international ImMunoGeneTics information system®, <http://imgt.cines.fr>, Montpellier, France, 2002.

4-1.2 Phase antigène dépendante

Les cellules B immatures survivant à la périphérie continuent leur différenciation pour devenir des **cellules B matures** qui expriment en surface IgM et IgD. Les cellules qui n'expriment pas d'Ig fonctionnelle sont éliminées par apoptose (Osmond 1993).

Ces lymphocytes B matures (appelés aussi naïfs) transitent par les voies sanguine et lymphatique et colonisent les follicules primaires des organes lymphoïdes secondaires. Quand ces cellules rencontrent l'antigène reconnu par l'immunoglobuline membranaire, elles sont activées et peuvent suivre une des trois voies : soit les cellules entrent dans un état non réactif

(anergie) ; soit les cellules arrivent à engendrer un centre germinatif formant un follicule secondaire où elles prolifèrent activement et se différencient spécifiquement en cellules mémoires ou en plasmablastes ; soit elles se différencient en plasmocytes sécréteurs d'Ig (IgM en majorité) en dehors d'un centre germinatif et sans subir de mutations somatiques des gènes des Ig (Shaffer, Rosenwald et al. 2002) (**Figure 12**).

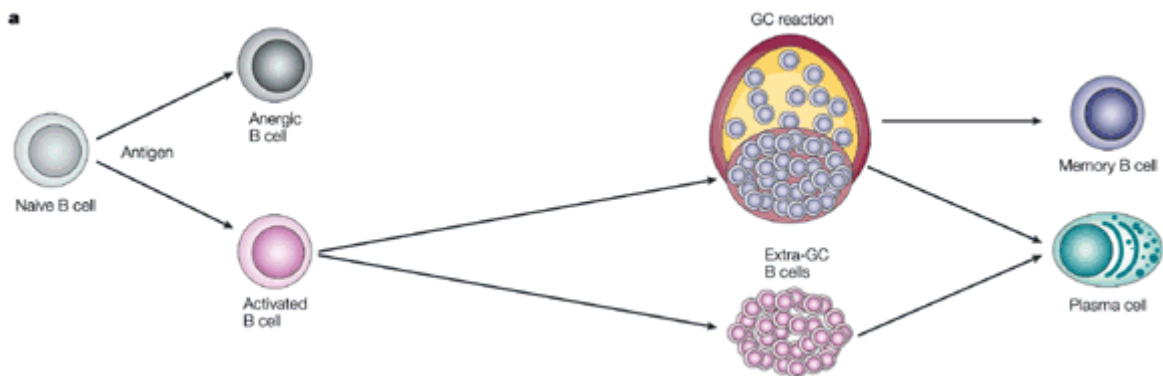


Figure 12 Trois voies possibles quand les cellules B naïves rencontrent l'antigène (Shaffer, Rosenwald et al. 2002)

Par contre, les lymphocytes ne participant pas à la réaction immunologique se placent en périphérie et constituent la zone de manteau. Les cellules B matures prolifèrent et deviennent des **centroblastes** au niveau de la zone sombre du centre germinatif. Ces derniers perdent leurs immunoglobulines de surface, et le processus d'hypermutation somatique qui est activé mène à l'introduction aléatoire et progressive de mutations ponctuelles dans les régions variables des gènes codant les immunoglobulines. Cette étape est capitale dans la maturation d'affinité des anticorps et donne aussi la diversité du répertoire des lymphocytes B (Klein, Goossens et al. 1998). A ce même stade, la commutation de classe ou 'class switching' se produit et aboutit à l'expression d'anticorps d'isotype IgG, IgA ou IgE au lieu de IgM et IgD sans altération de la spécificité pour antigène (Toellner, Gulbranson-Judge et al. 1996), avec l'intervention de la protéine AID (activation-induced deaminase) (Kenter 2003).

Par la suite, les centroblastes se transforment en **centrocytes** qui migrent dans la zone claire du centre germinatif. Les centrocytes expriment de nouveau des Ig de surface (le plus souvent IgG). En effet, la plupart de centrocytes meurent d'apoptose et seulement une petite partie des

centrocytes qui arrive à l'échapper reçoit un signal de vie provenant d'une reconnaissance d'un antigène présenté par les cellules folliculaires dendritiques et d'une interaction avec les lymphocytes T CD4+ (Defrance, Casamayor-Palleja et al. 2002). À cette étape, les centrocytes sont également soumis au processus de la commutation de classe et gagnent la partie apicale de la zone claire où ils continuent leur différenciation vers le stade des cellules effectrices : ils se différencient en **lymphocytes B mémoires** et quittent le centre germinatif pour constituer un pool au niveau de la zone marginale ou ils deviennent les plasmoblastes qui terminent leur différenciation en **plasmocytes** dans la moelle osseuse. Alternativement, certains centrocytes peuvent retourner dans le centre germinatif après avoir cheminé dans la zone externe, et subissent un nouveau cycle en se retransformant en centroblastes (Casamayor-Palleja, Feuillard et al. 1996).

4-2. Développement et classification des lymphomes B

Les lymphomes B se présentent sous la forme d'un clone de cellules malignes bloquées à un stade de maturation. Les anomalies génétiques sont souvent la cause de la transformation maligne des cellules normales, elles sont suivies des mécanismes permettant la prolifération cellulaire non régulée et de l'échappement à l'immunosurveillance. Willis et Al. ont résumé le rôle des translocations impliquant les gènes d'Ig, en particulier le locus (IgH) en 14q32, dans l'oncogenèse des hémopathies B (Willis and Dyer 2000): La translocation (8 ;14)(q24 ;q32) est révélée dans le lymphome de Burkitt avec une fréquence presque de 100%, la juxtaposition du gène c-myc (situé au chromosome 8) sur le gène codant pour les chaînes lourdes des Ig (segment J), conduit à la dérégulation de la prolifération cellulaire (Taub, Kirsch et al. 1982). La translocation (11 ;14) (q13 ;q32) induit la sur-expression du gène cycline-D1 de manière analogue au gène c-myc. La sur-expression de cycline-D1 impliquée dans la régulation du cycle cellulaire favorise le passage de la phase G1 à la phase S, permettant à la cellule maligne de poursuivre son cycle cellulaire sans contrôle. Cette translocation est observée dans au moins 95% des lymphomes à cellules du manteau (Vaandrager, Schuurin et al. 1996). L'aberration du gène des chaînes lourdes des Ig est également impliquée dans les lymphomes folliculaires pour lesquels une translocation (14 ;18) (q32 ;q21) est identifiée chez environ 80% des patients. La sur-expression du gène Bcl-2 (situé en 18q21) entraîne un dérèglement de l'apoptose (Jager, Bocskor et al. 2000).

D'autres anomalies cytogénétiques et moléculaires, telles que les délétions ou mutations chromosomiques sont aussi observées.

Pour bien identifier l'origine de ces lymphomes B, on peut les distinguer en phase « pré-centre germinatif », phase « centre germinatif » et phase « post-centre germinatif ». En effet, la présence des mutations des gènes des régions variables d'Ig après le passage dans le centre germinatif, nous permet de caractériser ces hémopathies lymphoïdes B (**Figure 13a, 13b**).

Étant donnée l'hétérogénéité des lymphomes B, une classification appropriée est devenue nécessaire. Les méthodes de classifications classiques, tels la Working Formulation (USA, 1982) ou le système de Kiel (Europe, 1988 et 1992), basées principalement sur des critères histologiques et cytologiques, manquaient de flexibilité et menaient parfois à l'amalgame de certaines entités pathologiques distinctes. Les classifications plus récentes, celles de REAL (Revised European American lymphoma) (Harris, Jaffe et al. 1994) et de WHO (World Health Organization) (WHO classification of tumours. Lyon : IARC Press, 2001) font intégrer non seulement des critères histologiques et cytologiques, mais aussi des données immunologiques, cytogénétiques et de biologie moléculaire. La classification de WHO 2001 est actuellement la seule classification des lymphomes reposant sur un consensus international (**Figure 14**). Cette classification est une évolution de la classification de REAL tenant compte des données physiopathologiques nouvelles, concernant en particulier les dérégulations génétiques induites par les aberrations chromosomiques.

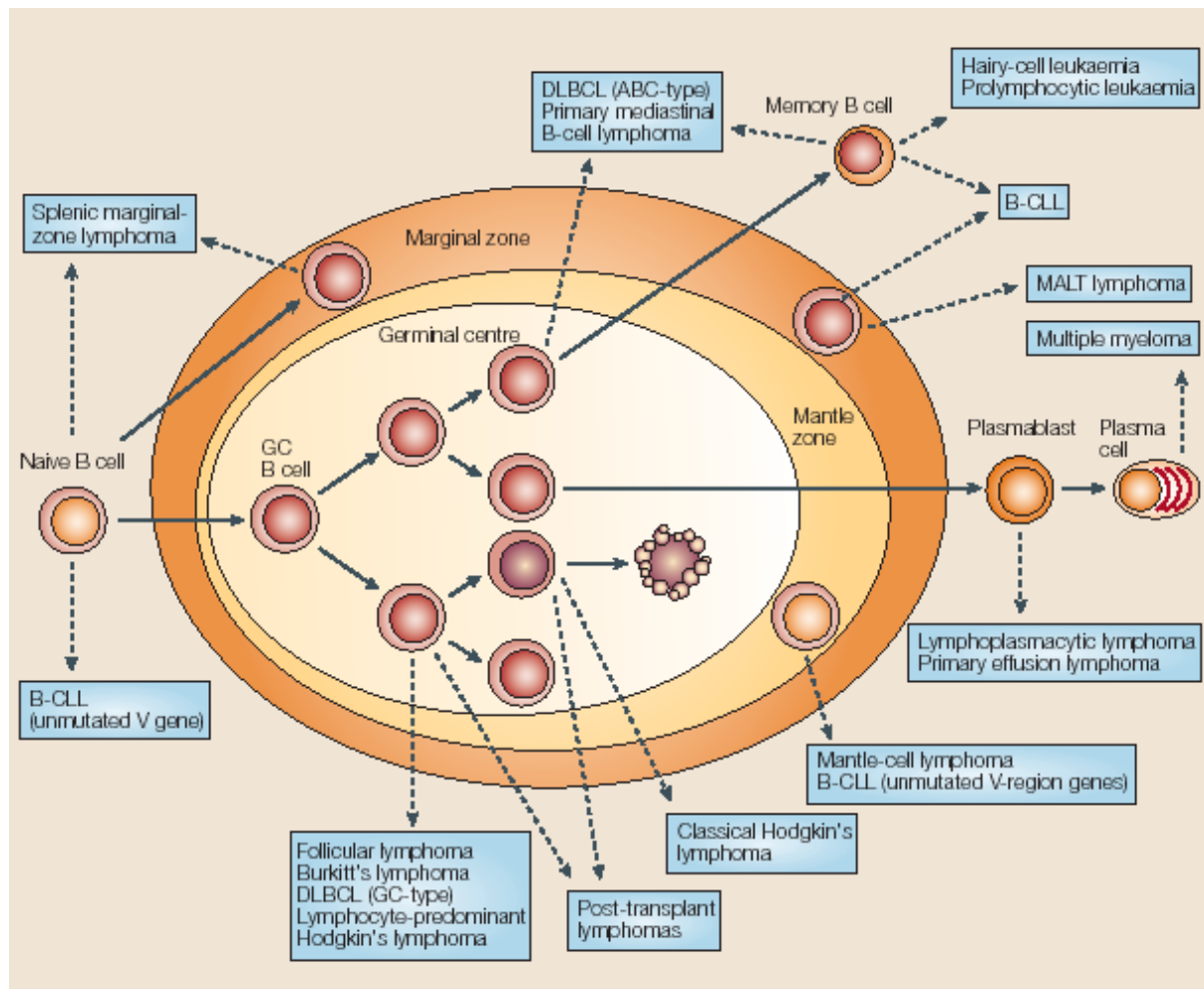


Figure 13a. Correspondance entre les cellules B normales et les différents syndromes lymphoprolifératifs. D'après (Kuppers 2005).

Table 1 | Human mature B-cell lymphomas

Lymphoma	Features	Frequency among lymphomas (%)*	Proposed cellular origin
B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL)	Leukaemia of small B cells that express the CD5 antigen, involving peripheral-blood and bone-marrow cells. Common in elderly patients. Called 'small lymphocytic lymphoma' when lymph-node cells are predominantly involved. Patients with leukaemia cells that lack variable (V)-region gene mutations have a worse prognosis than patients with mutations in V-region genes.	7	Memory B cell? Naive B cell? Marginal-zone B cell?
Mantle-cell lymphoma	Lymphoma arises from cells that populate the mantle zone of follicles, express CD5 and show aberration in cyclin-D1 expression. Nearly all cases are associated with <i>BCL1-IgH</i> translocation.	5	CD5+ mantle-zone B cell
B-cell prolymphocytic leukaemia	Chronic B-cell malignancy related to B-CLL. Over 50% of cancer cells represent prolymphocytes (large lymphocytes with clumped chromatin and prominent nucleolus).	<1	Memory B cell
Follicular lymphoma	A nodal lymphoma with a follicular growth pattern. Lymphoma cells morphologically and phenotypically resemble GC B cells. Most cases are associated with <i>BCL2-IgH</i> translocation.	20	GC B cell
Hairy-cell leukaemia	Chronic B-cell malignancy involving spleen and bone marrow. Very few circulating leukaemia cells. Tumour cells form 'hairy' projections.	<1	Memory B cell
MALT lymphoma	Extranodal marginal-zone B-cell lymphoma. Develops mostly in acquired lymphoid structures.	7	Marginal-zone B cell
Nodal marginal-zone lymphoma	Lymphoma with primary presentation in lymph nodes. Lymphoma cells resemble marginal-zone or monocytoid B cells, but often have heterogenous cytology, which ranges from small to large lymphocytes and includes plasma cells.	2	Marginal-zone B cell? Monocytoid B cell?
Splenic marginal-zone lymphoma	Micronodular lymphoid infiltration in the splenic white pulp. Mostly small IgD+ lymphoma cells that replace normal follicles and the marginal-zone region. Frequently involves infiltration into bone marrow and circulation.	1	Subset of naive B cells that have partially differentiated into marginal-zone B cells?
Burkitt's lymphoma	Fast growing. Mostly extranodal. Characterized by a <i>MYC-Ig</i> translocation. Patients with endemic form are EBV-positive in nearly all cases. Patients with sporadic form are EBV-positive in about 30% of cases.	2	GC B cell
Diffuse large B-cell lymphoma	Heterogenous group of lymphomas characterized by large B cells. Several subtypes are recognized. Morphological variants include centroblasts and immunoblasts.	30–40	GC or post-GC B cell
Primary mediastinal B-cell lymphoma	Subtype of diffuse large B-cell lymphoma located in the mediastinum. Tumour cells are large B cells but also show a number of similarities to Reed–Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma. Most frequently occurs in young women.	2	Thymic B cell
Post-transplant lymphoma	Mostly of the diffuse large-cell lymphoma type. Lymphomas that arise in patients after organ transplantation. Immunosuppressive treatment confers risk of uncontrolled proliferation of EBV-infected B cells that can develop into lymphomas.	<1	GC B cell
Primary effusion lymphoma	Frequently occurs in patients with AIDS or patients who have received organ transplants. Lymphoma cells are found as effusions in serous cavities, such as pleura, pericardium or peritoneum.	<0.5	(Post) GC B cell
Lymphoplasmacytic lymphoma	Involves lymph nodes, bone marrow and spleen. The tumour-cell population is composed of small B cells, plasmacytoid lymphocytes and plasma cells. Most patients present with a serum monoclonal protein, usually of the IgM type.	1	(Post) GC B cell
Multiple myeloma	Neoplastic proliferation of plasma cells in the bone marrow.	10	Plasma cell
Classical Hodgkin's lymphoma	Characterized by bizarre, large tumour cells. Hodgkin and Reed–Sternberg cells account for less than 1% of cells in the tumour, and are admixed with various non-neoplastic cell types. Tumour cells show a phenotype not characteristic of any normal haematopoietic cell type.	10	Defective GC B cell
Lymphocyte-predominant Hodgkin's lymphoma	Rare indolent subtype of Hodgkin's lymphoma. Lymphoma cells show a B-cell phenotype, represent a small population in the tissue, and grow in association with follicular dendritic cells and T-helper cells. Good prognosis.	0.5	GC B cell

*These numbers refer to the frequencies in Europe and North America. AIDS, acquired immune deficiency syndrome; EBV, Epstein–Barr virus; Ig, immunoglobulin; MALT, mucosa-associated lymphoid tissue; GC, germinal centre.

Figure 13b. Origine, caractère et fréquence des lymphomes de type B. D'après (Kuppers 2005).

Kiel (updated) 1992	REAL 1994	WHO 2001	ICD-O code
B-cell lymphomas	B-cell neoplasms	B-cell neoplasms	
	Precursor B-cell neoplasm	Precursor B-cell neoplasm	
Acute lymphoblastic B-cell leukaemia B lymphoblastic lymphoma	Precursor B lymphoblastic leukaemia / lymphoma	Precursor B lymphoblastic leukaemia / lymphoma	9835 / 3 9728 / 3
	Peripheral B-cell neoplasms	Mature B-cell neoplasms	
B-cell chronic lymphocytic leukaemia	B-cell chronic lymphocytic leukaemia /	Chronic lymphocytic leukaemia /	9823 / 3
Immunocytoma, lymphoplasmacytoid type	small lymphocytic lymphoma /	small lymphocytic lymphoma	9670 / 3
B-cell prolymphocytic leukaemia	B-cell prolymphocytic leukaemia	B-cell prolymphocytic leukaemia	9833 / 3
Immunocytoma, lymphoplasmacytic type	Lymphoplasmacytoid lymphoma / immunocytoma	Lymphoplasmacytic lymphoma	9671 / 3
	<i>Splenic marginal zone lymphoma (± villous lymphocytes)</i>	Splenic marginal zone lymphoma (± villous lymphocytes)	9689 / 3
Hairy cell leukaemia	Hairy cell leukaemia	Hairy cell leukaemia	9940 / 3
Plasmacytic lymphoma (Plasmacytoma)	Plasmacytoma / Plasma cell myeloma	Plasma cell neoplasms Plasma cell myeloma	9732 / 3
		Solitary plasmacytoma of bone	9731 / 3
		Extrasosseous plasmacytoma	9734 / 3
	Marginal zone B-cell lymphoma, extranodal (MALT-type ± monocytoid B cells)	Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	9699 / 3
Monocytoid B-cell lymphoma	<i>Marginal zone B-cell lymphoma, nodal (± monocytoid B cells)</i>	Nodal marginal zone B-cell lymphoma (± monocytoid cells)	9699 / 3
	Follicle centre lymphoma, follicular	Follicular lymphoma	9690 / 3
Centroblastic-centrocytic lymphoma, follicular, follicular and diffuse	<i>Grade I</i>	Grade 1	
– with an increased number of centroblasts	<i>Grade II</i>	Grade 2	
Centroblastic lymphoma, follicular	<i>Grade III</i>	Grade 3a	
	<i>Grade III</i>	Grade 3b	
Centroblastic-centrocytic lymphoma, diffuse	<i>Follicle centre lymphoma, diffuse, small cell</i>	Diffuse follicle centre lymphoma	
Centrocytic (mantle cell) lymphoma	Mantle cell lymphoma	Mantle cell lymphoma	9673 / 3
Centroblastic lymphoma, centrocytoid			
Centroblastic lymphoma, diffuse	Diffuse large B-cell lymphoma	Diffuse large B-cell lymphoma (variants)	9680 / 3
B immunoblastic lymphoma		centroblastic	
B-cell large anaplastic lymphoma		immunoblastic	
		anaplastic	
		T-cell / histiocyte rich	
		plasmablastic	
		with expression of full length ALK (IgA+)	
	DLBCL subtype: Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma	Mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma	9679 / 3
Angio-endotheliotropic (intravascular) lymphoma	Diffuse large B-cell lymphoma	Intravascular large B-cell lymphoma	9680 / 3
	Diffuse large B-cell lymphoma	Primary effusion lymphoma	9678 / 3
Burkitt lymphoma (BL)	Burkitt's lymphoma	Burkitt lymphoma	9687 / 3
BL with intracytoplasmic immunoglobulin	<i>DLBCL subtype: High-grade B-cell lymphoma, Burkitt-like</i>	BL with plasmacytoid differentiation atypical BL / Burkitt-like	
	Burkitt leukaemia	Burkitt leukaemia	9826 / 3
		B-cell proliferations of uncertain malignant potential	
Lymphomatoid granulomatosis (Liebow)		Lymphomatoid granulomatosis	9766 / 1
		Post-transplant lymphoproliferative disorder, polymorphic	9970 / 1

Figure 14. Les classifications des lymphomes B Kiel, REAL et WHO. D'après Cogliatti SB et Schmid U, Swiss Med Wkly 2002, vol 132 p607.

Objectifs du travail de thèse

Objectifs du travail de thèse :

Actuellement, le traitement des lymphomes est toujours basé sur des polychimiothérapies et la radiothérapie. Cependant, celles-ci ont montré leur limite, parce que la guérison des patients ne dépasse pas de 60-70 % en utilisant ses différentes modalités y compris celle d'intensification. Donc, il est nécessaire de chercher d'autres approches thérapeutiques qui arrivent à les compléter ou même à les remplacer. L'immunothérapie, en particulier au travers des lymphocytes T CD8+ et CD4+, est développée comme une stratégie de l'activation du système immunitaire.

Nous savons que les cellules T CD8+ sont capables de lyser directement les cellules tumorales. Cependant, la présence de ces cellules T spécifiques cytotoxiques n'empêche pas la croissance des cellules malignes, ce qui suggère que ces cellules tumorales peuvent rendre ces lymphocytes T CD8+ anergiques (Nanda and Sercarz 1995). L'initiation de l'activation ou la maintenance des fonctions des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ par les cellules T CD4+ ont montré leur importance dans l'activation du système immunitaire, bien que les mécanismes soient encore mal connus (Toes, Ossendorp et al. 1999) (Ossendorp, Toes et al. 2000).

Les cellules de lymphomes B font partie des rares cancers à exprimer les molécules de CMH de classe II. Elles peuvent fonctionner comme des CPAs professionnelles et sont souvent capables de délivrer un signal de costimulation via les molécules B7 (CD80, CD86) (Plumas, Chaperot et al. 1995). De plus, certains auteurs soulignent aussi la nécessité de la stimulation de CD40, apportée par les molécules CD40L portées par les lymphocytes T activés, pour que la cellule B lymphomateuse puisse se comporter comme une CPA efficace (Schultze, Cardoso et al. 1995). Tout ceci permet aux lymphocytes B malins d'interagir directement avec les lymphocytes T CD4+.

Les travaux de notre laboratoire ont pour thématique l'étude des relations fonctionnelles entre les lymphocytes T normaux et les cellules malignes autologues dans le cadre des lymphomes B de bas grade de malignité. Il est bien établi qu'au contact des lymphocytes B malins autologues, la prolifération des TIL-T et PBL-T totaux, ou monoclonaux est induite (Jacob,

Piccinni et al. 1990) (Shi, Bonnefoix et al. 1995) (Chaperot, Delfau-Larue et al. 1999). En retour, les influences fonctionnelles éventuelles des cellules T auto-réactives sur les cellules malignes autologues, en particulier les cellules T CD4+, nous intéressent selon trois critères : régulation de la prolifération, induction d'un processus de différenciation et induction d'une mort cellulaire. Dans un cas de lymphome folliculaire, notre laboratoire a pu montrer le rôle direct de cellules T CD4+ réactives qui sont capables d'induire l'entrée en cycle des cellules B tumorales autologues, bien que ces dernières restent bloquées en phase G1 du cycle cellulaire et qu'elles ne répondent pas à des signaux de prolifération tel que IL4/CD40 (Martin, Bonnefoix et al. 1999). Pour explorer plus avant la fonction directe des lymphocytes T CD4+ vis-à-vis des lymphocytes B malins dans un système autologue, le travail de cette thèse est focalisé sur deux nouveaux modèles.

Premier modèle :

Il s'agit d'un lymphome splénique de la zone marginale. Nous avons étudié les fonctions directes des TIL-T CD4+ venant de la rate du patient sur les cellules B malignes autologues.

Deuxième modèle :

Nous disposons d'une lignée continue de lymphome B folliculaire et des PBL-T du même patient. Les effets fonctionnels des PBL-T CD4+ vis-à-vis des cellules venant de la lignée tumorale ont été étudiés au niveau clonal, et les clones T CD4+ spécifiques ont été caractérisés.

Chapitre 1

Différenciation plasmocytaire terminale des cellules B malignes induite par les lymphocytes T CD4⁺ infiltrant la tumeur autologue dans un cas de lymphome splénique de la zone marginale

Chapitre 1

Introduction :

Nous disposons d'un prélèvement splénique tumoral concernant un lymphome de la zone marginale. Le phénotypage des cellules B tumorales a été réalisé pour préciser le stade de différenciation de ce clone malin. Les cellules malignes expriment toutes CD19, CD24, CD40, IgM, Chaîne Kappa, CD44, présentent partiellement CD20 et CD39. Les IgD, CD5 et CD23 sont absents à la surface de ces cellules. De plus, il existe 1% de cellules tumorales avec CD38+ et CD138+. Cette analyse révèle que ce sont des lymphocytes B matures, post-folliculaires qui restent bloqués vraisemblablement à un stade de différenciation pré-plasmocytaire.

La mise en culture entre les TIL-T CD4+ et les lymphocytes B malins ont montré des résultats intéressants : l'activation des cellules T est mise en évidence par l'augmentation régulière des cellules T exprimant CD25 au long de la co-culture. En retour, l'entrée en cycle des cellules B malignes est induite comme l'indique l'expression positive de l'ag Ki67 (81% à J14). Par la même occasion, nous avons constaté que les TIL-T CD4+ et les cellules B malignes arrivent à former des conjugués dans lesquels ces dernières expriment de façon moins intense la chaîne kappa pendant la co-culture, par rapport aux cellules initiales. À partir de ces données, nous supposons qu'au contact des cellules T CD4+ auto-réactives, les cellules malignes se différencient en cellules plasmocytaires, caractérisées par la perte progressive de l'Ig de surface. Étant donnée le stade où les cellules tumorales se situent, cette hypothèse nous a conduit à rechercher l'induction d'une différenciation plasmocytaire terminale sous l'effet direct des TIL-T CD4+.

Chapitre 1

Résultats

not contain associated adhesin domains in contrast to HrgpA) was able to activate human neutrophils through the PAR-2 receptor. Thrombin does not activate PAR-2, and thus, combining this with other data on the specificity of the gingipains,³ we cannot entirely agree with the contention of McRedmond and Fitzgerald that the gingipains appear to have a thrombinlike specificity.

McRedmond and Fitzgerald now make the case for similarities between the action of gingipains on the PARs and that seen with the overall streptokinase-plasminogen-antistreptokinase complex. In particular, the authors focus upon the similar function of the associated adhesins of HRgpA in aiding the cleavage of the PARs, much as the streptokinase-plasminogen complex is guided to the platelet surface by the binding of the antistreptokinase antibodies to the platelet Fc receptor, as described in their work. Recent work in our laboratory has shown that HRgpA and RgpB in fact have some differences in their specificity for peptide substrates that may relate to small differences in their active site architecture induced by a limited number of point mutations (N. Ally et al, manuscript in preparation). We cannot rule out that the adhesins of HrgpA play some role in enhancing functions such as cleavage of coagulation factors and PARs, but it would certainly appear that we can no longer be sure that it is only these adhesins that are modifying the action of the larger protein. Certainly, it must be noted that RgpB can activate the PARs directly and therefore the adhesin domains are not as vital in this process as in the streptokinase scenario.

The letter by McRedmond and Fitzgerald now amplifies upon the role of streptokinase-induced cellular activation in bacterial pathogenesis. The scenario posed by them is certainly a fascinating one and, together with our recently published work on the

activation of PARs on epithelial cells by the gingipains⁴ and the resulting induction of interleukin-6 secretion, the data obtained with streptokinase certainly aids in establishing our proposal that PAR-mediated activation of mammalian cells by bacterial proteins is an intriguing new mechanism to be investigated in bacterial pathogenesis. The importance of PAR-mediated platelet activation by bacterial proteins also needs to be established further, which will provide further intriguing glimpses into the possibility that cardiovascular diseases might, in some cases, have an underlying chronic bacterial disease as the cause.

Robert N. Pike, Afrodite Lourbakos, James Travis, and Jan Potempa

Correspondence: Robert N. Pike, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Monash University, PO Box 13D, Clayton, Victoria 3800, Australia; e-mail: rob.pike@med.monash.edu.au

References

1. McRedmond JP, Harriott P, Walker B, Fitzgerald DJ. Streptokinase-induced platelet activation involves antistreptokinase antibodies and cleavage of protease-activated receptor-1. *Blood*. 2000;95:1301-1308.
2. Lourbakos A, Chinni C, Thompson P, et al. Cleavage and activation of protease-activated receptor-2 on human neutrophils by gingipain-R from *Porphyromonas gingivalis*. *FEBS Lett*. 1998;435:45-48.
3. Potempa J, Mikolajczyk-Pawlinska J, Brassell D, et al. Comparative properties of two cysteine proteases (gingipains R), the products of two related but individual genes of *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*. 1998;273:21648-21657.
4. Lourbakos A, Potempa J, Travis J, et al. An arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion. *Infect Immun*. 2001;69:5121-5130.

To the editor:

Terminal plasmacytoid differentiation of malignant B cells induced by autotumor-reactive CD4⁺ T cells in one case of splenic marginal zone B-cell lymphoma

In lymphoid organs invaded by malignant B-cell lymphomas, the development of reactive CD4⁺ tumor-infiltrating T cells (TIL-T) at the contact of tumor cells is now firmly established.^{1,2} It has been reported that lymphoma B cells are capable of proliferating in response to various recombinant signals usually provided by CD4⁺ T cells, such as interleukin-4 (IL-4), or CD40 ligand.³ However, the exact nature of the functional relationships between CD4⁺ TIL-T and autologous non-Hodgkin lymphoma (B-NHL) cells remains largely unknown mainly because this question has not yet been extensively investigated in autologous CD4⁺ T/malignant B-cell coculture systems in vitro. We report here evidence that CD4⁺ TIL-T have the potential to drive autologous lymphoma B cells toward a terminal differentiated state, in one case of splenic low-grade, marginal zone B-cell lymphoma.

In May 1998, a 67-year-old man presented with a low-grade lymphoma (nonfollicular small-cell lymphoma) with involvement of spleen, blood, periaortic lymph nodes, liver, and bone marrow. The patient underwent splenectomy in July 1998. Histologic, cytologic, and immunophenotypic features were compatible with splenic marginal-zone B-cell lymphoma.⁴ All malignant B cells were surface IgM⁺, kappa⁺, CD19⁺, CD24⁺, CD40⁺, and were negative for IgD, CD23, and CD5. Less than 1% of malignant cells were CD38⁺ or CD138⁺. The percentage of CD3⁺ TIL-T was 9% with 5% CD4⁺ and 4% CD8⁺.

A population containing both CD4⁺ T cells and malignant B

cells was negatively selected from total spleen cells by depleting CD8⁺ T cells, residual NK cells, monocytes, and normal B cells by one round of immunomagnetic bead depletion. Purity was assessed by flow cytometry and CD4⁺ T/malignant B-cell preparations usually contained 8% to 10% CD4⁺ T cells and 88% to 90% CD19⁺ kappa⁺ B cells. Residual cells not stained by CD3, CD4, CD19, or kappa antibodies were always less than 1%. Cocultures were then performed in the presence of recombinant IL-2 (rIL-2) at 10 U/mL. Control cultures consisted of purified malignant B cells cultured with rIL-2 but without the presence of CD4⁺ T cells.

A representative experiment of CD4⁺ T/malignant B-cell cocultures is given in Figure 1. After 7, 14, and 21 days of coculture, cells were harvested, triple stained with anti-CD4-PE-Cy5, kappa-PE, and CD138-FITC antibodies (Abs) and analyzed by flow cytometry. CD138 (Syndecan-1) is a transmembrane heparan sulfate proteoglycan expressed in Ig-producing, normal and malignant mature plasma cells.⁵ At analysis, according to a multicolor gating/painting strategy, CD138⁺ cells were gated and colored in orange, and CD138⁻ cells were colored in gray. At the initiation of the coculture (day 0), the spontaneous formation of conjugates between T cells and malignant B cells was negligible. At the contact of malignant B cells, autotumor-reactive CD4⁺ T cells became activated, expanded, and formed stable conjugates with malignant B cells. Between day 7 and day 21 of the coculture, the percentage of T/B-cell conjugates gradually increased (5% at

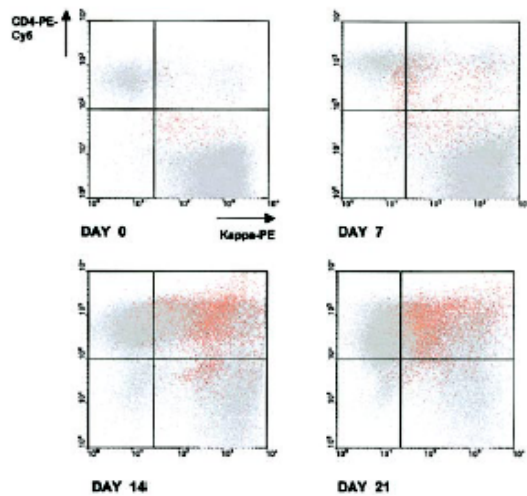


Figure 1. Conjugate formation between autotumor reactive CD4⁺ T cells and malignant B cells in CD4⁺ T/malignant B-cell cocultures, accumulation of CD138⁺ cells, and preferential localization of CD138⁺ cells within conjugates. After various time intervals, cells were harvested, triple stained with anti-CD4-PE-Cy5, kappa-PE, and CD138-FITC Abs, and analyzed by flow cytometry. At analysis, CD138⁺ cells were gated and colored in orange; CD138⁻ cells were colored in grey. CD138⁺ and CD138⁻ cells were then simultaneously visualized on dot plots with CD4-PE-Cy5/kappa-PE parameters. 50 000 events were collected for each dot plot. The quadrant statistics cursors were set using appropriate negative control antibodies. Results are from 1 representative experiment of the 5 performed.

day 7, 36% at day 14, and 34% at day 21), and this was accompanied by a progressive increase in the number of free T cells (from 6% at day 0 to 51% at day 21). CD138⁺ cells progressively accumulated in the CD4⁺ T/B-cell coculture and reached a maximum value of 18% of the total number of cells at day 14 (1%, 4%, 18%, 13%, at days 0, 7, 14, 21, respectively). CD138⁺ cells were almost exclusively confined within CD4⁺ T/B-cell conjugates (Figure 1), suggesting that the acquisition of this ag by malignant B cells was dependent on a close association with autotumor-reactive CD4⁺ T cells. To formally show that the CD138⁺ cells were truly plasma B cells, these cells were positively purified by an immunomagnetic method at day 14 of the coculture and phenotyped (Figure 2). This method allowed us to obtain a very pure population of CD138⁺ cells (98%). As expected, CD3, CD19, CD20, and CD24 were low or absent; the expression of CD40 was intermediate, and kappa light chain was expressed at a low level (mean value: 198 units of fluorescence) in comparison to fresh malignant B cells (mean value: 1299). A high proportion (85%) of cells strongly expressed CD38, a relevant marker to plasma cells. These cells exhibited a morphology of plasma cells and contained large amounts of intracytoplasmic kappa chain as estimated on cytospin slides stained with fluorochrome-conjugated anti-kappa Abs. To ensure that these CD138⁺ plasma cells belonged to the neoplastic clone, IgH gene rearrangements of purified CD138⁺ cells were investigated by a PCR-based method using Fr3 region primers and compared with IgH gene rearrangements of purified fresh malignant B cells. Both cell populations showed the same rearrangement bands, stressing that the CD138⁺ cells were B cells and clonally related to the original lymphoma cells (Figure 3). Cell-division tracking using PKH26 dye labeling indicated that more than 95% of the malignant B cells remained in a nonproliferative state throughout the coculture, formally excluding that the accumulation of CD138⁺ cells during the CD4⁺ T/malignant B-cell coculture

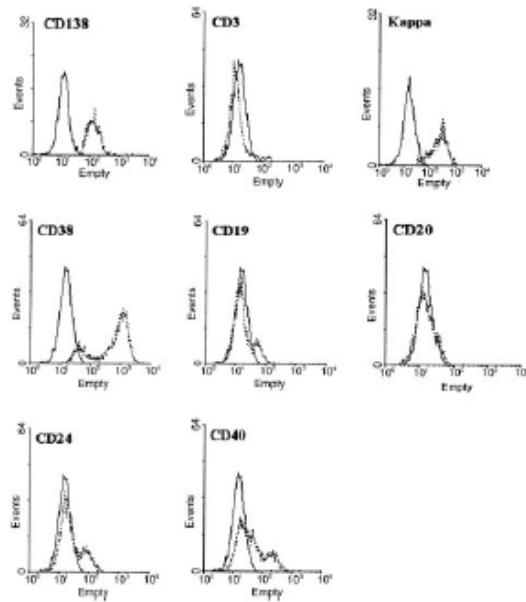


Figure 2. Purified CD138⁺ cells exhibit phenotypic features consistent with plasma cells. At day 14 of the CD4⁺ T/malignant B-cell coculture, CD138⁺ cells were positively purified with immunomagnetic beads. The dotted histograms were obtained using the monoclonal antibody (mAb) under study, and the solid histograms were obtained using the respective isotype-matched control Ab. Histograms were obtained from 1 of 2 independent experiments yielding similar results. 2 000 to 5 000 cells were acquired for each histogram.

might arise from the rapid proliferation of a minor component of CD138⁺ cells present at the initiation of the coculture. Finally, in control experiments, purified malignant B cells cultured alone in the sole presence of rIL-2 retained a phenotypic profile identical to

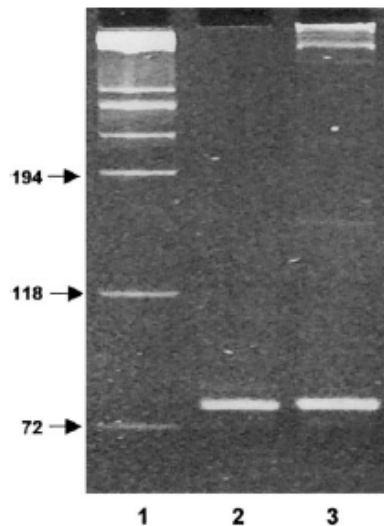


Figure 3. CD138⁺ plasma cells belong to the same neoplastic clone than fresh malignant B cells as evidenced by IgH gene rearrangements. Fr3 PCR products of DNA samples were obtained from fresh malignant B cells and from purified CD138⁺ cells after 21 days of the CD4⁺ T/B-cell coculture. Lane 1, molecular weight markers (sizes in base pairs); lane 2, fresh malignant B cells; lane 3, purified CD138⁺ cells. Results are from 1 representative experiment of the 2 performed.

fresh malignant B cells without any down-regulation of CD19, CD20, CD40, and surface Ig, or up-regulation of CD38 and CD138. Thus, malignant B cells did not show any tendency to spontaneous or rIL-2-induced differentiation in the absence of autologous CD4⁺ T cells.⁶⁻¹⁰

In the literature, there are now some convincing observations supporting the notion that B-lymphoma cells could be released from their apparent maturation block by external signals. Cerutti et al⁶ have described that in Burkitt lymphoma, a monoclonal B-cell line was induced to progress throughout a phenotypic differentiation program that approximated the stages of early centroblast, centroblast, centrocyte, and memory B cells, after engagement of CD40 by CD40 ligand and exposure to IL-4 and IL-10. In the presence of IL-6, these cells were driven to terminally differentiated plasma cells. Recently, a second experimental model used a follicular dendritic cell line, HK, and a lymphoma line, L3055, that resembles centroblasts. L3055 cells proliferated continuously in the presence of HK cells, whereas they differentiated into a population with the phenotype of centrocytes after stimulation with CD40 ligand and IL-4.⁷ In follicular lymphomas, it was formerly reported that allogeneic T cells induced fresh malignant B cells to secrete large amounts of Ig, and this was accompanied by loss of the surface Ig and development of abundant intracytoplasmic Ig.⁸ In 1995, Kramer et al⁹ reported a patient with follicular lymphoma who showed *in vivo* differentiation of malignant cells after autologous bone marrow transplantation and treatment with IL-3. The patient developed a plasmocytosis in blood and bone marrow accompanied by a paraprotein corresponding to the malignant clone and high IL-6-serum concentration. It was proven that the plasma cells were clonally related to the original lymphoma cells. The patient recovered spontaneously and had long-lasting remission, suggesting that terminal differentiation of malignant B cells was beneficial to the patient. More recently, Dogan et al¹⁰ described that follicular lymphomas contain a clonally linked but phenotypically distinct neoplastic B-cell population in the interfollicular zone. It was demonstrated that the immunophenotype of the neoplastic interfollicular cells was similar to that of a subpopulation of postfollicular B cells observed outside the follicles in normal lymphoid tissue, with down-regulated expression of follicle-center activation markers such as CD10, CD38, CD80, CD86, and CD95. These cells are thought to be malignant memory B cells that have differentiated from the malignant follicle-center B cells. Thus, differentiation towards a cell with more mature phenotype should be a possible occurrence in low-grade B-cell lymphoma.

Marginal-zone lymphomas tend to have an indolent clinical course.⁴ In the current case, the patient has remained stable without

any treatment after undergoing splenectomy 35 months ago. The results presented here would provide an explanation for this: the tumor cells may have received signals from autotumor-reactive CD4⁺ T cells leading to a continuous process of differentiation that may be beneficial to the patient. As demonstrated in the current study, in-depth analysis of CD4⁺ T/malignant B-cell conjugates in CD4⁺ T/malignant B-cell cocultures should form the basis for valid evaluation of the effects of autotumor-reactive T cells on malignant B cells: induction of differentiation but also growth regulation/apoptosis. These immunologic criteria would provide a strong rationale to engage individual cellular immunotherapy with autologous CD4⁺ T cells in B-cell NHL.

Thierry Bonnefoix, Jian-Qing Mi, Pascal Perron, Mary Callanan, Cosima Semoun, Mireille Favre, Jean-Charles Renversez, Marie-France Sotto, Dominique Leroux, and Jean-Jacques Sotto

Correspondence: Thierry Bonnefoix, Groupe de Recherche sur les Lymphomes, Institut Albert Bonniot, Rond-Point de la Chantourne, 38706 La Tronche, France; e-mail: thierry.bonnefoix@ujf-grenoble.fr

Supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

References

- Shi I, Bonnefoix T, Heuzé-Le Vacon F, et al. Autotumor reactive T-cell clones among tumour-infiltrating T lymphocytes in B-cell non Hodgkin's lymphomas. *Br J Haematol*. 1995;90:837-843.
- Schultze JL, Seamon MJ, Michalak S, Gribben JG, Nadler LM. Autologous tumor-infiltrating T cells cytotoxic for follicular lymphoma cells can be expanded *in vitro*. *Blood*. 1997;89:3806-3816.
- Costello RT, Gastaut JA, Olive D. What is the real role of CD40 in cancer immunotherapy? *Immunol Today*. 1999;20:488-493.
- Berger F, Felman P, Thieblemont C, et al. Non-MALT marginal zone B-cell lymphomas: a description of clinical presentation and outcome in 124 patients. *Blood*. 2000;95:1950-1956.
- Cosles M, Magen V, Legouffe E, et al. The M15 monoclonal antibody (anti-syndecan-1) is a reliable marker for quantifying plasma cells in paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens. *Human Pathol*. 1999;30:1405-1411.
- Cerutti A, Zan H, Schaffer A, et al. CD40 ligand and appropriate cytokines induce switching to IgG, IgA, and IgE and coordinated germinal center and plasmacytoid phenotypic differentiation in a human monoclonal IgM⁺IgD⁺ B cell line. *J Immunol*. 1998;160:2145-2157.
- Choe J, Li L, Zhang X, Gregory C, Choi Y. Distinct role of follicular dendritic cells and T cells in the proliferation, differentiation, and apoptosis of a centroblast cell line, L3055. *J Immunol*. 2000;164:56-63.
- Brazel R, Sussman E, Jaffe E, Neckers L, Cossman J. Induction of immunoglobulin secretion in follicular non-Hodgkin's lymphomas: role of immunoregulatory T cells. *Blood*. 1985;66:128-134.
- Kramer M, Klün P, Wijnburg E, Ribbe W, Klün-Nelemans H. Differentiation of follicular lymphoma cells after autologous bone marrow transplantation and haematopoietic growth factor treatment. *Lancet*. 1995;345:488-490.
- Dogan A, Du M, Alejo A, et al. Follicular lymphomas contain a clonally linked but phenotypically distinct neoplastic B-cell population in the interfollicular zone. *Blood*. 1998;91:4708-4714.

Chapitre 1

Discussion :

Dans cette partie de travail, nous avons montré que les lymphocytes T CD4⁺ autologues sont capables d'induire la différenciation des cellules malignes en utilisant un modèle de lymphome B splénique de la zone marginale.

Nous avons constaté que les cellules B malignes forment des conjugués avec les cellules T CD4⁺ auto-réactives. Cette fraction de conjugués augmente au cours de la culture et devient stable à partir de J14 (5% à J7, 36% à J14, 34% à J21). Au travers de leur contact, les cellules malignes se différencient : elles perdent progressivement l'expression membranaire de l'Ig de membrane (Kappa), de CD19, CD20, et diminuent l'expression de CD40, CD24. Parallèlement, l'expression de CD38, CD138 apparaît, et la sécrétion d'IgM et de chaîne Kappa de ces cellules augmente fortement entre J15 et J21 (le surnageant de culture a été dosé par ELISA). Donc, il s'agit typiquement d'un phénotype de plasmocytes (Jego, Robillard et al. 1999). Le CD138 est connu comme un excellent marqueur plasmocytaire, le pourcentage de cellules CD138⁺ augmente constamment au cours de la co-culture (1% à J0, 4% à J7, 18% à J14 et 13% à J21), de plus, il apparaît des cellules CD138⁺ libres à J21. Tout ceci s'accorde bien avec l'apparition progressive de plasmocytes et traduit la continuité du processus de différenciation.

Nous avons ensuite identifié le réarrangement du gène IgH de ces cellules CD138⁺ par rapport aux cellules malignes initiales afin d'éliminer l'hypothèse concernant l'émergence de lymphocytes B normaux résiduels subissant une maturation plasmocytaire, bien que la probabilité de cette hypothèse soit très faible. Le résultat indique clairement que ces cellules CD138⁺ sont dérivées du même clone de cellules malignes fraîches.

Actuellement, on sait que beaucoup de facteurs de transcription s'impliquent dans la régulation du développement des plasmocytes (Klein, Tarte et al. 2003) (Shapiro-Shelef and Calame 2005). Parmi ceux-là, les plus caractéristiques sont présentés dans le tableau suivant (**Figure 14**). Il serait bien intéressant d'étudier leur rôle dans notre modèle.

Table 1 | **Expression patterns of the main transcriptional regulators in late B-cell development**

Transcription factor	Resting naive B cell	Proliferating activated B cell	Proliferating germinal-centre B cell	Proliferating plasmablast	Short-lived plasma cell	Long-lived plasma cell	References
MITF	+ ^a	-	ND	-	-	-	38
PAX5	+	+	+	-	-	-	33,131
BCL-6 [†]	-	-	+	-	-	-	51,58,61,131
MTA3	-	-	+	-	-	-	47
BACH2 [§]	ND	ND	+	-	-	-	48
IRF4	-	+	-	+	+	+	57,131
BLIMP1	-	-	-	+	+	+	27,131
XBP1	-	-	-	+	+	+	56,131

^aAs terminal differentiation progresses, the levels of transcription factors that are important for B-cell functions decrease, whereas those that are important for plasma-cell functions increase. Minus and plus signs are not quantitative. [†]Although mRNA that encodes B-cell lymphoma 6 (BCL-6) is present in naive B cells, high levels of BCL-6 protein are found only at the germinal-centre stage. [§]BACH2 (BTB and CNC homology 1, basic leucine-zipper transcription factor 2) is expressed by follicular B cells, and BACH2^{-/-} mice are deficient in mature B cells; however, the relative expression levels of BACH2 in naive, activated and germinal-centre B cells are not clear. So, for BACH2, two B-cell stages are labelled ND (not determined). BLIMP1, B-lymphocyte-induced maturation protein 1; IRF4, Interferon-regulatory factor 4; MITF, microphthalmia-associated transcription factor; MTA3, metastasis-associated 1 family, member 3; PAX5, paired box protein 5; XBP1, X-box-binding protein 1.

Figure 14 Expression des principaux facteurs de transcription concernés dans la régulation du développement terminal des lymphocytes B. D'après (Shapiro-Shelef and Calame 2005).

La méthode immunomagnétique de purification positive est utilisée pour récupérer ces cellules CD138⁺. C'est une étape délicate, parce que la pureté est satisfaisante, en revanche, la mortalité est aussi importante. Donc, d'autres méthodes de purification seraient envisagées, si nous voulons conforter la nature plasmocytaire de ces cellules par une étude cytologique, une étude de leur capacité de sécrétion d'Ig. Par exemple, des tris des cellules CD138⁺ par cytométrie en flux pourraient être testés.

Actuellement, nous n'avons pas encore identifié les couples de molécules T-B potentiellement impliquées dans l'induction du signal de différenciation de ces cellules malignes, ainsi que dans la formation des conjuguées et dans la prolifération des cellules T. Des couples des molécules de costimulation seront des candidats d'intérêt, tels que CD80-CD86/CD28-CD152, CD40/CD154, ICOSL/ICOS, CD153/CD30, OX40L/OX40, CD27/CD70 (Acuto and Michel 2003). La fonction des molécules d'adhésion comme CD2/CD48-CD59, ICAM-1/LFA-1 qui participent à la synapse immunologique sera également à évaluer (Huppa and Davis 2003).

Il est évident que l'effet inducteur de différenciation médié par les cellules T CD4+ nécessite une combinaison de messages membranaires et cytokiniques, cependant on ne sait pas si ce signal provient d'un seul clone T CD4+ ou de plusieurs clones T différents. Il serait intéressant de faire des tris par cytométrie en flux-trieur des cellules conjuguées pour obtenir des clones T appropriés.

Dans la stimulation de la prolifération et de la différenciation terminale des lymphocytes B normaux, la cytokine IL-6 possède une action très importante en synergie avec l'IL-2 (Splawski, McAnally et al. 1990) (Jego, Bataille et al. 2001). Cerutti et Al. ont démontré dans une lignée de lymphome de Burkitt, que les cellules malignes franchissent successivement tous les stades de maturation équivalents à des cellules B normales du follicule lymphoïde (centroblastes, centrocytes, cellules B mémoires) et qu'elles vont jusqu'à se différencier en plasmocytes sécréteurs d'Ig avec réalisation d'une commutation isotypique. L'ensemble de cette maturation a été réalisée sous l'influence de signaux recombinant (IL-4, IL-6, IL-10, CD40L) théoriquement produits par le microenvironnement lymphoïde T CD4+ (Banchereau, Bazan et al. 1994), parmi lesquels l'effet de l'IL-6 est non négligeable (Cerutti, Zan et al. 1998). Kramer et Al. ont mené une étude clinico-biologique d'un patient atteint d'un lymphome B folliculaire, chez lequel le clone malin a progressivement évolué vers une transformation de type plasmocytaire, accompagnée d'une élévation du taux de l'IL-6 sérique (Kramer, Kluin et al. 1995). Cependant, l'expression de la chaîne alpha du récepteur de l'IL-6 (CD126) est constamment négative, aussi bien au niveau des cellules B malignes libres que des cellules B formant conjuguées, ce qui suggère que la différenciation en plasmocytes ne fait pas intervenir l'IL-6 dans notre modèle. Dans la littérature, une différenciation en plasmocytes en absence de l'IL-6 pourrait être justifiée par certains travaux (Merville, Dechanet et al. 1995). Donc l'identification des autres cytokines intervenantes tel que l'IL3, l'IL10 pourrait être envisagée.

Le lymphome splénique de la zone marginale fait partie des LMNH de faible grade de malignité avec une survie à 5 ans estimée à 65-78%. Son traitement n'est pas encore clairement codifié : la splénectomie est proposée comme première ligne du traitement, puis l'utilisation d'une chimiothérapie pourrait être proposée, bien que celle-ci reste toujours contestée (Franco, Florena et al. 2003). Notre patient a eu une splénectomie en juillet 1998 deux mois après le diagnostic sans avoir bénéficié une chimiothérapie. Actuellement, il présente un bon état général après une survie de 7 ans, mais possède toujours un clone malin

circulant. Notre travail in vitro pourrait apporter une explication de cette situation : les cellules B malignes peuvent se différencier en cellules plasmocytaires sous le signal des lymphocytes T CD4+ anti-tumeur auto-réactives. Il serait intéressant de rechercher des cellules CD138+Kappa+ venant du sang périphérique du patient et d'identifier leur réarrangement du gène IgH par rapport aux cellules malignes initiales.

Cette première partie de thèse rapporte pour la première fois dans la littérature la capacité des cellules B tumorales à progresser dans les étapes de maturations dans un système cellulaire autologue. Il serait pertinent de confronter ce résultat dans les autres cas cliniques similaires.

Chapitre 2

Génération et caractérisation des clones T CD4⁺ cytotoxiques développés par rapport à une lignée de lymphome B folliculaire autologue

Chapitre 2

Introduction

Dans un cas de lymphome splénique de la zone marginale, nous avons montré que les cellules T CD4⁺ réactives sont capables d'induire la différenciation des cellules B tumorales autologues. Mis à part le prélèvement pathologique après la splénectomie, le matériel tumoral accessible venant des ganglions des patients atteints de lymphome est toujours très limité, d'autre part il est très difficile d'établir des lignées dans le cas des lymphomes.

Nous avons réussi à établir une lignée continue de lymphome B folliculaire (M-CH1) selon une méthodologie originale développée au laboratoire : à partir d'un patient atteint d'un lymphome B folliculaire exprimant en surface une IgA, Lambda, un fragment de biopsie ganglionnaire a été implanté sur souris SCID (Severe Combined Immune Deficiency). Après prise de la greffe tumorale et 4 passages in vivo, la tumeur se développant chez l'animal a été récupérée, dissociée, et 6 mois de culture cellulaire ont été nécessaires pour établir la lignée. Les cellules de la lignée possèdent la translocation (14;18) (q32; q21) et expriment un ensemble de marqueurs caractéristiques d'un lymphome folliculaire : CD45⁺, CD19⁺, CD20⁺, CD10⁺ (faible), CD5⁻. Les molécules de co-stimulation CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) sont fortement exprimées. Le réarrangement du gène IgA des cellules de la lignée M-CH1 est identique aux cellules B malignes fraîches. Etant donnée que ces cellules sont infectées par le virus EBV, nous avons aussi développé une lignée lymphoblastoïde EBV autologue (N-CH1) comme témoin normal. Nous disposons également des lymphocytes normaux provenant du sang périphérique du même patient. Donc, les propriétés effectrices des cellules T CD4⁺ peuvent être étudiées par rapport aux cellules malignes issue d'une lignée d'un lymphome B de bas grade de malignité dans ce modèle cellulaire autologue.

Les lymphocytes T CD4⁺ totaux venant de PBL ont été obtenus par purification négative (méthode immuno-magnétique). Ensuite, nous avons amplifié ces cellules en culture en présence de cellules de la lignée M-CH1 irradiées et de l'IL-2. Ces cellules T CD4⁺ réactives sont capables d'exercer une forte activité cytotoxique envers les cellules malignes autologues, mais aussi envers les cellules B lymphoblastoïdes normales autologues, avec un niveau de cytotoxicité comparable. Cette réactivité cytotoxique nous oblige à nous poser la question de la spécificité de ces cellules T. Deux hypothèses sont possibles :

1) Toutes les cellules T CD4⁺ reconnaissent une structure commune aux cellules malignes et lymphoblastoïdes, susceptible de déclencher une cytotoxicité (Les antigènes codés par le virus EBV sont des candidats probables).

2) Il existe au sein de la population T CD4⁺ deux catégories cellulaires : une population de lymphocytes T spécifiques des cellules malignes M-CH1, reconnaissant l'antigène tumoral ; une autre population de lymphocytes T non spécifiques, reconnaissant à la fois les cellules lymphoblastoïdes EBV (N-CH1) et les cellules malignes (M-CH1) via l'expression d'antigènes codés par le virus EBV.

Afin d'identifier l'une de ces deux hypothèses, le clonage de la population T CD4⁺ totale, suivi du criblage des clones est devenu nécessaire. Nous avons pu obtenir 6 clones (clone 40.1, 5.1, 10.4, 10.3, 10.6 et 40.2) par dilution limite, et leur monoclonalité a été confirmée par PCR pour la détection du réarrangement du gène γ du TCR. Nous arrivons à distinguer **deux catégories de clones** au travers de test de prolifération et de cytotoxicité cellulaire. Les clones 10.3, 10.6 et 40.2 peuvent proliférer sous la stimulation des cellules malignes (M-CH1) ou des cellules normales (N-CH1). Cependant, les clones 40.1, 5.1 et 10.4 prolifèrent exclusivement en présence des cellules M-CH1. L'évaluation de la cytotoxicité de ces clones montre une spécificité similaire : les clones 40.1, 5.1 et 10.4 montrent une cytotoxicité restreinte uniquement aux cellules M-CH1, par contre, les clones 10.3, 10.6 et 40.2 exercent une cytotoxicité envers les cellules M-CH1 ou N-CH1 avec une même intensité. Notre travail est focalisé sur ces clones spécifiques vis-à-vis des cellules malignes M-CH1, leur caractérisation au niveau TCR, leurs mécanismes de reconnaissance et de cytotoxicité envers les cellules malignes.

Chapitre 2

Résultats et Discussion

TITLE: Cytotoxic CD4⁺ T clones as effector cells in B cell non-Hodgkin lymphomas

AUTHORS: Jian-Qing Mi^{1,2}, Olivier Manches^{1,3}, Jin Wang², Pascal Perron¹, Nicolas Pasqual⁴, Patrice N. Marche⁴, Jean-Charles Renversez⁵, Jean-Claude Bensa^{1,3}, Jean-Jacques Sotto^{1,2}, Dominique Leroux¹ & Thierry Bonnefoix¹

RUNNING TITLE: CD4⁺ CTL in B-cell lymphoma

AFFILIATIONS:

1. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm E353, Lymphoma Research Group « Molecular bases of tumor progression »), Institut A. Bonniot, Université Joseph Fourier, La Tronche, France.
2. Département de Cancérologie et d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire Michallon, Grenoble, France.
3. Laboratoires Immunocytologie and HLA, Département d'Immunologie Cellulaire, Etablissement Français du Sang, Site de Grenoble, France.
4. Laboratoire d'Immunochimie, Commissariat à l'Energie Atomique, Inserm U 548, Université Joseph Fourier, Grenoble, France.
5. Département de Biologie Intégrée, Centre Hospitalier Universitaire Michallon, Grenoble, France

Financial Support: Supported by grants from Inserm, Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC N°4391), Association pour la Recherche sur les Affections Malignes en Immunologie Sanguine and Région Rhône-Alpes. Molecular identification of the TCR was in part supported by the ImmunID Technologies program.

Email: Jian-Qing.Mi@ujf-grenoble.fr
Or

JMi@chu-grenoble.fr

Address for correspondence:

Jian-Qing Mi, M.D.,
Département de Cancérologie et d'Hématologie
Centre Hospitalier Universitaire Michallon
38043, Grenoble
France

Or

Thierry Bonnefoix, M.D. and PH.D.,
Inserm E353
Institut Albert Bonniot, UJF
38700, La Tronche
France

Phone: +33-(0)4-76-54-94-68

Fax: +33-(0)4-76-54-94-13

Abstract

Immunotherapy against cancer aims at generating cytotoxic cells capable of eradicating tumor cells. Elimination of tumor cells is usually thought to require CD8⁺ T cells, CD4⁺ T cells being pivotal for induction and maintenance of antitumor immunity. The multifunctional role of CD4⁺ cells has been often demonstrated, nevertheless there is little data documenting a direct cytotoxic role of anti-tumor CD4⁺ cells, especially in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. We here describe a method for cloning autologous CD4⁺ cells without mitogenic stimulation or allogeneic feeder cells. Three CD4⁺ cytotoxic tumor-specific clones were generated from peripheral blood lymphocytes of a patient with follicular lymphoma. These clones are capable of killing the autologous MHC-I deficient lymphoma cell line, through a classical MHC-II restricted perforin-mediated pathway, but do not lyse the EBV-infected autologous normal B lymphocytes or K562 cells. All tumor-specific CD4⁺ clones are TCR Vβ17-Dβ1-Jβ1.2 and exhibit an identical CDR3. This suggests the immunodominance of a single peptide antigen presented by tumor cells. Adoptive transfer of in vitro expanded and selected anti-tumor T cells is a promising approach, as demonstrated recently for melanoma patients. Activating CD4⁺ cytotoxic cells may be an immunotherapeutic strategy in case of tumor escape to CD8-mediated responses.

Introduction

Immunotherapy against cancer aims at generating cytotoxic cells capable of eradicating tumor cells. Elimination of tumor cells is thought to require CD8⁺ T cells, based on experiments examining adoptive transfer of activated CD8⁺ or CD4⁺ T cells into tumor bearing hosts, where only CD8⁺ T cells can mediate protection against tumor implantation. However, the role of CD4⁺ T cells in anti-tumor immunity has been highlighted in recent studies(1-6), indicating that CD4⁺ T cells play a role in priming CD8⁺ T cells, likely through the provision of T-cell help, or through “post-licensing” mechanisms, like facilitation of CD8⁺ localization to the tumor site, or maintenance of lytic potential of CD8⁺ T cells. Alternatively, CD4⁺-mediated recruitment of eosinophils can contribute to tumor elimination(7).

A more direct role of CD4⁺ T lymphocytes on tumor cells has also been sporadically documented in mice using both in vitro or in vivo systems(8, 9). In one study, the allogeneic CD4⁺ clones are capable of inducing in vitro growth of human follicular cell lymphoma(10). In another setting, anti-lymphoma CD4⁺ T cells can activate autologous tumor B cells, but subsequently drive them into a non-proliferative, G1-arrested stage(11). We previously described that tumor infiltrating CD4⁺ T cells form conjugations with lymphoma cells and induce their terminal differentiation into plasma cells(12).

Some reports also documented a cytotoxic ability of CD4⁺ T cells in the setting of viral diseases(13-16). Such a role of CD4⁺ T cells in tumors has been much less investigated(17, 18). In view of the frequent immune escape mechanisms used by tumors(19), and especially the loss of MHC-I molecules and defects in endogenous antigen processing capabilities, the cytotoxicity exerted by CD4⁺ T cells could circumvent the loss of recognition of tumor cells by CD8⁺ T cells. However, to our knowledge, there is very little data documenting a cytotoxic role of anti-tumor CD4⁺ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphomas (NHL).

We describe here the generation of human tumor-specific TCR Vβ17⁺, CD4⁺ T cell clones, capable of killing the autologous MHC-I deficient B-cell NHL through a classical MHC-II restricted antigen recognition, perforin-mediated process. Generation and adoptive transfer of cytotoxic anti-tumor CD4⁺ T cell clones may represent a new strategy complementing conventional immunotherapy.

Materials and methods:

Cell lines

The malignant CH1 cell line (M-CH1 line) was established onto SCID mice by xenograft of cells derived from the lymph node biopsy of a 41-year-old patient (CH1) diagnosed with grade IV follicular B lymphoma. After four passages in vivo, the M-CH1 line was then established in vitro in RPMI 1640 with 15% fetal calf serum (FCS). Molecular analysis of the original patient B-cell tumor and M-CH1 cell line confirmed that the immunoglobulin (Ig) gene rearrangement regions were identical. Monoclonal surface Ig were alpha heavy and lambda light chains. The expression of HLA-I molecules (as well as that of β 2-microglobulin) is negative in the M-CH1 line but was weakly positive in the patient primary malignant B cells, as measured by flow cytometry. Deletion of the genes coding for HLA-DR and HLA-DQ is observed in the M-CH1 line, whereas the HLA-DPB1*0401/0401 gene is detected, as estimated by specific PCR amplification. The viral charge of M-CH1 line is positive for Epstein-Barr virus (EBV) but negative for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), cytomegalovirus (CMV) and herpes simplex virus type 1 and 2 (HSV-1 and HSV-2), as estimated by real-time PCR analysis. As a control for experimental studies, normal B lymphocytes from the same patient were established as a stable cell line in vitro through EBV immortalization (N-CH1 line). K562 cell line is cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS.

Isolation of autologous CD4⁺ PBL T-cells

Peripheral blood lymphocytes (PBL) from the patient were obtained by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. An immunomagnetic purification of the cells recovered was performed to obtain a pure population of CD4⁺ T-lymphocytes. The cell suspension was incubated with anti-CD19, CD20, CD14, CD16, CD56, TCR $\gamma\delta$ and CD8 mAbs (Beckman-Coulter, Marseille, France). The cells were then washed and incubated with goat anti-mouse Ig conjugated to magnetic beads (M-450, Dynal, Oslo, Norway). Magnetic depletion of bead-bound cells resulted in 96% pure CD4⁺ T cells as determined by flow cytometry.

Cloning of CD4⁺ PBL and in vitro culture

3×10^5 CD4⁺ PBL cells were incubated with 1×10^5 irradiated (120 Gy) autologous malignant CH1 cells (M-CH1) in RPMI 1640 supplemented with

10% human AB serum and r-IL-2 at 10 ng/ml (EuroCetus, Amsterdam, The Netherlands) in 24-well plates (Falcon, Becton-Dickinson, Pont de Claix, France). The cells were expanded and maintained by weekly restimulation with irradiated M-CH1 cells. After two months, proliferating CD4⁺ T cells were isolated by limiting dilution at 0.5, 1, 5, 10, 20, 40 cells/well in 96-well U-bottom plates (Falcon, Becton-Dickinson), and fed weekly with 3x10³ irradiated (120 Gy) autologous M-CH1 cells as stimulators without any added mitogenic stimulation or allogeneic feeder cells, in a final volume of 50 µl. Microcultures with a probability of monoclonality >90% were considered as T-cell clones(20, 21). These clones were expanded in 24-well plates by weekly feeding with irradiated M-CH1 cells. The monoclonality was confirmed using standard protocol of DNA extraction and PCR analysis. γ -gene rearrangements were detected using two primers specific for the TCR γ chain gene(22). After confirmation, T-cell clones were expanded and maintained as described for CD4⁺ PBL.

Flow cytometric analysis and antibodies

Expression of cell surface molecules was measured by direct labeling using standard methodology. The antibodies used were fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD45, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD4, anti-CD8, anti-TCR $\alpha\beta$, anti-V β 17, anti-V β 13.1, anti-CD14, anti-CD16 (Beckman-Coulter), anti-HLA-I (W6/32, Leinco, St Louis), anti- β 2-microglobulin (BD PharMingen, San Diego), anti-TNF- α (R&D Systems, Lille, France), anti-CD178 (Ansell Corporation, Bayport) and phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD4, anti-CD161, anti-CD94, anti-CD57, anti-CD56 (Beckman-Coulter), anti-TRAIL (BD PharMingen) and phycoerythrin 5 (PC5)-conjugated anti-CD3, anti-CD19, anti-TCR $\gamma\delta$ (Beckman-Coulter), anti-CXCR3 and anti-CCR4 (BD Biosciences, San Diego), anti-CRTH2 (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) and fluorochrome-conjugated isotype control antibodies. Anti-DR4 and anti-DR5 antibodies were purchased from Alexis Biochemicals (Coger S.A., Paris, France), and secondary PE-coupled polyclonal goat anti-mouse antibody from Beckman Coulter. Analysis of the TCR V β repertoire was done with the IOTest® Beta Mark kit purchased from Beckman Coulter. Intracellular staining was performed according to the protocol recommended by BD PharMingen. The intracytoplasmic antibodies used were FITC-coupled anti-Granzyme A, PE-coupled anti-Perforin, and isotype controls (BD PharMingen). Samples were analyzed on a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Description of TCR repertoire clonality by multiplex PCR assay analysis and sequencing

DNA preparation: DNA from three T cell clones (5.1, 10.4 and 40.1) were extracted using High Pure PCR Template Preparation Kit according to the Roche Diagnostic protocol (Meylan, France). 50 ng of DNA were used for each reaction, the quality of DNA samples was normalized by amplification of the HPRT housekeeping gene. TCR gene rearrangement detection was done twice by multiplex PCR, to allow a rapid and exhaustive screening of V-D-J rearrangement, and was processed as previously described(23). Reactions were carried out on genomic DNA using a V β 17 upstream primer in conjunction with the respective J β downstream primers(24). The V β 17-DJ β 1.2 rearrangements of clones 5.1, 10.4 and 40.1 were sequenced after a second round PCR amplification using internal V β 17 primer. Comparison with germ line sequences of V, D, J was done by the mean of IMGT/GeneInfo database(25), and amino acid numbering was done according to IMGT(26) (<http://www.imgt.cines.fr>).

Proliferation assays

4×10^4 T cells were incubated with 2×10^4 irradiated autologous M-CH1 (120 Gy) or N-CH1 (30 Gy) cells in quadruplicate in 96-well U-bottom plates. Proliferation was assessed by incorporation of tritiated thymidine during the last 18 hours of culture. After 6 days, cells were harvested onto fiber filters and tritiated thymidine was measured using a beta counter.

Cytotoxicity assays and inhibition studies

Cytotoxicity assays were performed according to a standard ^{51}Cr -release method as previously described(27, 28). Briefly, 1×10^4 ^{51}Cr -labeled target cells were mixed with effector cells at different E/T ratios (40/1 to 0.01/1) in quadruplicate, using 96-well V-bottomed microtiter plates (Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark). After 4 hours of culture, radioactivity in the supernatants was counted. The percentage of specific lysis was calculated according to the following standard formula: % lysis = $100 \times (\text{ER} - \text{SR}) / (\text{MR} - \text{SR})$, where ER, SR, MR represented experimental, spontaneous, and maximum ^{51}Cr -release, respectively.

Blocking of cytotoxicity was assayed by preincubating either effector cells or target cells with blocking reagents for 2 hours. Blocking reagents for effector cells were as follows: anti-CD4 (clone 13B.8.2), anti-CD8 (clone B9.11), anti-TCR- $\alpha\beta$ (clone BMA 031) and anti-TCR- $\gamma\delta$ antibodies (clone Immu 510) from Beckman-Coulter, anti-Fas-L Ab (clone NOK-2, BD

PharMingen), anti-TRAIL/TNFSF10 polyclonal Ab (ref. AF375, R&D Systems), anti-TNF- α polyclonal Ab (ref. AF-210-NA, R&D Systems), concanamycin A (CMA), ethyleneglycotetraacetic acid (EGTA) with MgCl₂ and brefeldin A (BFA) from Sigma, St Louis. For target cells, blocking antibodies were as follows: anti-HLA class I (clone W6/32, Diaclone SAS, Besançon, France), anti-HLA-DR (clone G46-6, BD PharMingen), anti-HLA-DQ (clone SPVL3, Beckman-Coulter), carefully dialyzed anti-HLA-DP (clone B7/21, BD PharMingen), anti-Fas (clone ZB4, Beckman-Coulter). Azide-free IgG1 and IgG2a (Diaclone, Sas) were utilized as isotopic controls.

Intracellular cytokine assays

Intracellular staining was performed with protocols similar to those described by Sun et al(15). Briefly, cloned T cells (0.5×10^6 T cells) were incubated with stimulating cells (1×10^6 M-CH1 cells) in 1 ml of RPMI and 10% human serum at 37°C. Cells were incubated for 6 hours in presence of Brefeldin A at 10 μ g/ml. After culture, EDTA was added to a final concentration of 2.5 mM for 15 minutes at room temperature, treated with FACS™ Lysing Solution (BD PharMingen) for 10 minutes, washed, and incubated with FACS™ Permeabilizing Solution (BD PharMingen) for 10 minutes. Cells were washed and stained for 30 minutes with a combination of the following antibodies: IFN- γ -FITC, IL-4-PE, or IL-10-PE, CD19-PC5, CD4-allophycocyanin (APC) (BD PharMingen). Four-color flow cytometry phenotyping of cells was performed on a FACScalibur flow cytometer.

Results

Proliferation and cytotoxicity of CD4⁺ T cell clones against autologous malignant CH1 and normal CH1 lines

Six clones were obtained by limiting dilution from CD4⁺ PBL stimulated by the malignant MHC-I deficient CH1 cell line. Monoclonality was confirmed by PCR analysis of TCR γ -chain gene rearrangement (data not shown) and subsequently by PCR analysis of TCR β V-D-J rearrangement (see below). Proliferations of polyclonal CD4⁺ T cells purified from PBL (CD4⁺ PBL) and the six clones were measured by incorporation of tritiated thymidine in presence of irradiated autologous malignant CH1 cells (M-CH1) or EBV-infected normal B lymphocyte line (N-CH1) after a six-day culture period (Figure 1A, 1B). Polyclonal CD4⁺ PBL T cells proliferated in response to both autologous M-CH1 and N-CH1 lines, with the same order of magnitude. By contrast, among the six clones, three (number 40.1, 5.1 and 10.4) proliferated exclusively in response to the M-CH1 cells, whereas the three other clones (number 10.3, 10.6 and 40.2) responded to both M-CH1 and N-CH1 cells.

The polyclonal CD4⁺ PBL and the six clones were then tested for cytotoxicity against M-CH1, N-CH1 and K562 lines. Clones 5.1, 40.1 and 10.4 lysed only M-CH1 but not N-CH1 cells. In contrast, clones 10.3, 10.6 and 40.2 killed both M-CH1 and N-CH1 cells as did polyclonal CD4⁺ PBL. All clones were unable to demonstrate any cytotoxicity against K562 cells (Figure 2).

These results indicate that clones 5.1, 40.1 and 10.4 are tumor-specific. Therefore, these clones were further characterized for their surface phenotype, TCRV β repertoire, mechanisms of cytotoxicity against malignant CH1 cells and cytokine production.

The tumor-specific CD4⁺ T-cell clones (5.1, 10.4 and 40.1) are TCRV β 17-D β 1-J β 1.2 and exhibit a common TCR V-D-J sequence and an identical CDR3

All six clones were CD3⁺, CD4⁺, CD8⁻, TCR $\alpha\beta$ ⁺, TCR $\gamma\delta$ ⁻ (data not shown). FACS analysis of the V β chain of the T-cell antigen receptor showed that the three tumor-specific clones (5.1, 10.4 and 40.1) expressed V β 17 chain. In contrast, the three non specific clones (10.3, 10.6 and 40.2) expressed V β 13.1 chain (Figure 3A).

Since the tumor-specific CD4⁺ T-cell clones expressed V β 17 chain and did not express CD161, CD16, CD57 nor CD94 (data not shown), it could be concluded that they did not belong to the NKT cell family(29, 30). The clone

10.4 expressed a constitutive high level of CD56, whereas the clones 5.1 and 40.1 were CD56 positive only upon stimulation by the M-CH1 line (data not shown).

To improve molecular characterization of these TCRV β 17⁺ cells, we regarded their V-D-J association. V β 17 rearrangements were screened for all functional J β segments by PCR analysis. This analysis showed a unique V β 17-J β 1.2 rearrangement among the 13 V-J β possible associations for the three tumor-specific clones (Fig 3B). Furthermore, nucleotide sequence analysis of the rearrangement region revealed an identical CDR3 for each T cell clone. In detail, this β chain was encoded by the V β 17 gene and part of the D β 1 and the J β 1.2 genes (Fig 3c). Comparisons with the germ line sequences showed that in the course of the recombination event, on the one hand nucleotides from V β 17, D β 1 and J β 1.2 were deleted and on the other hand nucleotides were inserted between genes by template independent N additions. These features are commonly found in rearrangements of adult T cells. Translation indicates a 13 amino acids CDR3 which contains three charged residues, namely Q at position 111, E 113 and N 114 at a location which may correspond to the tip of the predicted loop. Furthermore, a large aromatic residue namely W is present at position 109. All these residues may contribute to the interactions with the antigen – MHC class II complex. Taken together, these data precisely characterize the TCR β chain involved in the antigen recognition and indicate that the three clones derive from a common original lymphocyte.

Specific CD4⁺ T cell clones lyse M-CH1 cells through a classical MHC class II-restricted pathway

The ability of the three specific clones (5.1, 10.4 and 40.1) to recognize M-CH1 cells was investigated using blocking antibodies against MHC-I and MHC-II molecules. Lysis of M-CH1 cells was significantly inhibited by addition of the B7/21 antibody directed against HLA-DP molecules for each clone. Antibodies directed against HLA-DR and HLA-DQ were used as controls, because M-CH1 cells are HLA-DR and HLA-DQ negative, and did not induce any decrease of the cytotoxicity. Moreover, addition of the anti-MHC-I monoclonal antibody W6/32 had no effect (Figure 4A). The specific cytotoxicity was also completely blocked by anti-CD3, CD4 and TCR $\alpha\beta$ antibodies, but not by antibodies against CD8 and TCR $\gamma\delta$ (Figure 4B).

These results demonstrate that the TCR of the tumor-specific CD4⁺ T-cell clones recognize tumor antigens through the HLA-DP restricted pathway.

Mechanisms of cytotoxicity mediated by tumor-specific CD4⁺ T-cell clones against M-CH1 line

M-CH1 cells expressed Fas (CD95) and the TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Receptor 2/ Death Receptor 5 (TRAIL-R2/ DR5), and weak levels of TRAIL-R1/ DR4 (Figure 5A). All three tumor-specific clones (40.1, 5.1 and 10.4) expressed TRAIL but not Fas-L (CD178) nor TNF- α (Figure 5B). In separate experiments, M-CH1 cells were found to be resistant to apoptosis induced by soluble TRAIL, as well as by soluble Fas-L (data not shown). Moreover, addition of blocking antibodies against TNF- α , TRAIL, Fas-L (Figure 6A) or against Fas (Figure 6B) in the cytotoxicity assay did not inhibit lysis of M-CH1 cells by any of the CD4⁺ T cell clones. Cytotoxicity did not appear to be mediated by a soluble cytokine, as transfer of supernatants from mixed cultures of CD4⁺ T-cell clones and irradiated M-CH1 cells to a fresh M-CH1 line did not confer lytic activity (data not shown).

The perforin-based cytolytic pathway can be blocked by concanamycin A (CMA) or EGTA(31, 32), whereas the other pathways can be inhibited by Brefeldin A (BFA)(33, 34). Incubation with concanamycin A, which is a specific inhibitor of vacuolar type H⁺-ATPase, inhibits perforin and granzyme-mediated cytotoxicity by an increase in the pH of lytic granules(31). CMA inhibited almost completely the killing of autologous M-CH1 cells by the specific CD4⁺ clones. The same degree of inhibition was observed in presence of EGTA. In contrast, exposure of these clones to brefeldin A, which selectively inhibits Fas-ligand and other TNF- α family molecule-mediated cytotoxicity by preventing progression of newly synthesized proteins through the Golgi apparatus(34), did not block the ability of the clones to lyse M-CH1 cells at all (Figure 6C). Finally, immunophenotypic studies clearly indicated that the three clones expressed high levels of intracellular perforine and granzyme A (Figure 6D).

Therefore, the specific CD4⁺ T cell clones lysed M-CH1 cells preferentially, if not exclusively, through release of perforin / granzyme, although we could not exclude that granulysin, expressed by some CD4 CTL(15, 35), or membrane lymphotoxin(36) participated in M-CH1 cells lysis.

Cytokine production profile in the three specific CD4⁺ T-cell clones upon stimulation by M-CH1 cells

All three clones expressed CXCR3(37), but they expressed neither CCR4(37) nor CRTH2(38) (Figure 7A). Interestingly, by staining intracellular cytokines upon stimulation by M-CH1 cells, we showed that each clone, although expressing the same TCR and generated by the same methodology and culture condition, displayed different cytokine profiles (Figure 7B). Clone 10.4

secreted IFN- γ (at least 83% of stimulated cells), little IL-10 (9%) and little IL4 (18%). Stimulation of clone 5.1 predominantly induced secretion of IFN- γ (at least 61% of cells) and IL-4 (35%), but almost no IL-10 (4%), with 33% of cells secreting both IFN- γ and IL-4. Stimulation of clone 40.1 induced secretion of IL-10 (40% of cells), with 26% secreting IFN γ and 10% secreting IL-4. Unstimulated cells were unable to secrete any cytokine. These results, confirmed by several experiments, were constant.

Discussion

We describe here the generation of CD4⁺ T cell clones capable of specifically lysing cells from an autologous MHC-I deficient, NHL B-cell line. These CD4⁺ cells are not NKT cells, and lysis is specific to a tumor antigen, presented by HLA-II DP molecules. Lysis is most likely mediated through a classical perforin-mediated pathway.

Anti-tumor CD4⁺ T cells are thought to be involved in numerous key mechanisms of anti-tumor immunotherapy, such as providing help for CD8⁺ T cells when they are primed by dendritic cells, influencing the type of immune response by secretion of cytokines, and even “conditioning” the tumor environment for increased invasiveness by CD8⁺ T cells(1-3, 6). Here, we demonstrate that, in the absence of MHC-I expression by tumor cells, we could generate three cytotoxic CD4⁺ T cell clones that can lyse tumor cells in an HLA-DP restricted fashion by a classical perforin-mediated pathway. This mechanism of lysis may be particularly relevant to allogeneic bone marrow transplantation, as graft-versus-tumor activity may depend on perforin-mediated lysis, whereas graft-versus-host disease may be mediated through Fas-induced apoptosis(39). Additionally, as non-Hodgkin B-cell lymphomas are generally resistant to Fas-mediated cytotoxicity(28, 40), perforin lysis by the CD4⁺ clones underlines its potential importance in an immunotherapeutic setting.

CD4⁺ T cells can kill sensitive target cells through Fas-L(18, 41, 42) or TRAIL(9), but perforin-mediated cytotoxicity of target cells has also been observed in T cell lines(43) as well as directly ex vivo(44), most often in chronic infectious diseases. Tumor cells growing in situ, which represent situations of chronic antigen exposure, may allow differentiation of cytotoxic CD4⁺ T cells. Inclusion of CD4⁺ epitopes in tumor immunization protocols should considerably increase their clinical efficacy(45), although the cytotoxic potential of anti-tumor CD4⁺ T cells has often been overlooked. In vivo data from mouse models demonstrated that in the absence of conventional effectors, i.e. CD8⁺ T, B and NK cells, CD4⁺ T cells alone can inhibit growth of implanted tumors, and kill tumor cells upon contact in vitro(46, 47). Another putative role of CD4⁺ T cells in vivo would be the secretion of IFN γ and other cytokines involved in the subsequent destruction of tumor vasculature(48, 49). The three tumor-specific CD4⁺ T cell clones generated in our study are capable of killing the fresh tumor CH1 line but not EBV-infected autologous B cells, the tumor antigen recognized by the CD4⁺ clones may therefore be a valuable target for CD4-mediated tumor eradication in vivo.

All three specific clones with a direct cytotoxic role against tumor cells secrete mostly IFN γ and express CXCR3, a chemokine receptor preferentially expressed by Th1 cells(37), and express neither CCR4(37) nor CRTH2(38), thus displaying a Th1-like phenotype. Interestingly, although each clone express an

identical TCR, and was generated and stimulated in the same way, cytokine secretion analysis indicated different secretion profiles. Although intraclonal heterogeneity in cytokine secretion is a well-known phenomenon(50), the mechanism(s) responsible for this heterogeneity is unknown. This may be due to an artificial drift during the prolonged culture, although Th cells have been shown to display a stable phenotype in a stable environment and once they are committed to a secreting pattern(51). Alternatively, cytokine loci in each clone may display different level of expression due to some chromatin-dependant variegation effects(51, 52), which could have been acquired in early divisions, as postulated in the stochastic model of cytokine gene regulation(52, 53). These chromatin modifications may confer a unique profile of responsiveness to the same stimulus on them.

We used a method for cloning autologous CD4⁺ T cells, different from the one we used previously(11, 54, 55). In the present study, CD4⁺ T cells purified from PBL were only stimulated by irradiated autologous malignant CH1 cells and a low dose of IL-2. Usual methodologies rely on repetitive stimulation with mitogens (like phytohaemagglutinin) and allogeneic feeder cells. It has been suggested that repetitive stimulation of high affinity T cells, and in particular high affinity anti-tumor T cells, may lead to their deletion by Activation-Induced Cell Death(56). Therefore, stimulation by strong non-specific T cell stimulators may not guarantee survival of high affinity anti-tumor T cells. Although the affinity of our clones for their antigen has not been determined, it is possible that the less stringent stimulation described here may have allowed their long-term survival.

The nature of the antigen recognized by the three specific CD4⁺ clones is not determined, but the fact that the independently cloned CD4⁺ cells have the same clonal origin (as demonstrated by molecular studies of TCR gene rearrangement) argues for the immunodominance of a single peptide antigen presented by M-CH1 cells, at least in the context of HLA-DP4 restricted responses. Before cloning culture, after two months of PBL expansion in vitro, only two dominant TCR V β chains could be detected, i.e. V β 17 (20% of T cells -data not shown) and V β 13.1 (76% - data not shown), indicating that the dominance of these specificities in T cell clones is not a fortuitous phenomenon due to the low cloning efficiency.

In the murine system, it has been shown previously that in the absence of CD8⁺ T cells, allogeneic mixed lymphocyte cultures generate CD4⁺ T cells mediating perforin-mediated cytotoxicity against B-lymphoma cell lines, whereas they are not detectable when CD8⁺ T cells are present during the coculture(57). Similarly, β 2-microglobulin deficient mice display increased frequencies of cytotoxic CD4⁺ T cells(58). It is conceivable that such a cytotoxic activity by anti-tumor CD4⁺ T cells can be generated in case of functional deficiency of anti-tumor CD8⁺ T cells, or upon MHC-I loss by tumor cells, as exemplified in our in vitro human model.

Adoptive transfer of in vitro expanded and selected anti-tumor T cells is a promising strategy, as demonstrated recently for melanoma patients with metastatic tumors(59-61). In these studies, tumor-specific T cells were expanded in vitro and high-avidity lines were selected for adoptive transfer. The percentage of CD4+ T cells in the injected cells was variable, but may have contributed to the persistence and functionality of CD8+ T cells. Our study further suggests that using cytotoxic specific CD4+ T cells may further increase the efficacy of adoptive transfer or immunization strategies, especially in case of tumor escape to CD8+-mediated lysis.

Acknowledgments

We would like to thank Drs Samira Fafi-Kremer and Jean-Marie Seigneurin for detection of viral charge in the M-CH1 and N-CH1 lines. We also thank Drs Marie-Christine Jacob, Pierre Ray and Evelyne Jouvin-Marche for helpful discussions.

1. Ossendorp, F., Toes, R.E., Offringa, R., van der Burg, S.H., and Melief, C.J. 2000. Importance of CD4(+) T helper cell responses in tumor immunity. *Immunol Lett* 74:75-79.
2. Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D., and Levitsky, H. 1998. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* 188:2357-2368.
3. Pardoll, D.M., and Topalian, S.L. 1998. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol* 10:588-594.
4. Houghton, A.N., Gold, J.S., and Blachere, N.E. 2001. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Curr Opin Immunol* 13:134-140.
5. Wang, R.F. 2001. The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity. *Trends Immunol* 22:269-276.
6. Marzo, A.L., Kinnear, B.F., Lake, R.A., Frelinger, J.J., Collins, E.J., Robinson, B.W., and Scott, B. 2000. Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol* 165:6047-6055.
7. Mattes, J., Hulett, M., Xie, W., Hogan, S., Rothenberg, M.E., Foster, P., and Parish, C. 2003. Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells: an eotaxin and STAT6-dependent process. *J Exp Med* 197:387-393.
8. Aruga, E., Tanigawa, K., Aruga, A., Arai, H., Smith, J.W., 2nd, Nickoloff, B.J., Nabel, G.J., and Chang, A.E. 2000. CD95-mediated tumor recognition by CD4+ effector cells in a murine mammary model. *J Immunother* 23:225-234.
9. Wang, S., Boonman, Z.F., Li, H.C., He, Y., Jager, M.J., Toes, R.E., and Niederkorn, J.Y. 2003. Role of TRAIL and IFN-gamma in CD4+ T cell-dependent tumor rejection in the anterior chamber of the eye. *J Immunol* 171:2789-2796.
10. Umetsu, D.T., Esserman, L., Donlon, T.A., DeKruyff, R.H., and Levy, R. 1990. Induction of proliferation of human follicular (B type) lymphoma cells by cognate interaction with CD4+ T cell clones. *J Immunol* 144:2550-2557.
11. Martin, I., Bonnefoix, T., Roucard, C., Perron, P., Lajmanovich, A., Moine, A., Leroux, D., Sotto, J.J., and Garban, F. 1999. Role of autologous CD4+ T cell clones in human B non-Hodgkin's lymphoma: aborted activation and G1 blockade induced by cell-cell contact. *Eur J Immunol* 29:3188-3195.
12. Bonnefoix, T., Mi, J.Q., Perron, P., Callanan, M., Semoun, C., Favre, M., Renversez, J.C., Sotto, M.F., Leroux, D., and Sotto, J.J. 2002. Terminal plasmacytoid differentiation of malignant B cells induced by autotumor-reactive CD4(+) T cells in one case of splenic marginal zone B-cell lymphoma. *Blood* 99:388-391.
13. Miskovsky, E.P., Liu, A.Y., Pavlat, W., Viveen, R., Stanhope, P.E., Finzi, D., Fox, W.M., 3rd, Hruban, R.H., Podack, E.R., and Siliciano, R.F. 1994. Studies of the mechanism of cytolysis by HIV-1-specific CD4+ human CTL clones induced by candidate AIDS vaccines. *J Immunol* 153:2787-2799.
14. Bouhdoud, L., Villain, P., Merzouki, A., Arella, M., and Couture, C. 2000. T-cell receptor-mediated anergy of a human immunodeficiency virus (HIV) gp120-specific CD4(+) cytotoxic T-cell clone, induced by a natural HIV type 1 variant peptide. *J Virol* 74:2121-2130.
15. Sun, Q., Burton, R.L., and Lucas, K.G. 2002. Cytokine production and cytolytic mechanism of CD4(+) cytotoxic T lymphocytes in ex vivo expanded therapeutic Epstein-Barr virus-specific T-cell cultures. *Blood* 99:3302-3309.
16. Nikiforow, S., Bottomly, K., Miller, G., and Munz, C. 2003. Cytolytic CD4(+)-T-cell clones reactive to EBNA1 inhibit Epstein-Barr virus-induced B-cell proliferation. *J Virol* 77:12088-12104.

17. Ohminami, H., Yasukawa, M., Kaneko, S., Yakushijin, Y., Abe, Y., Kasahara, Y., Ishida, Y., and Fujita, S. 1999. Fas-independent and nonapoptotic cytotoxicity mediated by a human CD4(+) T-cell clone directed against an acute myelogenous leukemia-associated DEK-CAN fusion peptide. *Blood* 93:925-935.
18. Schultz, E.S., Schuler-Thurner, B., Stroobant, V., Jenne, L., Berger, T.G., Thielemanns, K., van der Bruggen, P., and Schuler, G. 2004. Functional analysis of tumor-specific Th cell responses detected in melanoma patients after dendritic cell-based immunotherapy. *J Immunol* 172:1304-1310.
19. Khong, H.T., and Restifo, N.P. 2002. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 3:999-1005.
20. Bonnefoix, T., and Sotto, J.J. 1994. The standard chi 2 test used in limiting dilution assays is insufficient for estimating the goodness-of-fit to the single-hit Poisson model. *J Immunol Methods* 167:21-33.
21. Bonnefoix, T., Bonnefoix, P., Callanan, M., Verdiel, P., and Sotto, J.J. 2001. Graphical representation of a generalized linear model-based statistical test estimating the fit of the single-hit Poisson model to limiting dilution assays. *J Immunol* 167:5725-5730.
22. Theodorou, I., Bigorgne, C., Delfau, M.H., Lahet, C., Cochet, G., Vidaud, M., Raphael, M., Gaulard, P., and Farcet, J.P. 1996. VJ rearrangements of the TCR gamma locus in peripheral T-cell lymphomas: analysis by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J Pathol* 178:303-310.
23. Pasqual, N., Gallagher, M., Aude-Garcia, C., Loiodice, M., Thuderoz, F., Demongeot, J., Ceredig, R., Marche, P.N., and Jouvin-Marche, E. 2002. Quantitative and qualitative changes in V-J alpha rearrangements during mouse thymocytes differentiation: implication for a limited T cell receptor alpha chain repertoire. *J Exp Med* 196:1163-1173.
24. Puisieux, I., Even, J., Pannetier, C., Jotereau, F., Favrot, M., and Kourilsky, P. 1994. Oligoclonality of tumor-infiltrating lymphocytes from human melanomas. *J Immunol* 153:2807-2818.
25. Baum, T.P., Pasqual, N., Thuderoz, F., Hierle, V., Chaume, D., Lefranc, M.P., Jouvin-Marche, E., Marche, P.N., and Demongeot, J. 2004. IMGT/GeneInfo: enhancing V(D)J recombination database accessibility. *Nucleic Acids Res* 32 Database issue:D51-54.
26. Lefranc, M.P. 2003. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res* 31:307-310.
27. Plumas, J., Chaperot, L., Jacob, M.C., Molens, J.P., Giroux, C., Sotto, J.J., and Bensa, J.C. 1995. Malignant B lymphocytes from non-Hodgkin's lymphoma induce allogeneic proliferative and cytotoxic T cell responses in primary mixed lymphocyte cultures: an important role of co-stimulatory molecules CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) in stimulation by tumor cells. *Eur J Immunol* 25:3332-3341.
28. Plumas, J., Jacob, M.C., Chaperot, L., Molens, J.P., Sotto, J.J., and Bensa, J.C. 1998. Tumor B cells from non-Hodgkin's lymphoma are resistant to CD95 (Fas/Apo-1)-mediated apoptosis. *Blood* 91:2875-2885.
29. Godfrey, D.I., Hammond, K.J., Poulton, L.D., Smyth, M.J., and Baxter, A.G. 2000. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 21:573-583.
30. Godfrey, D.I., MacDonald, H.R., Kronenberg, M., Smyth, M.J., and Van Kaer, L. 2004. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* 4:231-237.
31. Kataoka, T., Shinohara, N., Takayama, H., Takaku, K., Kondo, S., Yonehara, S., and Nagai, K. 1996. Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation

of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 156:3678-3686.

32. Esser, M.T., Haverstick, D.M., Fuller, C.L., Gullo, C.A., and Braciale, V.L. 1998. Ca²⁺ signaling modulates cytolytic T lymphocyte effector functions. *J Exp Med* 187:1057-1067.
33. Pelham, H.R. 1991. Multiple targets for brefeldin A. *Cell* 67:449-451.
34. Li, J.H., Rosen, D., Ronen, D., Behrens, C.K., Krammer, P.H., Clark, W.R., and Berke, G. 1998. The regulation of CD95 ligand expression and function in CTL. *J Immunol* 161:3943-3949.
35. Ochoa, M.T., Stenger, S., Sieling, P.A., Thoma-Uszynski, S., Sabet, S., Cho, S., Krensky, A.M., Rollinghoff, M., Nunes Sarno, E., Burdick, A.E., et al. 2001. T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. *Nat Med* 7:174-179.
36. Yasukawa, M., Yakushijin, Y., Hasegawa, H., Miyake, M., Hitsumoto, Y., Kimura, S., Takeuchi, N., and Fujita, S. 1993. Expression of perforin and membrane-bound lymphotoxin (tumor necrosis factor-beta) in virus-specific CD4⁺ human cytotoxic T-cell clones. *Blood* 81:1527-1534.
37. Sallusto, F., Mackay, C.R., and Lanzavecchia, A. 2000. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 18:593-620.
38. Nagata, K., Tanaka, K., Ogawa, K., Kemmotsu, K., Imai, T., Yoshie, O., Abe, H., Tada, K., Nakamura, M., Sugamura, K., et al. 1999. Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo. *J Immunol* 162:1278-1286.
39. Schmaltz, C., Alpdogan, O., Horndasch, K.J., Muriglan, S.J., Kappel, B.J., Teshima, T., Ferrara, J.L., Burakoff, S.J., and van den Brink, M.R. 2001. Differential use of Fas ligand and perforin cytotoxic pathways by donor T cells in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect. *Blood* 97:2886-2895.
40. Lajmanovich, A., Irisarri, M., Molens, J.P., Pasquier, M.A., Sotto, J.J., Bensa, J.C., Leroux, D., and Plumas, J. 2004. Impairment of death-inducing signalling complex formation in CD95-resistant human primary lymphoma B cells. *Br J Haematol* 124:746-753.
41. Ju, S.T., Cui, H., Panka, D.J., Ettinger, R., and Marshak-Rothstein, A. 1994. Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4⁺ Th1 and CD8⁺ cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4185-4189.
42. Rathmell, J.C., Cooke, M.P., Ho, W.Y., Grein, J., Townsend, S.E., Davis, M.M., and Goodnow, C.C. 1995. CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4⁺ T cells. *Nature* 376:181-184.
43. Yanai, F., Ishii, E., Kojima, K., Hasegawa, A., Azuma, T., Hirose, S., Suga, N., Mitsudome, A., Zaitzu, M., Ishida, Y., et al. 2003. Essential roles of perforin in antigen-specific cytotoxicity mediated by human CD4⁺ T lymphocytes: analysis using the combination of hereditary perforin-deficient effector cells and Fas-deficient target cells. *J Immunol* 170:2205-2213.
44. Appay, V., Zaunders, J.J., Papagno, L., Sutton, J., Jaramillo, A., Waters, A., Easterbrook, P., Grey, P., Smith, D., McMichael, A.J., et al. 2002. Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *J Immunol* 168:5954-5958.
45. Gilboa, E. 2004. The promise of cancer vaccines. *Nat Rev Cancer* 4:401-411.
46. Lundin, K.U., Hofgaard, P.O., Omholt, H., Munthe, L.A., Corthay, A., and Bogen, B. 2003. Therapeutic effect of idiotype-specific CD4⁺ T cells against B-cell lymphoma in the absence of anti-idiotypic antibodies. *Blood* 102:605-612.
47. Flynn, S., and Stockinger, B. 2003. Tumor and CD4 T-cell interactions: tumor escape as result of reciprocal inactivation. *Blood* 101:4472-4478.

48. Mumberg, D., Monach, P.A., Wanderling, S., Philip, M., Toledano, A.Y., Schreiber, R.D., and Schreiber, H. 1999. CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8633-8638.
49. Qin, Z., and Blankenstein, T. 2000. CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity* 12:677-686.
50. Bucy, R.P., Panoskaltis-Mortari, A., Huang, G.Q., Li, J., Karr, L., Ross, M., Russell, J.H., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. 1994. Heterogeneity of single cell cytokine gene expression in clonal T cell populations. *J Exp Med* 180:1251-1262.
51. Messi, M., Giacchetto, I., Nagata, K., Lanzavecchia, A., Natoli, G., and Sallusto, F. 2003. Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. *Nat Immunol* 4:78-86.
52. Bird, J.J., Brown, D.R., Mullen, A.C., Moskowitz, N.H., Mahowald, M.A., Sider, J.R., Gajewski, T.F., Wang, C.R., and Reiner, S.L. 1998. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* 9:229-237.
53. Murphy, K.M., and Reiner, S.L. 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2:933-944.
54. Claret, E., Praloran, V., Zheng, X., Bonnefoix, T., Sotto, M.F., Renversez, J.C., Piccinni, M.P., Berrada, L., and Sotto, J.J. 1992. Accumulation of T-cell clones producing high levels of both granulocyte-macrophage and macrophage colony-stimulating factors (CSF-1) in lymph nodes involved by Hodgkin's disease. *Leukemia* 6:820-827.
55. Shi, I., Bonnefoix, T., Heuze-Le Vacon, F., Jacob, M.C., Leroux, D., Gressin, R., Sotto, M.F., Chaffanjon, P., Bensa, J.C., and Sotto, J.J. 1995. Autotumour reactive T-cell clones among tumour-infiltrating T lymphocytes in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Br J Haematol* 90:837-843.
56. Gilboa, E. 1999. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity* 11:263-270.
57. Williams, N.S., and Engelhard, V.H. 1996. Identification of a population of CD4+ CTL that utilizes a perforin- rather than a Fas ligand-dependent cytotoxic mechanism. *J Immunol* 156:153-159.
58. Marusic-Galesic, S., Udaka, K., and Walden, P. 1993. Increased number of cytotoxic T cells within CD4+8- T cells in beta 2-microglobulin, major histocompatibility complex class I-deficient mice. *Eur J Immunol* 23:3115-3119.
59. Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Robbins, P.F., Yang, J.C., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Sherry, R., Restifo, N.P., Hubicki, A.M., et al. 2002. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298:850-854.
60. Yee, C., Thompson, J.A., Byrd, D., Riddell, S.R., Roche, P., Celis, E., and Greenberg, P.D. 2002. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16168-16173.
61. Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Yang, J.C., Sherry, R.M., Topalian, S.L., Restifo, N.P., Royal, R.E., Kammula, U., White, D.E., Mavroukakis, S.A., et al. 2005. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 23:2346-2357.

Figure legends

Figure 1. Proliferative responses of CD4⁺ PBL and CD4⁺ clones induced by irradiated autologous M-CH1 and N-CH1 cells

(A) CD4⁺ PBL, clones 40.1 and 5.1.

(B) Clones 10.4, 10.3, 10.6 and 40.2.

Clone 40.1, 5.1 and 10.4 proliferated only in response to M-CH1 line. In contrast, clones 10.3, 10.6 and 40.2 responded to M-CH1 and N-CH1 cells as did CD4⁺ PBL.

Figure 2. Cytotoxicity of CD4⁺ PBL and six CD4⁺ clones against M-CH1, N-CH1 and K562 lines

Clones 40.1, 5.1 and 10.4 lysed specifically M-CH1 cells. In contrast, clones 40.2, 10.6 and 10.3 killed both M-CH1 and N-CH1 lines as did CD4⁺ PBL. CD4⁺ PBL and all clones did not lyse K562 cells.

Figure 3. All three tumor-specific CD4⁺ clones expressed the same TCR β chain

- (A) The tumor-specific clones 5.1, 10.4 and 40.1 expressed V β 17 chain, the non-tumor-specific clones 10.3, 10.6 and 40.2 expressed V β 13.1 chain. The representative experiments on clones 40.1 and 40.2 are shown.
- (B) Rearrangement analysis of the clones 5.1, 10.4, and 40.1 V β 17 chain by PCR assays. Each PCR (done in duplicate) supplied an amplification of V β 17 rearrangement with the respective J β 1.1 to 1.6 and J β 2.1 to 2.7 genes as indicated on the left of the panel. Each clone gave a unique PCR product, corresponding to a V β 17-J β 1.2 rearrangement.
- (C) V β 17-D β 1-J β 1.2 rearrangement of clones 10.4, 40.1 and 5.1. Nucleotide sequences of the genes in germ line configuration are indicated on the top, and clone sequences are presented below. Template independent added nucleotides are underlined, deleted nucleotides are indicated in inversed colour, dashes stand for identical nucleotides as compared to the germ line sequence obtained from IMGT/GeneInfo database(25). Translation is shown at the bottom where canonical residues delineating CDR3 are boxed in grey. Amino acid numbering was done according to IMGT(26).

Figure 4. Specific HLA class II DP-restricted cytotoxicity against M-CH1 cells by autologous tumor-specific CD4⁺ clones

- (A) The specific cytotoxicity of CD4⁺ clones was inhibited by an anti-DP antibody (B7/21), but not by anti-HLA class I, anti-HLA-DR or anti-DQ antibodies.
- (B) Cytotoxicity was blocked by anti-CD3, CD4 or TCR $\alpha\beta$ antibodies, but not by anti-CD8 or TCR $\gamma\delta$ antibodies.

E/T ratio was 20:1. Target cells (M-CH1) for (A), and effector cells (clones 40.1, 5.1 and 10.4) for (B), were pre-incubated for 30 min with antibodies. A representative experiment on clone 40.1 is shown.

Figure 5. Flow cytometry analysis of Fas, DR5, DR4 on M-CH1 cells and Fas-L, TNF- α and TRAIL on tumor-specific CD4⁺ T clones

- (A) M-CH1 cells expressed Fas, DR5 and weak levels of DR4.
 - (B) All tumor-specific CD4⁺ T clones expressed Fas-L, TNF- α and TRAIL.
- The representative experiments on clone 40.1 are demonstrated here.

The shaded area indicates the background staining with the control isotype antibody.

Figure 6. Mechanisms of specific cytotoxicity by T CD4⁺ clones against M-CH1 line

- (A) Inhibition by antibodies against Fas-L/TNF- α family molecules (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of the specific T CD4⁺ clones cytotoxicity. The clones were preincubated with anti-TNF- α , TRAIL, FAS-L antibodies for 2 hours.
- (B) Inhibition by the ZB4 neutralizing antibody to FAS with various concentrations, M-CH1 cells were preincubated with ZB4 for 1 hour.
- (C) The specific clones were incubated with brefeldin A (BFA) at 10 μM , concanamycin A (CMA) at 100 nM or 3mM EGTA/4mM MgCl_2 for 2 hours prior to the addition of target cells.
- (D) Intracellular granzyme A and perforin expressions were examined by flow cytometry analysis in all specific T clones with FITC-conjugated anti-granzyme A and PE-conjugated anti-perforin mAbs. The shaded area indicates the background staining with the control isotype antibody.

Similar results were obtained in all specific T clones. Here, the results of clone 40.1 are representative.

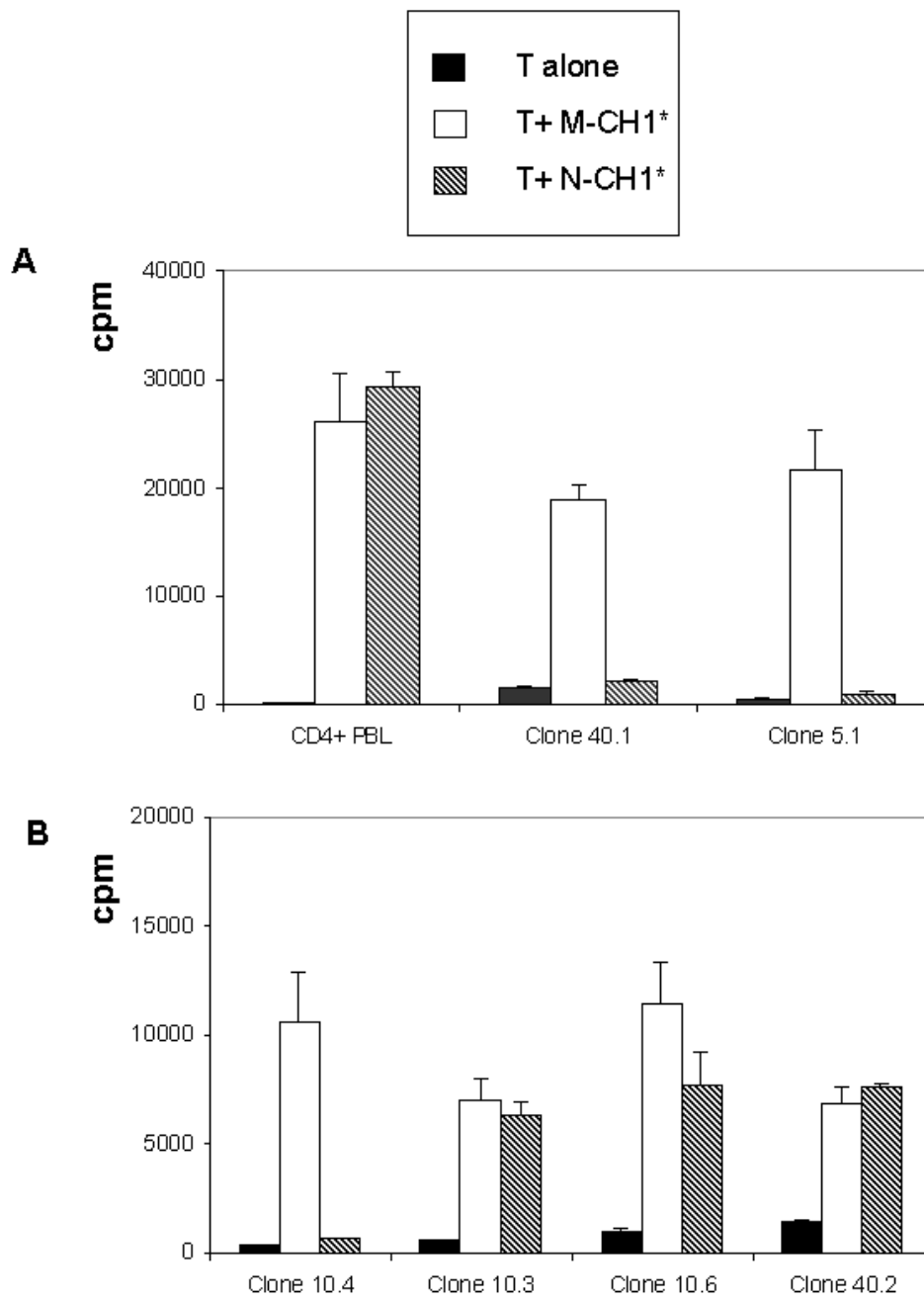
Figure 7A. Surface expression of CXCR3, CCR4 and CRTH2 by tumor-specific CD4⁺ T clones

All three clones (10.4, 5.1 and 40.1) expressed CXCR3, and they expressed neither CCR4 nor CRTH2.

Figure 7B. Cytokine expression by tumor-specific CD4⁺ T clones

Expression of IFN γ , IL-4 and IL-10 was examined by flow cytometry analysis in three tumor-specific clones (10.4, 5.1 and 40.1), after stimulation with autologous M-CH1 cells or without stimulators, for 6 hours in the presence of BFA. The dot plots show staining on gated CD4⁺ T cells. Results are representative of 3 independent experiments.

Figure 1



tel-00011308, version 1 - 6 Jan 2006

Figure 2

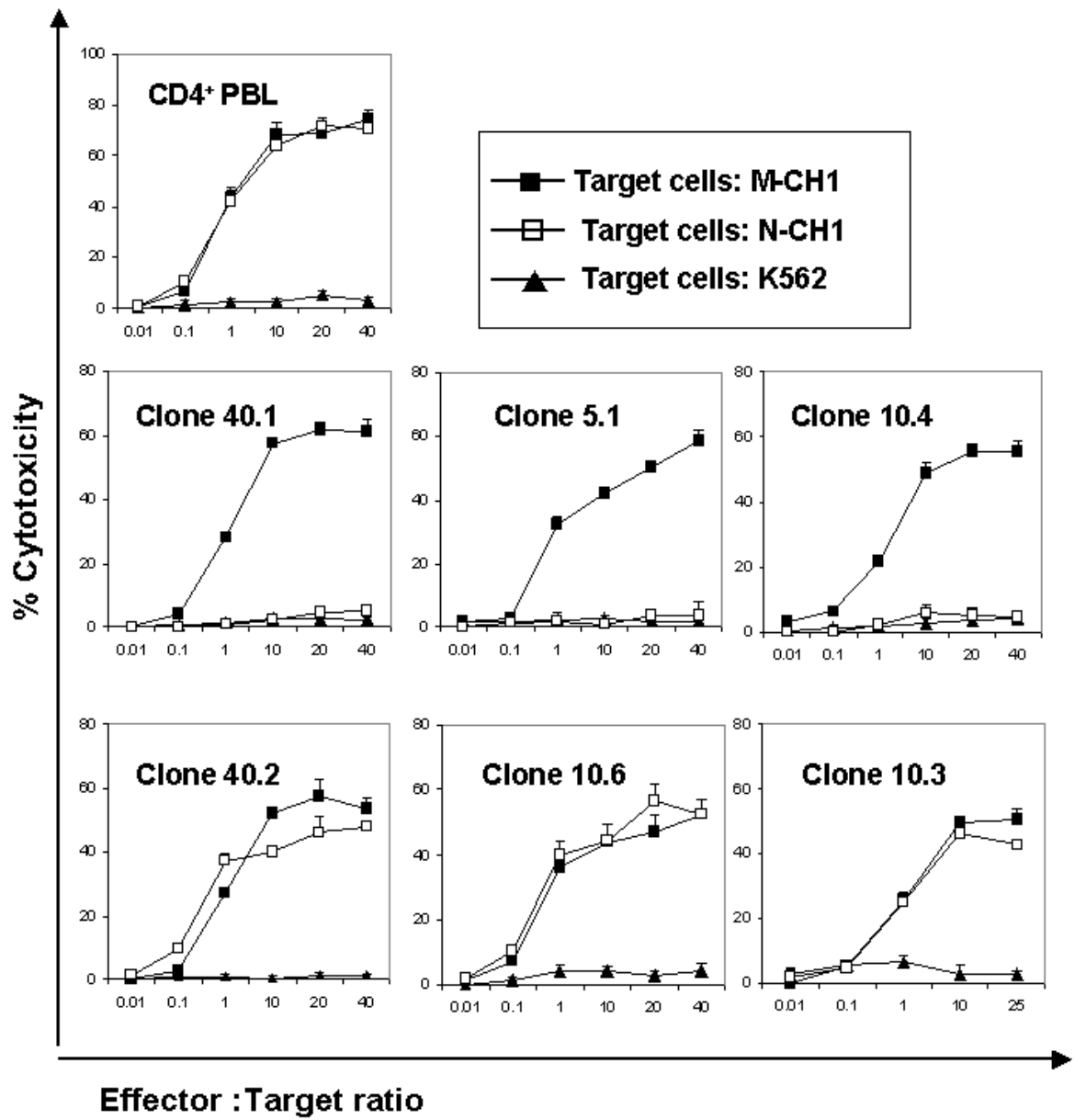


Figure 4

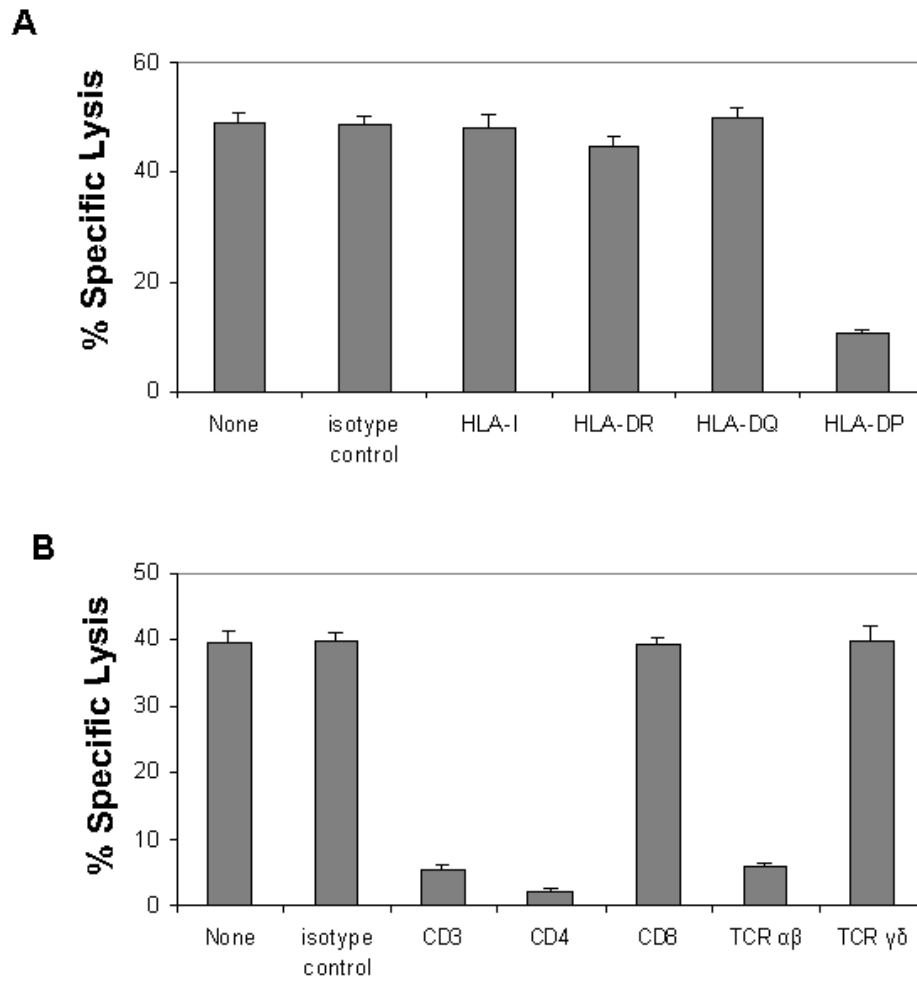
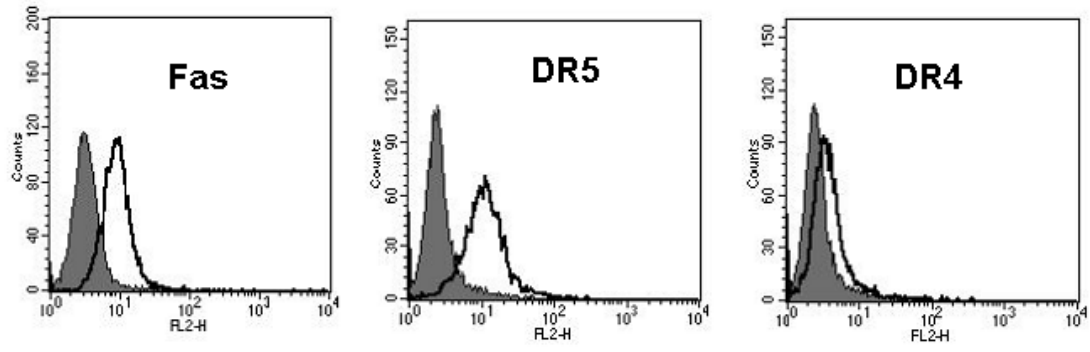


Figure 5

A M-CH1 cells



B Clone 40.1

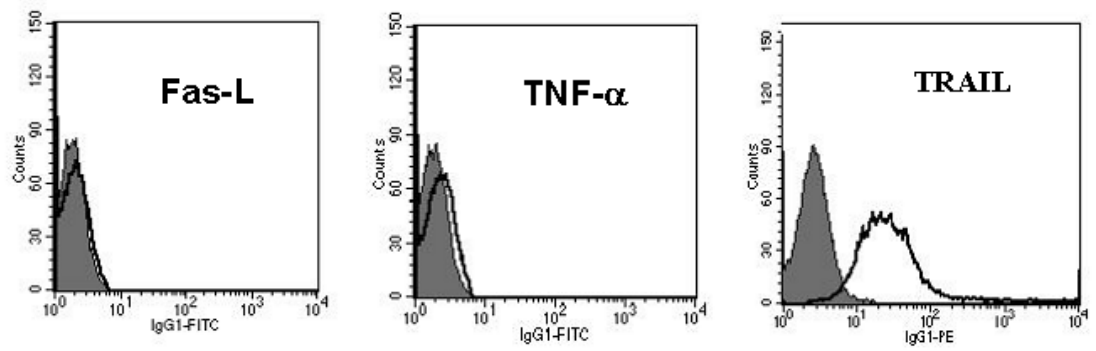


Figure 6

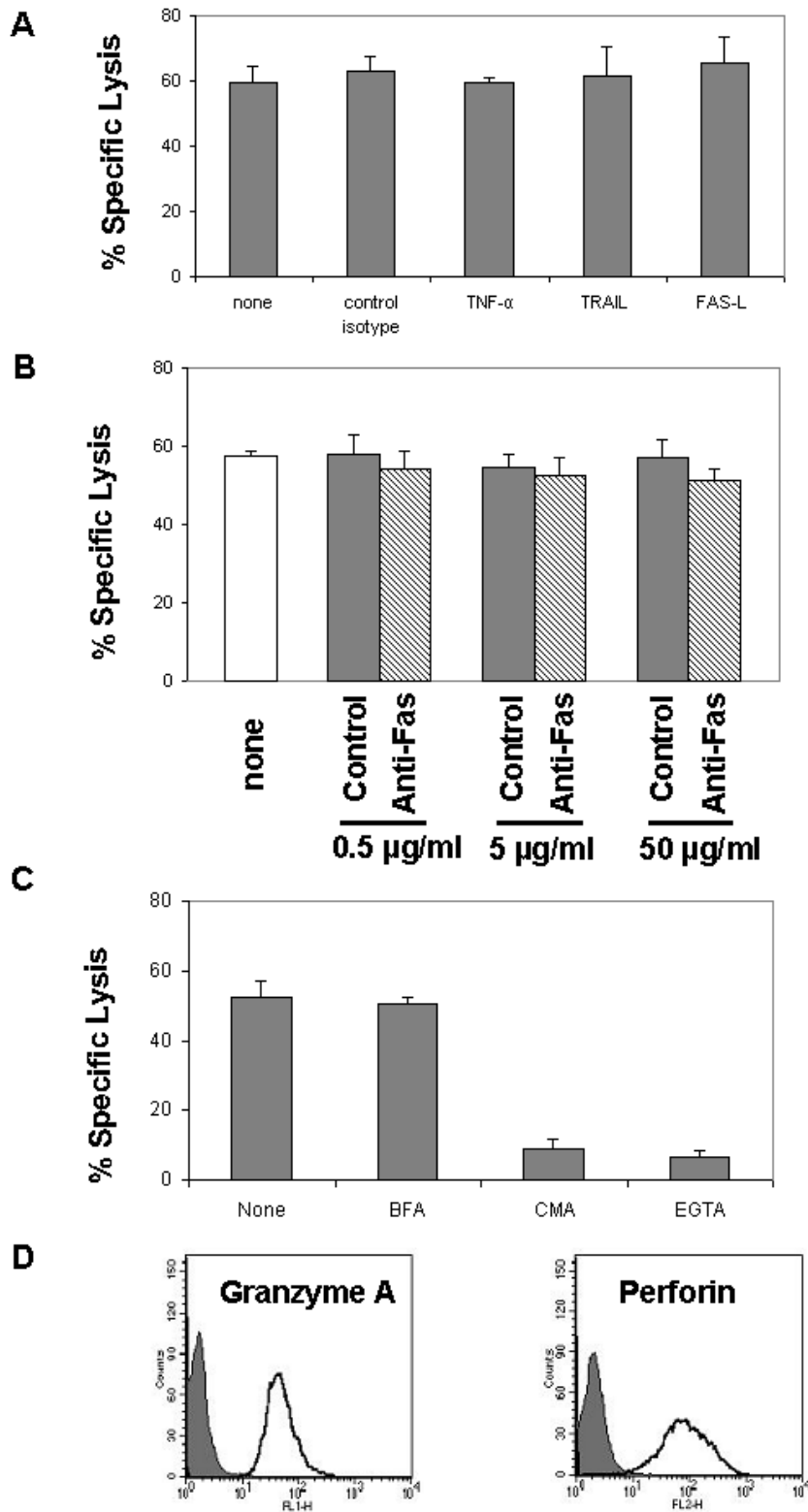


Figure 7A

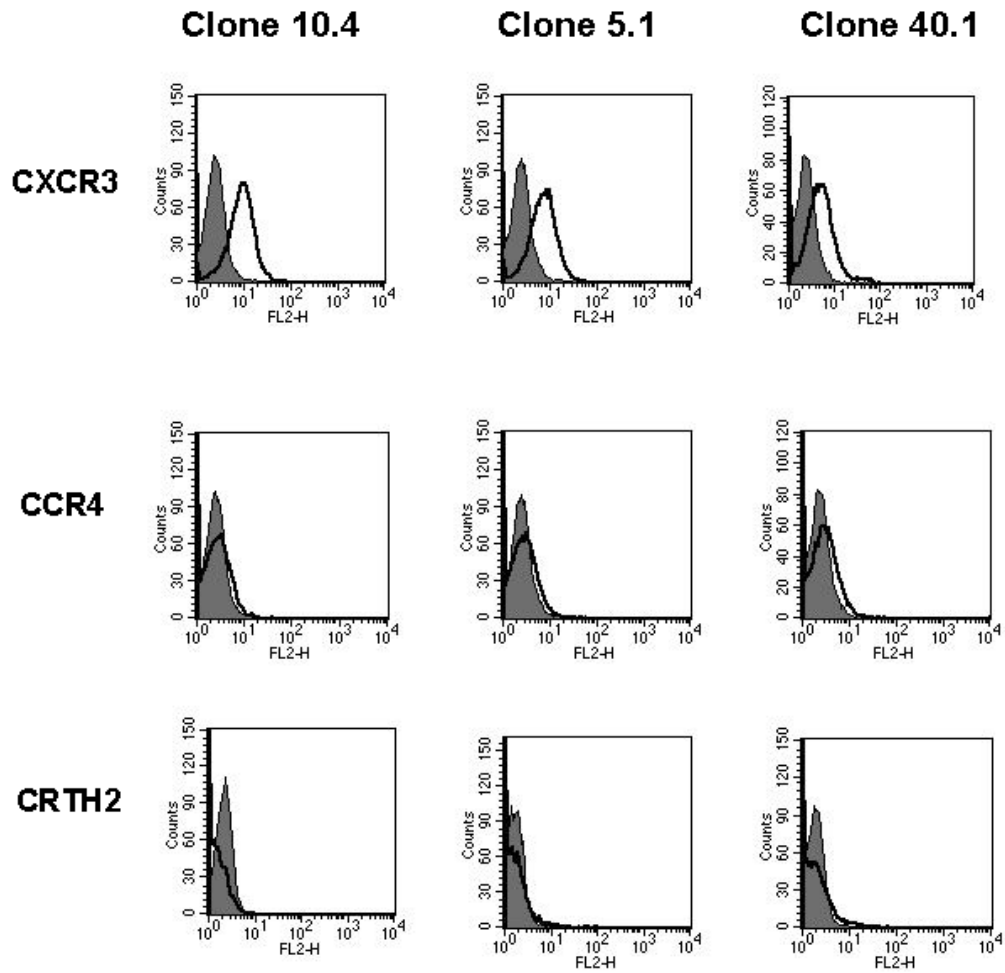
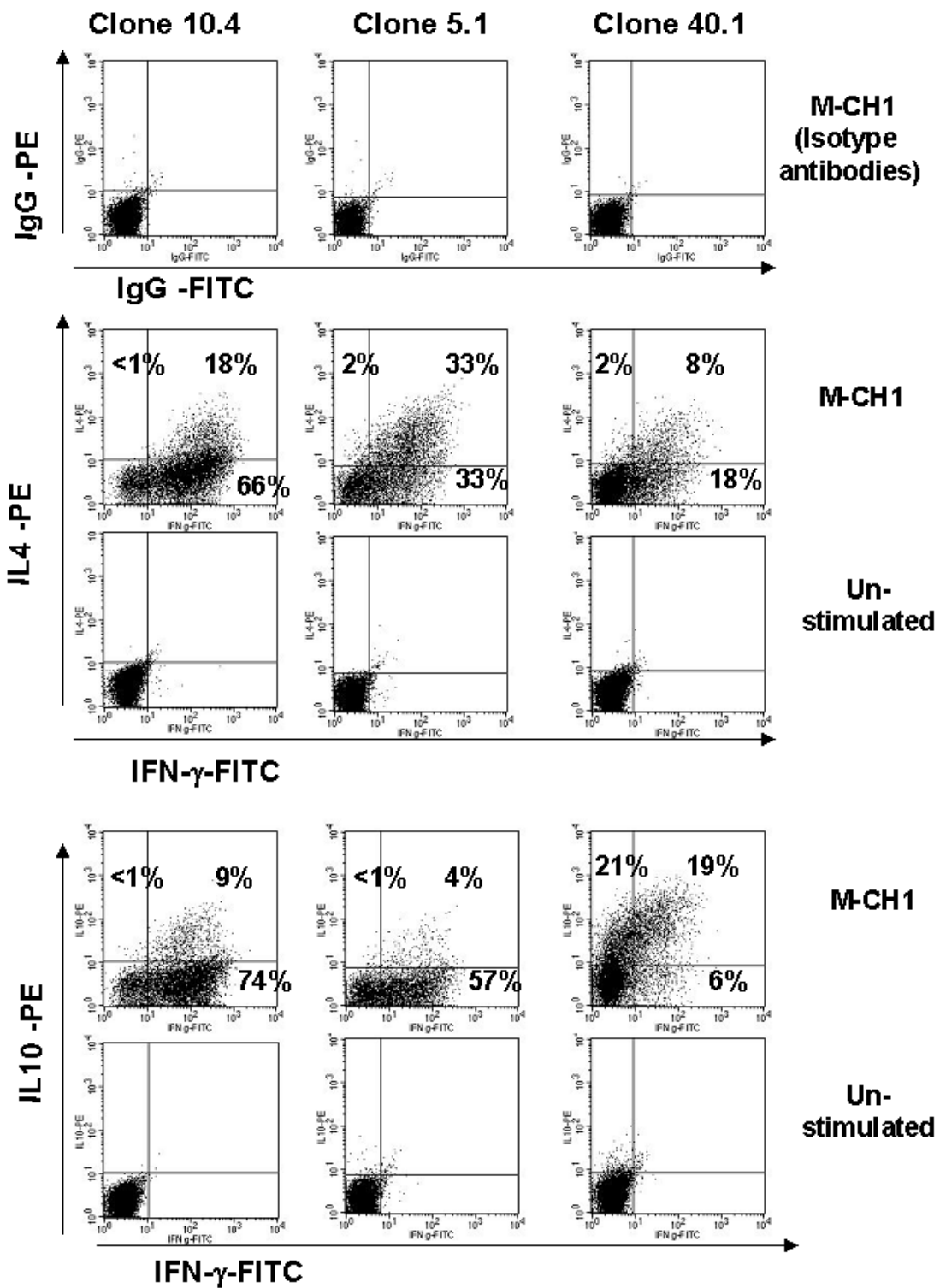


Figure 7B



Conclusions et Perspectives

Conclusions et Perspectives

Ce travail avait pour but d'étudier des capacités fonctionnelles des lymphocytes T CD4+ par rapport aux cellules B malignes. Il s'agit d'une continuité des travaux effectués précédemment dans notre laboratoire, visant à étudier l'immuogénicité des cellules tumorales de lymphome (Plumas, Chaperot et al. 1995; Plumas, Jacob et al. 1998) (Jacob, Agrawal et al. 1999) (Chaperot, Plumas et al. 1999) (Irisarri, Plumas et al. 2000) (Magniez, Roucard et al. 2004) (Lajmanovich, Irisarri et al. 2004), et à développer et caractériser des effecteurs dans cette pathologie (Shi, Bonnefoix et al. 1995) (Chaperot, Delfau-Larue et al. 1999) (Martin, Bonnefoix et al. 1999) (Chaperot, Manches et al. 2002).

Dans la première partie du travail, en utilisant un modèle de lymphome splénique de la zone marginale, nous avons pu démontrer un effet fonctionnel des lymphocytes T CD4+ réactifs par rapport aux cellules malignes B autologues : ils sont capables d'induire une différenciation des lymphocytes B tumoraux en plasmocytes, et cette induction a été dévoilée pour la première fois dans un système cellulaire autologue.

Nous avons ensuite étudié l'interaction des lymphocytes T CD4+ réactifs avec une lignée de lymphome B folliculaire autologues. Les cellules T CD4+ totales venant du sang périphérique du patient, se sont montrées cytotoxiques à la fois sur les cellules B de la lignée tumorale et de la lignée normale lymphoblastoïde autologues. Ce résultat nous a obligé à cloner les cellules T CD4+, à la recherche de clones T cytotoxiques spécifiques des cellules malignes. Trois clones spécifiques (5.1, 10.4 et 40.1) ont été obtenus, et ils possèdent un TCR identique V β 17-D β 1-J β 1.2. Ces clones exercent une cytotoxicité contre les cellules tumorales en reconnaissant l'antigène tumoral présenté par la molécule HLA-II DP et leur mécanisme de lyse correspond à la voie perforine/granzymes.

Ces deux résultats nous ont permis de conclure que l'orientation des lymphocytes B malins, vers la différenciation ou la mort, pourrait dépendre directement de la fonction des lymphocytes T CD4+ réactifs. Autrement dit, les cellules T CD4+ peuvent induire un effet direct anti-tumoral par des mécanismes variés. Ce travail donne des arguments de plus concernant le rôle pivot des lymphocytes T CD4+ dans l'immunité anti-tumorale.

Deux stratégies de l'immunothérapie spécifique pourraient être développées à partir de nos modèles.

La première concerne une immunothérapie adoptive avec la participation des lymphocytes T CD4+ spécifiques d'antigènes de tumeur. A présent, des essais cliniques basés sur le transfert adoptif de CTL chez des patients atteints de cancer se sont multipliés ces dernières années (Dudley, Wunderlich et al. 2002) (Yee, Thompson et al. 2002). Il serait intéressant de sélectionner des lymphocytes T CD4+ réactifs ayant un effet spécifique contre les cellules malignes et de les amplifier *in vitro* dans le but d'éliminer les cellules T CD4+ suppressives (Tr1 ou Treg) du pool de cellules T spécifiques. L'utilisation d'une grande quantité de ces cellules T CD4+ spécifique pourrait perfectionner les essais dans la thérapie adoptive.

La deuxième stratégie vise à trouver l'antigène tumoral pour la vaccination dans le cadre d'immunothérapie active, bien que le succès de cette vaccination chez les patients ne soit pas garanti pour le moment. Nous savons que le cas des lymphomes est particulier, puisque très peu d'antigènes tumoraux ont été découverts jusqu'à maintenant, et surtout aucun antigène partagé n'a encore été pleinement caractérisé. Nos clones T CD4+ spécifiques peuvent servir comme outil, induisant une réponse cytotoxique spécifique et permettant l'identification d'antigène tumoral. Actuellement, au moins deux approches peuvent être utilisées :

1) Une approche génétique, mise au point par l'équipe de Thierry BOON (van der Bruggen, Traversari et al. 1991), pourrait permettre de caractériser l'antigène tumoral. Dans notre modèle, nous pouvons nous servir de la lignée normale lymphoblastoïde autologue comme cellule receveuse dans laquelle une banque d'ADNc venant des cellules tumorales peut être transférée. Ces cellules transfectées par l'ADNc tumoral sont ensuite analysées pour leur capacité à induire la sécrétion de cytokines par les clones cytotoxiques spécifiques. L'ADNc induisant une activation du clone CTL peut alors être séquencé et correspond à celui qui code l'antigène tumoral.

2) Une approche biochimique, initiée par l'équipe de Craig L Slingluff Jr (Cox, Skipper et al. 1994), consiste à immunoprécipiter les molécules du CMH des cellules tumorales dans lesquelles les peptides présents sont ensuite décrochés par élution acide ; ils sont alors purifiés par chromatographie liquide haute performance. Les fractions de peptides peuvent être

analysées pour leur capacité à activer ces clones T CD4+ spécifiques. Ensuite, les peptides, qui sont réellement capables d'induire une réponse spécifique, peuvent être séquencés.

Actuellement, l'immunothérapie dans les cancers est vraiment dans une phase débutante, un grand nombre d'inconnues restent encore à déterminer avant de pouvoir améliorer de façon rationnelle l'efficacité en clinique. Dans le cadre du traitement anti-cancéreux, l'immunothérapie adoptive est-elle meilleure que l'immunothérapie active (Rosenberg, Yang et al. 2004) ? Quelle est la meilleure immunothérapie ? Ces questions se posent constamment pour les immunologistes. Cependant, il est présomptueux de répondre précipitamment avec les connaissances et les techniques qu'on possède actuellement (Slingluff and Speiser 2005). Nous aurons la réponse dans les années qui arrivent sur une base de connaissances plus solides et d'expériences plus riches.

Bibliographie

Bibliographie :

- Acuto, O. and F. Michel (2003). "CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling." *Nat Rev Immunol* **3**(12): 939-51.
- Adams, J. M. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." *Science* **281**(5381): 1322-6.
- Aggarwal, B. B. (2003). "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword." *Nat Rev Immunol* **3**(9): 745-56.
- Akashi, T., H. Oimomi, et al. (2003). "Expression and diagnostic evaluation of the human tumor-associated antigen RCAS1 in pancreatic cancer." *Pancreas* **26**(1): 49-55.
- Alas, S. and B. Bonavida (2001). "Rituximab inactivates signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3) activity in B-non-Hodgkin's lymphoma through inhibition of the interleukin 10 autocrine/paracrine loop and results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization to cytotoxic drugs." *Cancer Res* **61**(13): 5137-44.
- Alas, S., C. Emmanouilides, et al. (2001). "Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis." *Clin Cancer Res* **7**(3): 709-23.
- Alas, S., C. P. Ng, et al. (2002). "Rituximab modifies the cisplatin-mitochondrial signaling pathway, resulting in apoptosis in cisplatin-resistant non-Hodgkin's lymphoma." *Clin Cancer Res* **8**(3): 836-45.
- Albert, M. L., B. Sauter, et al. (1998). "Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs." *Nature* **392**(6671): 86-9.
- Alexandroff, A. B., A. M. Jackson, et al. (1999). "BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on." *Lancet* **353**(9165): 1689-94.
- Allison, J. P. and M. F. Krummel (1995). "The Yin and Yang of T cell costimulation." *Science* **270**(5238): 932-3.
- Alyea, E. P., H. T. Kim, et al. (2005). "Comparative outcome of nonmyeloablative and myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for patients older than 50 years of age." *Blood* **105**(4): 1810-4.
- Ambrosini, G., C. Adida, et al. (1997). "A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma." *Nat Med* **3**(8): 917-21.
- Anichini, A. (1989). "Immune response to specific human tumors." *Curr Opin Immunol* **1**(5): 917-21.
- Appelbaum, F. R. (2001). "Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy." *Nature* **411**(6835): 385-9.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." *Science* **281**(5381): 1305-8.

- Attwood, J. T. and D. H. Munn (1999). "Macrophage suppression of T cell activation: a potential mechanism of peripheral tolerance." Int Rev Immunol **18**(5-6): 515-25.
- Bacus, S. S., C. R. Zelnick, et al. (1994). "Expression of the erbB-2 family of growth factor receptors and their ligands in breast cancers. Implication for tumor biology and clinical behavior." Am J Clin Pathol **102**(4 Suppl 1): S13-24.
- Bader, P., H. Kreyenberg, et al. (2004). "Increasing mixed chimerism defines a high-risk group of childhood acute myelogenous leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation where pre-emptive immunotherapy may be effective." Bone Marrow Transplant **33**(8): 815-21.
- Bai, X. F., J. Liu, et al. (2003). "Antigenic drift as a mechanism for tumor evasion of destruction by cytolytic T lymphocytes." J Clin Invest **111**(10): 1487-96.
- Banchereau, J., F. Bazan, et al. (1994). "The CD40 antigen and its ligand." Annu Rev Immunol **12**: 881-922.
- Banchereau, J., A. K. Palucka, et al. (2001). "Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine." Cancer Res **61**(17): 6451-8.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.
- Bannerji, R., S. Kitada, et al. (2003). "Apoptotic-regulatory and complement-protecting protein expression in chronic lymphocytic leukemia: relationship to in vivo rituximab resistance." J Clin Oncol **21**(8): 1466-71.
- Barnes, D. W., M. J. Corp, et al. (1956). "Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication." Br Med J **32**(4993): 626-7.
- Barry, M. and R. C. Bleackley (2002). "Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death." Nat Rev Immunol **2**(6): 401-9.
- Barth, R. J., Jr., J. J. Mule, et al. (1991). "Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes." J Exp Med **173**(3): 647-58.
- Baselga, J., L. Norton, et al. (1998). "Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts." Cancer Res **58**(13): 2825-31.
- Baselga, J., D. Tripathy, et al. (1996). "Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer." J Clin Oncol **14**(3): 737-44.
- Bauer, S., V. Groh, et al. (1999). "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA." Science **285**(5428): 727-9.

- Beldegrun, A., L. M. Muul, et al. (1988). "Interleukin 2 expanded tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell cancer: isolation, characterization, and antitumor activity." Cancer Res **48**(1): 206-14.
- Bellosillo, B., N. Villamor, et al. (2001). "Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species." Blood **98**(9): 2771-7.
- Bendelac, A., M. N. Rivera, et al. (1997). "Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function." Annu Rev Immunol **15**: 535-62.
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, et al. (1998). "Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling." Nature **393**(6684): 478-80.
- Bicknell, D. C., A. Rowan, et al. (1994). "Beta 2-microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 4751-5.
- Blaise, D., D. Olive, et al. (1995). "Impairment of leukaemia-free survival by addition of interleukin-2-receptor antibody to standard graft-versus-host prophylaxis." Lancet **345**(8958): 1144-6.
- Blander, J. M., D. B. Sant'Angelo, et al. (2000). "Alteration at a single amino acid residue in the T cell receptor alpha chain complementarity determining region 2 changes the differentiation of naive CD4 T cells in response to antigen from T helper cell type 1 (Th1) to Th2." J Exp Med **191**(12): 2065-74.
- Blobe, G. C., W. P. Schiemann, et al. (2000). "Role of transforming growth factor beta in human disease." N Engl J Med **342**(18): 1350-8.
- Boehm, U., T. Klamp, et al. (1997). "Cellular responses to interferon-gamma." Annu Rev Immunol **15**: 749-95.
- Boise, L. H., A. J. Minn, et al. (1995). "CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL." Immunity **3**(1): 87-98.
- Boon, T., P. G. Coulie, et al. (1997). "Tumor antigens recognized by T cells." Immunol Today **18**(6): 267-8.
- Boonstra, A., C. Asselin-Paturel, et al. (2003). "Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation." J Exp Med **197**(1): 101-9.
- Borner, M. M., P. Brousset, et al. (1999). "Expression of apoptosis regulatory proteins of the Bcl-2 family and p53 in primary resected non-small-cell lung cancer." Br J Cancer **79**(5-6): 952-8.
- Branson, K., R. Chopra, et al. (2002). "Role of nonmyeloablative allogeneic stem-cell transplantation after failure of autologous transplantation in patients with lymphoproliferative malignancies." J Clin Oncol **20**(19): 4022-31.

- Breitfeld, D., L. Ohl, et al. (2000). "Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production." *J Exp Med* **192**(11): 1545-52.
- Burdin, N., L. Brossay, et al. (1998). "Selective ability of mouse CD1 to present glycolipids: alpha-galactosylceramide specifically stimulates V alpha 14+ NK T lymphocytes." *J Immunol* **161**(7): 3271-81.
- Burnet, F. M. (1967). "Immunological aspects of malignant disease." *Lancet* **1**(7501): 1171-4.
- Byrd, J. C., S. Kitada, et al. (2002). "The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction." *Blood* **99**(3): 1038-43.
- Byrd, J. C., K. Rai, et al. (2005). "Addition of rituximab to fludarabine may prolong progression-free survival and overall survival in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: an updated retrospective comparative analysis of CALGB 9712 and CALGB 9011." *Blood* **105**(1): 49-53.
- Carretero, M., C. Cantoni, et al. (1997). "The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules." *Eur J Immunol* **27**(2): 563-7.
- Cartron, G., L. Dacheux, et al. (2002). "Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc gamma RIIIa gene." *Blood* **99**(3): 754-8.
- Cartron, G., H. Watier, et al. (2004). "From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy." *Blood* **104**(9): 2635-42.
- Casamayor-Palleja, M., J. Feuillard, et al. (1996). "Centrocytes rapidly adopt a memory B cell phenotype on co-culture with autologous germinal centre T cell-enriched preparations." *Int Immunol* **8**(5): 737-44.
- Catros-Quemener, V., F. Bouet, et al. (2003). "[Antitumor immunity and cellular cancer therapies]." *Med Sci (Paris)* **19**(1): 43-53.
- Cerutti, A., H. Zan, et al. (1998). "CD40 ligand and appropriate cytokines induce switching to IgG, IgA, and IgE and coordinated germinal center and plasmacytoid phenotypic differentiation in a human monoclonal IgM+IgD+ B cell line." *J Immunol* **160**(5): 2145-57.
- Chambers, C. A., M. S. Kuhns, et al. (2001). "CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy." *Annu Rev Immunol* **19**: 565-94.
- Chaperot, L., M. H. Delfau-Larue, et al. (1999). "Differentiation of antitumor-specific cytotoxic T lymphocytes from autologous tumor infiltrating lymphocytes in non-Hodgkin's lymphomas." *Exp Hematol* **27**(7): 1185-93.

- Chaperot, L., O. Manches, et al. (2002). "Differentiation of anti-tumour cytotoxic T lymphocytes from autologous peripheral blood lymphocytes in non-Hodgkin's lymphomas." Br J Haematol **119**(2): 425-31.
- Chaperot, L., J. Plumas, et al. (1999). "Functional expression of CD80 and CD86 allows immunogenicity of malignant B cells from non-Hodgkin's lymphomas." Exp Hematol **27**(3): 479-88.
- Chappell, D. B., T. Z. Zaks, et al. (1999). "Human melanoma cells do not express Fas (Apo-1/CD95) ligand." Cancer Res **59**(1): 59-62.
- Chaux, P., N. Favre, et al. (1997). "Tumor-infiltrating dendritic cells are defective in their antigen-presenting function and inducible B7 expression in rats." Int J Cancer **72**(4): 619-24.
- Chen, H. L., D. Gabrilovich, et al. (1996). "A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer." Nat Genet **13**(2): 210-3.
- Chen, Y., V. K. Kuchroo, et al. (1994). "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis." Science **265**(5176): 1237-40.
- Childs, R., A. Chernoff, et al. (2000). "Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation." N Engl J Med **343**(11): 750-8.
- Childs, R. W., E. Clave, et al. (1999). "Successful treatment of metastatic renal cell carcinoma with a nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood progenitor-cell transplant: evidence for a graft-versus-tumor effect." J Clin Oncol **17**(7): 2044-9.
- Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, et al. (1997). "Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death." Science **275**(5303): 1122-6.
- Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, et al. (1995). "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis." Cell **81**(4): 505-12.
- Chouaib, S., C. Asselin-Paturel, et al. (1997). "The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction." Immunol Today **18**(10): 493-7.
- Ciurea, A., L. Hunziker, et al. (2001). "CD4+ T-cell-epitope escape mutant virus selected in vivo." Nat Med **7**(7): 795-800.
- Clynes, R. A., T. L. Towers, et al. (2000). "Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets." Nat Med **6**(4): 443-6.
- Cobleigh, M. A., C. L. Vogel, et al. (1999). "Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease." J Clin Oncol **17**(9): 2639-48.

- Coiffier, B., E. Lepage, et al. (2002). "CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma." *N Engl J Med* **346**(4): 235-42.
- Cole, D. J., J. K. Taubenberger, et al. (1994). "Histopathological analysis of metastatic melanoma deposits in patients receiving adoptive immunotherapy with tumor-infiltrating lymphocytes." *Cancer Immunol Immunother* **38**(5): 299-303.
- Colombat, P., G. Salles, et al. (2001). "Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as single first-line therapy for patients with follicular lymphoma with a low tumor burden: clinical and molecular evaluation." *Blood* **97**(1): 101-6.
- Colonna, M. and J. Samaridis (1995). "Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells." *Science* **268**(5209): 405-8.
- Conconi, A., G. Martinelli, et al. (2003). "Clinical activity of rituximab in extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT type." *Blood* **102**(8): 2741-5.
- Cosman, D., J. Mullberg, et al. (2001). "ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor." *Immunity* **14**(2): 123-33.
- Coughlin, C. M., K. E. Salhany, et al. (1998). "Tumor cell responses to IFN γ affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis." *Immunity* **9**(1): 25-34.
- Cox, A. L., J. Skipper, et al. (1994). "Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines." *Science* **264**(5159): 716-9.
- Coyle, A. J., S. Lehar, et al. (2000). "The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses." *Immunity* **13**(1): 95-105.
- Cragg, M. S., S. M. Morgan, et al. (2003). "Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts." *Blood* **101**(3): 1045-52.
- Creutzig, U., J. Harbott, et al. (1995). "Clinical significance of surface antigen expression in children with acute myeloid leukemia: results of study AML-BFM-87." *Blood* **86**(8): 3097-108.
- Cromme, F. V., J. Airey, et al. (1994). "Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas." *J Exp Med* **179**(1): 335-40.
- Cui, J., T. Shin, et al. (1997). "Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors." *Science* **278**(5343): 1623-6.
- Daugas, E., D. Nochy, et al. (2000). "Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis." *FEBS Lett* **476**(3): 118-23.

- Dearden, C. E., E. Matutes, et al. (2001). "High remission rate in T-cell prolymphocytic leukemia with CAMPATH-1H." *Blood* **98**(6): 1721-6.
- DeBenedette, M. A., T. Wen, et al. (1999). "Analysis of 4-1BB ligand (4-1BBL)-deficient mice and of mice lacking both 4-1BBL and CD28 reveals a role for 4-1BBL in skin allograft rejection and in the cytotoxic T cell response to influenza virus." *J Immunol* **163**(9): 4833-41.
- Defrance, T., M. Casamayor-Palleja, et al. (2002). "The life and death of a B cell." *Adv Cancer Res* **86**: 195-225.
- Delon, J. and R. N. Germain (2000). "Information transfer at the immunological synapse." *Curr Biol* **10**(24): R923-33.
- Delon, J., K. Kaibuchi, et al. (2001). "Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin." *Immunity* **15**(5): 691-701.
- Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." *Genes Dev* **13**(3): 239-52.
- Di Gaetano, N., E. Cittera, et al. (2003). "Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo." *J Immunol* **171**(3): 1581-7.
- Diefenbach, A., A. M. Jamieson, et al. (2000). "Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages." *Nat Immunol* **1**(2): 119-26.
- Diefenbach, A., E. R. Jensen, et al. (2001). "Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity." *Nature* **413**(6852): 165-71.
- Diefenbach, A. and D. H. Raulet (2001). "Strategies for target cell recognition by natural killer cells." *Immunol Rev* **181**: 170-84.
- Dillman, R. O., L. D. Beutel, et al. (2002). "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* **17**(1): 51-66.
- Dimopoulos, M. A., C. Zervas, et al. (2002). "Treatment of Waldenstrom's macroglobulinemia with rituximab." *J Clin Oncol* **20**(9): 2327-33.
- Djerbi, M., V. Screpanti, et al. (1999). "The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors." *J Exp Med* **190**(7): 1025-32.
- Dong, H. and L. Chen (2003). "B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity." *J Mol Med* **81**(5): 281-7.
- Dong, H., S. E. Strome, et al. (2002). "Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion." *Nat Med* **8**(8): 793-800.
- Dorner, T., S. J. Foster, et al. (1998). "Immunoglobulin kappa chain receptor editing in systemic lupus erythematosus." *J Clin Invest* **102**(4): 688-94.
- Dranoff, G. (2004). "Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy." *Nat Rev Cancer* **4**(1): 11-22.

- Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, et al. (2002). "Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes." Science **298**(5594): 850-4.
- Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, et al. (2002). "A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma." J Immunother **25**(3): 243-51.
- D'Urso, C. M., Z. G. Wang, et al. (1991). "Lack of HLA class I antigen expression by cultured melanoma cells FO-1 due to a defect in B2m gene expression." J Clin Invest **87**(1): 284-92.
- Dustin, M. L. and J. A. Cooper (2000). "The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling." Nat Immunol **1**(1): 23-9.
- Dutcher, J. (2002). "Current status of interleukin-2 therapy for metastatic renal cell carcinoma and metastatic melanoma." Oncology (Huntingt) **16**(11 Suppl 13): 4-10.
- Echchakir, H., M. Bagot, et al. (2000). "Cutaneous T cell lymphoma reactive CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones display a Th1 cytokine profile and use a fas-independent pathway for specific tumor cell lysis." J Invest Dermatol **115**(1): 74-80.
- Egen, J. G. and J. P. Allison (2002). "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength." Immunity **16**(1): 23-35.
- Farag, S. S., I. W. Flinn, et al. (2004). "Fc gamma RIIIa and Fc gamma RIIa polymorphisms do not predict response to rituximab in B-cell chronic lymphocytic leukemia." Blood **103**(4): 1472-4.
- Fearon, E. R., D. M. Pardoll, et al. (1990). "Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response." Cell **60**(3): 397-403.
- Fehervari, Z. and S. Sakaguchi (2004). "CD4+ Tregs and immune control." J Clin Invest **114**(9): 1209-17.
- Fenton, R. G., J. A. Hixon, et al. (1998). "Inhibition of Fas (CD95) expression and Fas-mediated apoptosis by oncogenic Ras." Cancer Res **58**(15): 3391-400.
- Flieger, D., S. Renoth, et al. (2000). "Mechanism of cytotoxicity induced by chimeric mouse human monoclonal antibody IDEC-C2B8 in CD20-expressing lymphoma cell lines." Cell Immunol **204**(1): 55-63.
- Flieger, D., U. Spengler, et al. (1999). "Enhancement of antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) by combination of cytokines." Hybridoma **18**(1): 63-8.
- Flynn, S. and B. Stockinger (2003). "Tumor and CD4 T-cell interactions: tumor escape as result of reciprocal inactivation." Blood **101**(11): 4472-8.

- Fong, L. and E. G. Engleman (2000). "Dendritic cells in cancer immunotherapy." Annu Rev Immunol **18**: 245-73.
- Fossa, S. D., A. Kramar, et al. (1994). "Prognostic factors and survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with chemotherapy or interferon-alpha." Eur J Cancer **30A(9)**: 1310-4.
- Franco, V., A. M. Florena, et al. (2003). "Splenic marginal zone lymphoma." Blood **101(7)**: 2464-72.
- Franksson, L., E. George, et al. (1993). "Tumorigenicity conferred to lymphoma mutant by major histocompatibility complex-encoded transporter gene." J Exp Med **177(1)**: 201-5.
- Fransen, L., J. Van der Heyden, et al. (1986). "Recombinant tumor necrosis factor: its effect and its synergism with interferon-gamma on a variety of normal and transformed human cell lines." Eur J Cancer Clin Oncol **22(4)**: 419-26.
- Fraser, J. D., B. A. Irving, et al. (1991). "Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28." Science **251(4991)**: 313-6.
- Freedman, A. S., G. Freeman, et al. (1987). "B7, a B-cell-restricted antigen that identifies preactivated B cells." J Immunol **139(10)**: 3260-7.
- Freeman, G. J., G. S. Gray, et al. (1991). "Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7." J Exp Med **174(3)**: 625-31.
- French, L. E. and J. Tschopp (1999). "Inhibition of death receptor signaling by FLICE-inhibitory protein as a mechanism for immune escape of tumors." J Exp Med **190(7)**: 891-4.
- Fukaura, H., S. C. Kent, et al. (1996). "Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients." J Clin Invest **98(1)**: 70-7.
- Furumoto, K., L. Soares, et al. (2004). "Induction of potent antitumor immunity by in situ targeting of intratumoral DCs." J Clin Invest **113(5)**: 774-83.
- Gao, F. G., V. Khammanivong, et al. (2002). "Antigen-specific CD4+ T-cell help is required to activate a memory CD8+ T cell to a fully functional tumor killer cell." Cancer Res **62(22)**: 6438-41.
- Garcia-Lora, A., I. Algarra, et al. (2003). "MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape." J Cell Physiol **195(3)**: 346-55.
- Garrido, F., F. Ruiz-Cabello, et al. (1997). "Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours." Immunol Today **18(2)**: 89-95.
- Gattoni-Celli, S., K. Kirsch, et al. (1992). "Beta 2-microglobulin gene is mutated in a human colon cancer cell line (HCT) deficient in the expression of HLA class I antigens on the cell surface." Cancer Res **52(5)**: 1201-4.

- Giuntoli, R. L., 2nd, J. Lu, et al. (2002). "Direct costimulation of tumor-reactive CTL by helper T cells potentiate their proliferation, survival, and effector function." Clin Cancer Res **8**(3): 922-31.
- Glennie, M. J. and P. W. Johnson (2000). "Clinical trials of antibody therapy." Immunol Today **21**(8): 403-10.
- Godfrey, D. I., K. J. Hammond, et al. (2000). "NKT cells: facts, functions and fallacies." Immunol Today **21**(11): 573-83.
- Godfrey, D. I., H. R. MacDonald, et al. (2004). "NKT cells: what's in a name?" Nat Rev Immunol **4**(3): 231-7.
- Golay, J., M. Lazzari, et al. (2001). "CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59." Blood **98**(12): 3383-9.
- Golay, J., L. Zaffaroni, et al. (2000). "Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis." Blood **95**(12): 3900-8.
- Goldman, J. M., R. P. Gale, et al. (1988). "Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion." Ann Intern Med **108**(6): 806-14.
- Gorelik, L. and R. A. Flavell (2002). "Transforming growth factor-beta in T-cell biology." Nat Rev Immunol **2**(1): 46-53.
- Grakoui, A., S. K. Bromley, et al. (1999). "The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation." Science **285**(5425): 221-7.
- Green, J. M., P. J. Noel, et al. (1994). "Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice." Immunity **1**(6): 501-8.
- Greenberg, P. D. (1991). "Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells." Adv Immunol **49**: 281-355.
- Griffiths, G. M. and S. Isaaz (1993). "Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor." J Cell Biol **120**(4): 885-96.
- Groh, V., J. Wu, et al. (2002). "Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation." Nature **419**(6908): 734-8.
- Gronbaek, K., P. T. Straten, et al. (1998). "Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity." Blood **92**(9): 3018-24.
- Groux, H., A. O'Garra, et al. (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." Nature **389**(6652): 737-42.
- Hahne, M., D. Rimoldi, et al. (1996). "Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape." Science **274**(5291): 1363-6.

- Hainsworth, J. D., H. A. Burris, 3rd, et al. (2000). "Rituximab monoclonal antibody as initial systemic therapy for patients with low-grade non-Hodgkin lymphoma." Blood **95**(10): 3052-6.
- Hamann, D., P. A. Baars, et al. (1997). "Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells." J Exp Med **186**(9): 1407-18.
- Harris, N. L., E. S. Jaffe, et al. (1994). "A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group." Blood **84**(5): 1361-92.
- Hashimoto, W., K. Takeda, et al. (1995). "Cytotoxic NK1.1 Ag+ alpha beta T cells with intermediate TCR induced in the liver of mice by IL-12." J Immunol **154**(9): 4333-40.
- Helgason, C. D., J. A. Prendergast, et al. (1992). "Peritoneal exudate lymphocyte and mixed lymphocyte culture hybridomas are cytolytic in the absence of cytotoxic cell proteinases and perforin." Eur J Immunol **22**(12): 3187-90.
- Herr, H. W., V. P. Laudone, et al. (1988). "Bacillus Calmette-Guerin therapy alters the progression of superficial bladder cancer." J Clin Oncol **6**(9): 1450-5.
- Hersey, P. and X. D. Zhang (2001). "How melanoma cells evade trail-induced apoptosis." Nat Rev Cancer **1**(2): 142-50.
- Heusel, J. W., R. L. Wesselschmidt, et al. (1994). "Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells." Cell **76**(6): 977-87.
- Hinman, L. M., P. R. Hamann, et al. (1993). "Preparation and characterization of monoclonal antibody conjugates of the calicheamicins: a novel and potent family of antitumor antibiotics." Cancer Res **53**(14): 3336-42.
- Hsu, F. J., C. B. Caspar, et al. (1997). "Tumor-specific idotype vaccines in the treatment of patients with B-cell lymphoma--long-term results of a clinical trial." Blood **89**(9): 3129-35.
- Huang, A. Y., P. Golumbek, et al. (1994). "Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens." Science **264**(5161): 961-5.
- Hung, K., R. Hayashi, et al. (1998). "The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response." J Exp Med **188**(12): 2357-68.
- Huppa, J. B. and M. M. Davis (2003). "T-cell-antigen recognition and the immunological synapse." Nat Rev Immunol **3**(12): 973-83.
- Irisarri, M., J. Plumas, et al. (2000). "Resistance to CD95-mediated apoptosis through constitutive c-FLIP expression in a non-Hodgkin's lymphoma B cell line." Leukemia **14**(12): 2149-58.
- Irmeler, M., M. Thome, et al. (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." Nature **388**(6638): 190-5.
- Itoh, K., C. D. Platsoucas, et al. (1988). "Autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas. Activation

by interleukin 2 and autologous tumor cells, and involvement of the T cell receptor." J Exp Med **168**(4): 1419-41.

- Itoh, N. and S. Nagata (1993). "A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen." J Biol Chem **268**(15): 10932-7.
- Iwasaki, T., M. Nakashima, et al. (2000). "Expression and prognostic significance in lung cancer of human tumor-associated antigen RCAS1." Int J Cancer **89**(6): 488-93.
- Jacob, M. C., S. Agrawal, et al. (1999). "Quantification of cellular adhesion molecules on malignant B cells from non-Hodgkin's lymphoma." Leukemia **13**(9): 1428-33.
- Jacob, M. C., M. P. Piccinni, et al. (1990). "T lymphocytes from invaded lymph nodes in patients with B-cell-derived non-Hodgkin's lymphoma: reactivity toward the malignant clone." Blood **75**(5): 1154-62.
- Jager, U., S. Bocskor, et al. (2000). "Follicular lymphomas' BCL-2/IgH junctions contain templated nucleotide insertions: novel insights into the mechanism of t(14;18) translocation." Blood **95**(11): 3520-9.
- Janeway, C. (2001). Immunobiology : the immune system in health and disease. London ; New York, NY, US, Garland Pub.
- Jefford, M., E. Maraskovsky, et al. (2001). "The use of dendritic cells in cancer therapy." Lancet Oncol **2**(6): 343-53.
- Jego, G., R. Bataille, et al. (2001). "Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts." Blood **97**(6): 1817-22.
- Jego, G., N. Robillard, et al. (1999). "Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells." Blood **94**(2): 701-12.
- Johnson, K. G., S. K. Bromley, et al. (2000). "A supramolecular basis for CD45 tyrosine phosphatase regulation in sustained T cell activation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(18): 10138-43.
- Johnson, P. and M. Glennie (2003). "The mechanisms of action of rituximab in the elimination of tumor cells." Semin Oncol **30**(1 Suppl 2): 3-8.
- Johnson, P. W. and M. J. Glennie (2001). "Rituximab: mechanisms and applications." Br J Cancer **85**(11): 1619-23.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, et al. (2002). "Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells." J Exp Med **196**(2): 255-60.
- Joza, N., S. A. Susin, et al. (2001). "Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death." Nature **410**(6828): 549-54.
- Karasuyama, H., A. Rolink, et al. (1993). "A complex of glycoproteins is associated with VpreB/lambda 5 surrogate light chain on the surface of mu heavy chain-negative early precursor B cell lines." J Exp Med **178**(2): 469-78.

- Karlhofer, F. M., R. K. Ribaldo, et al. (1992). "MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells." Nature **358**(6381): 66-70.
- Karre, K., H. G. Ljunggren, et al. (1986). "Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy." Nature **319**(6055): 675-8.
- Kawano, T., J. Cui, et al. (1997). "CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides." Science **278**(5343): 1626-9.
- Kawano, T., J. Cui, et al. (1998). "Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha14 NKT cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(10): 5690-3.
- Kawano, T., T. Nakayama, et al. (1999). "Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V alpha24 NKT cells." Cancer Res **59**(20): 5102-5.
- Keating, M. J., I. Flinn, et al. (2002). "Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study." Blood **99**(10): 3554-61.
- Keene, J. A. and J. Forman (1982). "Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes." J Exp Med **155**(3): 768-82.
- Kenter, A. L. (2003). "Class-switch recombination: after the dawn of AID." Curr Opin Immunol **15**(2): 190-8.
- Khoury, I. F., R. M. Saliba, et al. (2001). "Nonablative allogeneic hematopoietic transplantation as adoptive immunotherapy for indolent lymphoma: low incidence of toxicity, acute graft-versus-host disease, and treatment-related mortality." Blood **98**(13): 3595-9.
- Khoury, S. J., W. W. Hancock, et al. (1992). "Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain." J Exp Med **176**(5): 1355-64.
- Kirkwood, J. (2002). "Cancer immunotherapy: the interferon-alpha experience." Semin Oncol **29**(3 Suppl 7): 18-26.
- Kirkwood, J. M., G. D. Resnick, et al. (1997). "Efficacy, safety, and risk-benefit analysis of adjuvant interferon alfa-2b in melanoma." Semin Oncol **24**(1 Suppl 4): S16-23.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, et al. (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." Embo J **14**(22): 5579-88.
- Kitada, S., J. Andersen, et al. (1998). "Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses." Blood **91**(9): 3379-89.

- Klein, B., K. Tarte, et al. (2003). "Survival and proliferation factors of normal and malignant plasma cells." Int J Hematol **78**(2): 106-13.
- Klein, C., H. Bueler, et al. (2000). "Comparative analysis of genetically modified dendritic cells and tumor cells as therapeutic cancer vaccines." J Exp Med **191**(10): 1699-708.
- Klein, U., T. Goossens, et al. (1998). "Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells." Immunol Rev **162**: 261-80.
- Kolb, H. J., J. Mittermuller, et al. (1990). "Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients." Blood **76**(12): 2462-5.
- Kolb, H. J., B. Simoes, et al. (2004). "Cellular immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation in hematologic malignancies." Curr Opin Oncol **16**(2): 167-73.
- Kramer, M. H., P. M. Kluin, et al. (1995). "Differentiation of follicular lymphoma cells after autologous bone marrow transplantation and haematopoietic growth factor treatment." Lancet **345**(8948): 488-90.
- Kuchroo, V. K., M. P. Das, et al. (1995). "B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy." Cell **80**(5): 707-18.
- Kuhn, J. R. and M. Poenie (2002). "Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing." Immunity **16**(1): 111-21.
- Kuppers, R. (2005). "Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis." Nat Rev Cancer **5**(4): 251-62.
- Kwak, L. W., M. J. Campbell, et al. (1992). "Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors." N Engl J Med **327**(17): 1209-15.
- Labarriere, N., E. Diez, et al. (1997). "Optimal T cell activation by melanoma cells depends on a minimal level of antigen transcription." J Immunol **158**(3): 1238-45.
- Lajmanovich, A., M. Irisarri, et al. (2004). "Impairment of death-inducing signalling complex formation in CD95-resistant human primary lymphoma B cells." Br J Haematol **124**(6): 746-53.
- Lamm, D. L., B. A. Blumenstein, et al. (2000). "Maintenance bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for recurrent TA, T1 and carcinoma in situ transitional cell carcinoma of the bladder: a randomized Southwest Oncology Group Study." J Urol **163**(4): 1124-9.
- Langenkamp, A., M. Messi, et al. (2000). "Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells." Nat Immunol **1**(4): 311-6.
- Lantz, O. and A. Bendelac (1994). "An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans." J Exp Med **180**(3): 1097-106.

- Lanzavecchia, A. and F. Sallusto (2000). "Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells." Science **290**(5489): 92-7.
- Lazetic, S., C. Chang, et al. (1996). "Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits." J Immunol **157**(11): 4741-5.
- Lee, K. M., E. Chuang, et al. (1998). "Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4." Science **282**(5397): 2263-6.
- Lenardo, M., K. M. Chan, et al. (1999). "Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment." Annu Rev Immunol **17**: 221-53.
- Lenschow, D. J., T. L. Walunas, et al. (1996). "CD28/B7 system of T cell costimulation." Annu Rev Immunol **14**: 233-58.
- Leonard, J. P., M. Coleman, et al. (2003). "Phase I/II trial of epratuzumab (humanized anti-CD22 antibody) in indolent non-Hodgkin's lymphoma." J Clin Oncol **21**(16): 3051-9.
- Li, H., H. Zhu, et al. (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." Cell **94**(4): 491-501.
- Lieberman, J. (2003). "The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal." Nat Rev Immunol **3**(5): 361-70.
- Liew, F. Y. (2002). "T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective." Nat Rev Immunol **2**(1): 55-60.
- Lim, L. C., L. P. Koh, et al. (1999). "Fatal cytokine release syndrome with chimeric anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in a 71-year-old patient with chronic lymphocytic leukemia." J Clin Oncol **17**(6): 1962-3.
- Liston, P., N. Roy, et al. (1996). "Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes." Nature **379**(6563): 349-53.
- Ljunggren, H. G., K. Sturmhofel, et al. (1990). "Transfection of beta 2-microglobulin restores IFN-mediated protection from natural killer cell lysis in YAC-1 lymphoma variants." J Immunol **145**(1): 380-6.
- Lundin, K. U., P. O. Hofgaard, et al. (2003). "Therapeutic effect of idiotype-specific CD4+ T cells against B-cell lymphoma in the absence of anti-idiotypic antibodies." Blood **102**(2): 605-12.
- Luo, X., I. Budihardjo, et al. (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." Cell **94**(4): 481-90.
- Lurquin, C., A. Van Pel, et al. (1989). "Structure of the gene of tum-transplantation antigen P91A: the mutated exon encodes a peptide recognized with Ld by cytolytic T cells." Cell **58**(2): 293-303.
- Mackensen, A., G. Carcelain, et al. (1994). "Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma." J Clin Invest **93**(4): 1397-402.

- Mackey, M. F., J. R. Gunn, et al. (1998). "Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity." *J Immunol* **161**(5): 2094-8.
- Mackey, M. F., J. R. Gunn, et al. (1997). "Protective immunity induced by tumor vaccines requires interaction between CD40 and its ligand, CD154." *Cancer Res* **57**(13): 2569-74.
- Magniez, N., C. Roucard, et al. (2004). "Biochemical pathway of antigen processing by HLA class II molecules in B cell lymphomas." *Leukemia* **18**(8): 1448-50.
- Malarkannan, S., P. P. Shih, et al. (1998). "The molecular and functional characterization of a dominant minor H antigen, H60." *J Immunol* **161**(7): 3501-9.
- Manches, O., G. Lui, et al. (2003). "In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas." *Blood* **101**(3): 949-54.
- Mandelboim, O., G. Berke, et al. (1994). "CTL induction by a tumour-associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma." *Nature* **369**(6475): 67-71.
- Maraninchi, D., E. Gluckman, et al. (1987). "Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias." *Lancet* **2**(8552): 175-8.
- Marchand, M., N. van Baren, et al. (1999). "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* **80**(2): 219-30.
- Marcus, R., K. Imrie, et al. (2005). "CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma." *Blood* **105**(4): 1417-23.
- Martin, I., T. Bonnefoix, et al. (1999). "Role of autologous CD4+ T cell clones in human B non-Hodgkin's lymphoma: aborted activation and G1 blockade induced by cell-cell contact." *Eur J Immunol* **29**(10): 3188-95.
- Marzo, A. L., B. F. Kinnear, et al. (2000). "Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity." *J Immunol* **165**(11): 6047-55.
- Mattes, J., M. Hulett, et al. (2003). "Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells: an eotaxin and STAT6-dependent process." *J Exp Med* **197**(3): 387-93.
- McClain, K. L. (1997). "Immunodeficiency states and related malignancies." *Cancer Treat Res* **92**: 39-61.
- McSweeney, P. A., D. Niederwieser, et al. (2001). "Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects." *Blood* **97**(11): 3390-400.

- Medema, J. P., J. de Jong, et al. (1999). "Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein." *J Exp Med* **190**(7): 1033-8.
- Melchers, F., H. Karasuyama, et al. (1993). "The surrogate light chain in B-cell development." *Immunol Today* **14**(2): 60-8.
- Merville, P., J. Dechanet, et al. (1995). "T cell-induced B cell blasts differentiate into plasma cells when cultured on bone marrow stroma with IL-3 and IL-10." *Int Immunol* **7**(4): 635-43.
- Michalek, J., R. H. Collins, et al. (2003). "Definitive separation of graft-versus-leukemia- and graft-versus-host-specific CD4+ T cells by virtue of their receptor beta loci sequences." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(3): 1180-4.
- Miller, R. A., D. G. Maloney, et al. (1982). "Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody." *N Engl J Med* **306**(9): 517-22.
- Minami, Y., T. Kono, et al. (1993). "The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes." *Annu Rev Immunol* **11**: 245-68.
- Monks, C. R., B. A. Freiberg, et al. (1998). "Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells." *Nature* **395**(6697): 82-6.
- Moretta, A., M. Vitale, et al. (1993). "P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities." *J Exp Med* **178**(2): 597-604.
- Moser, M., T. Sornasse, et al. (1995). "Dendritic cells can be used as physiological adjuvant in vivo." *Adv Exp Med Biol* **378**: 501-5.
- Mosmann, T. R., L. Li, et al. (1997). "Differentiation and functions of T cell subsets." *Ciba Found Symp* **204**: 148-54; discussion 154-8.
- Motyka, B., G. Korbitt, et al. (2000). "Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis." *Cell* **103**(3): 491-500.
- Mumberg, D., P. A. Monach, et al. (1999). "CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(15): 8633-8.
- Murata, K., N. Ishii, et al. (2000). "Impairment of antigen-presenting cell function in mice lacking expression of OX40 ligand." *J Exp Med* **191**(2): 365-74.
- Murphy, G., B. Tjoa, et al. (1996). "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* **29**(6): 371-80.
- Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, et al. (1996). "FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex." *Cell* **85**(6): 817-27.

- Nagata, K., T. Nakamura, et al. (1997). "The Ig alpha/Igbeta heterodimer on mu-negative proB cells is competent for transducing signals to induce early B cell differentiation." *Immunity* **7**(4): 559-70.
- Nagata, S. and P. Golstein (1995). "The Fas death factor." *Science* **267**(5203): 1449-56.
- Nakashima, M., K. Sonoda, et al. (1999). "Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1." *Nat Med* **5**(8): 938-42.
- Nanda, N. K. and E. E. Sercarz (1995). "Induction of anti-self-immunity to cure cancer." *Cell* **82**(1): 13-7.
- Negrier, S., B. Escudier, et al. (1998). "Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. Groupe Francais d'Immunotherapie." *N Engl J Med* **338**(18): 1272-8.
- Nestle, F. O., S. Alijagic, et al. (1998). "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells." *Nat Med* **4**(3): 328-32.
- Noguchi, K., M. Enjoji, et al. (2001). "Expression of a tumor-associated antigen RCAS1 in hepatocellular carcinoma." *Cancer Lett* **168**(2): 197-202.
- Norcross, M. A. (1984). "A synaptic basis for T-lymphocyte activation." *Ann Immunol (Paris)* **135D**(2): 113-34.
- O'Connell, J., M. W. Bennett, et al. (1999). "The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege." *Immunol Today* **20**(1): 46-52.
- O'Connell, J., A. Houston, et al. (2001). "Immune privilege or inflammation? Insights into the Fas ligand enigma." *Nat Med* **7**(3): 271-4.
- O'Connell, J., G. C. O'Sullivan, et al. (1996). "The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand." *J Exp Med* **184**(3): 1075-82.
- Oettinger, M. A., D. G. Schatz, et al. (1990). "RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination." *Science* **248**(4962): 1517-23.
- Ohm, J. E. and D. P. Carbone (2001). "VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency." *Immunol Res* **23**(2-3): 263-72.
- Osmond, D. G. (1991). "Proliferation kinetics and the lifespan of B cells in central and peripheral lymphoid organs." *Curr Opin Immunol* **3**(2): 179-85.
- Osmond, D. G. (1993). "The turnover of B-cell populations." *Immunol Today* **14**(1): 34-7.
- Ossendorp, F., R. E. Toes, et al. (2000). "Importance of CD4(+) T helper cell responses in tumor immunity." *Immunol Lett* **74**(1): 75-9.
- Oyama, T., S. Ran, et al. (1998). "Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells." *J Immunol* **160**(3): 1224-32.

- Pardoll, D. (2003). "Does the immune system see tumors as foreign or self?" Annu Rev Immunol **21**: 807-39.
- Parmiani, G., C. Castelli, et al. (2002). "Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going?" J Natl Cancer Inst **94**(11): 805-18.
- Pasche, B. (2001). "Role of transforming growth factor beta in cancer." J Cell Physiol **186**(2): 153-68.
- Peli, J., M. Schroter, et al. (1999). "Oncogenic Ras inhibits Fas ligand-mediated apoptosis by downregulating the expression of Fas." Embo J **18**(7): 1824-31.
- Pena, S. V. and A. M. Krensky (1997). "Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity." Semin Immunol **9**(2): 117-25.
- Pende, D., P. Rivera, et al. (2002). "Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity." Cancer Res **62**(21): 6178-86.
- Pfizenmaier, K., H. Bartsch, et al. (1985). "Differential gamma-interferon response of human colon carcinoma cells: inhibition of proliferation and modulation of immunogenicity as independent effects of gamma-interferon on tumor cell growth." Cancer Res **45**(8): 3503-9.
- Phillips, J. H. and L. L. Lanier (1986). "Dissection of the lymphokine-activated killer phenomenon. Relative contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytolysis." J Exp Med **164**(3): 814-25.
- Pinkoski, M. J., M. Hobman, et al. (1998). "Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis." Blood **92**(3): 1044-54.
- Piontek, G. E., K. Taniguchi, et al. (1985). "YAC-1 MHC class I variants reveal an association between decreased NK sensitivity and increased H-2 expression after interferon treatment or in vivo passage." J Immunol **135**(6): 4281-8.
- Pitti, R. M., S. A. Marsters, et al. (1998). "Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer." Nature **396**(6712): 699-703.
- Plumas, J., L. Chaperot, et al. (1995). "Malignant B lymphocytes from non-Hodgkin's lymphoma induce allogeneic proliferative and cytotoxic T cell responses in primary mixed lymphocyte cultures: an important role of co-stimulatory molecules CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) in stimulation by tumor cells." Eur J Immunol **25**(12): 3332-41.
- Plumas, J., M. C. Jacob, et al. (1998). "Tumor B cells from non-Hodgkin's lymphoma are resistant to CD95 (Fas/Apo-1)-mediated apoptosis." Blood **91**(8): 2875-85.

- Poehlein, C. H., H. M. Hu, et al. (2003). "TNF plays an essential role in tumor regression after adoptive transfer of perforin/IFN-gamma double knockout effector T cells." J Immunol **170**(4): 2004-13.
- Porgador, A. and E. Gilboa (1995). "Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes." J Exp Med **182**(1): 255-60.
- Press, O. W., J. P. Leonard, et al. (2001). "Immunotherapy of Non-Hodgkin's lymphomas." Hematology (Am Soc Hematol Educ Program): 221-40.
- Qin, Z. and T. Blankenstein (2000). "CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells." Immunity **12**(6): 677-86.
- Qin, Z., J. Schwartzkopff, et al. (2003). "A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells." Cancer Res **63**(14): 4095-100.
- Ragde, H., W. A. Cavanagh, et al. (2004). "Dendritic cell based vaccines: progress in immunotherapy studies for prostate cancer." J Urol **172**(6 Pt 2): 2532-8.
- Ravaud, A., E. Legrand, et al. (1995). "A phase I trial of repeated tumour-infiltrating lymphocyte (TIL) infusion in metastatic melanoma." Br J Cancer **71**(2): 331-6.
- Reed, J. C. (1998). "Bcl-2 family proteins." Oncogene **17**(25): 3225-36.
- Reff, M. E., K. Carner, et al. (1994). "Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20." Blood **83**(2): 435-45.
- Reilly, R. T., J. P. Machiels, et al. (2001). "The collaboration of both humoral and cellular HER-2/neu-targeted immune responses is required for the complete eradication of HER-2/neu-expressing tumors." Cancer Res **61**(3): 880-3.
- Restifo, N. P. (2000). "Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape." Nat Med **6**(5): 493-5.
- Restifo, N. P. (2001). "Countering the 'counterattack' hypothesis." Nat Med **7**(3): 259.
- Restifo, N. P., F. Esquivel, et al. (1993). "Identification of human cancers deficient in antigen processing." J Exp Med **177**(2): 265-72.
- Ridge, J. P., F. Di Rosa, et al. (1998). "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell." Nature **393**(6684): 474-8.
- Rocha, B. and C. Tanchot (2004). "Towards a cellular definition of CD8+ T-cell memory: the role of CD4+ T-cell help in CD8+ T-cell responses." Curr Opin Immunol **16**(3): 259-63.
- Rochaix, P., S. Krajewski, et al. (1999). "In vivo patterns of Bcl-2 family protein expression in breast carcinomas in relation to apoptosis." J Pathol **187**(4): 410-5.
- Romagnani, S. (1997). "The Th1/Th2 paradigm." Immunol Today **18**(6): 263-6.

- Rosenberg, S. A. (1992). "Karnofsky Memorial Lecture. The immunotherapy and gene therapy of cancer." J Clin Oncol **10**(2): 180-99.
- Rosenberg, S. A., M. T. Lotze, et al. (1987). "A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone." N Engl J Med **316**(15): 889-97.
- Rosenberg, S. A., P. Spiess, et al. (1986). "A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes." Science **233**(4770): 1318-21.
- Rosenberg, S. A., J. C. Yang, et al. (2004). "Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines." Nat Med **10**(9): 909-15.
- Rosenberg, S. A., J. C. Yang, et al. (1998). "Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma." Nat Med **4**(3): 321-7.
- Rosenberg, S. A., J. R. Yannelli, et al. (1994). "Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2." J Natl Cancer Inst **86**(15): 1159-66.
- Roth, W., S. Isenmann, et al. (2001). "Soluble decoy receptor 3 is expressed by malignant gliomas and suppresses CD95 ligand-induced apoptosis and chemotaxis." Cancer Res **61**(6): 2759-65.
- Rouvier, E., M. F. Luciani, et al. (1993). "Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity." J Exp Med **177**(1): 195-200.
- Saas, P., P. R. Walker, et al. (1997). "Fas ligand expression by astrocytoma in vivo: maintaining immune privilege in the brain?" J Clin Invest **99**(6): 1173-8.
- Sallusto, F., D. Lenig, et al. (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." Nature **401**(6754): 708-12.
- Savage, N. D., S. L. Kimzey, et al. (2002). "Polar redistribution of the sialoglycoprotein CD43: implications for T cell function." J Immunol **168**(8): 3740-6.
- Scaffidi, C., S. Fulda, et al. (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." Embo J **17**(6): 1675-87.
- Schadendorf, D. and F. O. Nestle (2001). "Autologous dendritic cells for treatment of advanced cancer--an update." Recent Results Cancer Res **158**: 236-48.
- Schoenberger, S. P., R. E. Toes, et al. (1998). "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions." Nature **393**(6684): 480-3.
- Schultze, J. L., A. A. Cardoso, et al. (1995). "Follicular lymphomas can be induced to present alloantigen efficiently: a conceptual model to improve their tumor immunogenicity." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(18): 8200-4.

- Schwartz, R. H. (1992). "Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy." Cell **71**(7): 1065-8.
- Seliger, B., T. Cabrera, et al. (2002). "HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells." Semin Cancer Biol **12**(1): 3-13.
- Shaffer, A. L., A. Rosenwald, et al. (2002). "Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation." Nat Rev Immunol **2**(12): 920-32.
- Shahinian, A., K. Pfeffer, et al. (1993). "Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice." Science **261**(5121): 609-12.
- Shan, D., J. A. Ledbetter, et al. (1998). "Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies." Blood **91**(5): 1644-52.
- Shapiro-Shelef, M. and K. Calame (2005). "Regulation of plasma-cell development." Nat Rev Immunol **5**(3): 230-42.
- Sharma, S., M. Stolina, et al. (1999). "T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function." J Immunol **163**(9): 5020-8.
- Shi, L., T. Bonnefoix, et al. (1995). "Autotumour reactive T-cell clones among tumour-infiltrating T lymphocytes in B-cell non-Hodgkin's lymphomas." Br J Haematol **90**(4): 837-43.
- Sievers, E. L., R. A. Larson, et al. (2001). "Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse." J Clin Oncol **19**(13): 3244-54.
- Simons, J. W., B. Mikhak, et al. (1999). "Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer." Cancer Res **59**(20): 5160-8.
- Slamon, D. J., B. Leyland-Jones, et al. (2001). "Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2." N Engl J Med **344**(11): 783-92.
- Slichenmyer, W. J. and D. W. Fry (2001). "Anticancer therapy targeting the erbB family of receptor tyrosine kinases." Semin Oncol **28**(5 Suppl 16): 67-79.
- Slingluff, C. L., Jr. and D. E. Speiser (2005). "Progress and controversies in developing cancer vaccines." J Transl Med **3**(1): 18.
- Sliwkowski, M. X., J. A. Lofgren, et al. (1999). "Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin)." Semin Oncol **26**(4 Suppl 12): 60-70.
- Smyth, M. J., D. I. Godfrey, et al. (2001). "A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy." Nat Immunol **2**(4): 293-9.
- Smyth, M. J., K. Y. Thia, et al. (2000). "Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells." J Exp Med **191**(4): 661-8.

- Sondak, V. K., P. Y. Liu, et al. (2002). "Adjuvant immunotherapy of resected, intermediate-thickness, node-negative melanoma with an allogeneic tumor vaccine: overall results of a randomized trial of the Southwest Oncology Group." J Clin Oncol **20**(8): 2058-66.
- Splawski, J. B., L. M. McAnally, et al. (1990). "IL-2 dependence of the promotion of human B cell differentiation by IL-6 (BSF-2)." J Immunol **144**(2): 562-9.
- Strand, S., W. J. Hofmann, et al. (1996). "Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion?" Nat Med **2**(12): 1361-6.
- Strome, S. E., H. Dong, et al. (2003). "B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma." Cancer Res **63**(19): 6501-5.
- Sutherland, C. L., N. J. Chalupny, et al. (2002). "UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells." J Immunol **168**(2): 671-9.
- Takahama, Y., Y. Yamada, et al. (2002). "The prognostic significance of overexpression of the decoy receptor for Fas ligand (DcR3) in patients with gastric carcinomas." Gastric Cancer **5**(2): 61-8.
- Takahashi, M., K. Ogasawara, et al. (1996). "LPS induces NK1.1+ alpha beta T cells with potent cytotoxicity in the liver of mice via production of IL-12 from Kupffer cells." J Immunol **156**(7): 2436-42.
- Tan, J. T., J. K. Whitmire, et al. (1999). "4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses." J Immunol **163**(9): 4859-68.
- Taneja, S. S., W. Pierce, et al. (1995). "Immunotherapy for renal cell carcinoma: the era of interleukin-2-based treatment." Urology **45**(6): 911-24.
- Tangri, S., G. Y. Ishioka, et al. (2001). "Structural features of peptide analogs of human histocompatibility leukocyte antigen class I epitopes that are more potent and immunogenic than wild-type peptide." J Exp Med **194**(6): 833-46.
- Tartour, E., S. Latour, et al. (1995). "Variable expression of CD3-zeta chain in tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) derived from renal-cell carcinoma: relationship with TIL phenotype and function." Int J Cancer **63**(2): 205-12.
- Taub, R., I. Kirsch, et al. (1982). "Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(24): 7837-41.
- Thomas, W. D. and P. Hersey (1998). "TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells." J Immunol **161**(5): 2195-200.

- Thome, M., P. Schneider, et al. (1997). "Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors." Nature **386**(6624): 517-21.
- Tiegs, S. L., D. M. Russell, et al. (1993). "Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells." J Exp Med **177**(4): 1009-20.
- Toellner, K. M., A. Gulbranson-Judge, et al. (1996). "Immunoglobulin switch transcript production in vivo related to the site and time of antigen-specific B cell activation." J Exp Med **183**(5): 2303-12.
- Toes, R. E., F. Ossendorp, et al. (1999). "CD4 T cells and their role in antitumor immune responses." J Exp Med **189**(5): 753-6.
- Toi, M., T. Taniguchi, et al. (1996). "Clinical significance of the determination of angiogenic factors." Eur J Cancer **32A**(14): 2513-9.
- Tollefson, A. E., T. W. Hermiston, et al. (1998). "Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells." Nature **392**(6677): 726-30.
- Townsend, S. E. and J. P. Allison (1993). "Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells." Science **259**(5093): 368-70.
- Trapani, J. A., J. Davis, et al. (2000). "Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo." Curr Opin Immunol **12**(3): 323-9.
- Trapani, J. A. and M. J. Smyth (2002). "Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway." Nat Rev Immunol **2**(10): 735-47.
- Treon, S. P., M. Hansen, et al. (2005). "Polymorphisms in FcγRIIIA (CD16) receptor expression are associated with clinical response to rituximab in Waldenstrom's macroglobulinemia." J Clin Oncol **23**(3): 474-81.
- Trinchieri, G. (2003). "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **3**(2): 133-46.
- Trinchieri, G. and P. Scott (1999). "Interleukin-12: basic principles and clinical applications." Curr Top Microbiol Immunol **238**: 57-78.
- Turley, S. J., K. Inaba, et al. (2000). "Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells." Science **288**(5465): 522-7.
- Ueno, N. T., G. Rondon, et al. (1998). "Allogeneic peripheral-blood progenitor-cell transplantation for poor-risk patients with metastatic breast cancer." J Clin Oncol **16**(3): 986-93.
- Ueno, N. T., E. J. Shpall, et al. (2004). "Graft-versus-breast cancer effect by allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation: a possible new frontier." J Clin Oncol **22**(19): 3846-7.
- Vaandrager, J. W., E. Schuurin, et al. (1996). "Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multicolor DNA fiber fluorescence in situ hybridization." Blood **88**(4): 1177-82.

- van der Bruggen, P., C. Traversari, et al. (1991). "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma." Science **254**(5038): 1643-7.
- Van Der Bruggen, P., Y. Zhang, et al. (2002). "Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells." Immunol Rev **188**: 51-64.
- van Der Merwe, P. A. and S. J. Davis (2002). "Immunology. The immunological synapse--a multitasking system." Science **295**(5559): 1479-80.
- Wagtmann, N., S. Rajagopalan, et al. (1995). "Killer cell inhibitory receptors specific for HLA-C and HLA-B identified by direct binding and by functional transfer." Immunity **3**(6): 801-9.
- Waldmann, T. A. (2003). "Immunotherapy: past, present and future." Nat Med **9**(3): 269-77.
- Walker, P. R., P. Saas, et al. (1997). "Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back." J Immunol **158**(10): 4521-4.
- Wallack, M. K., S. D. Scoggin, et al. (1992). "Active specific immunotherapy with vaccinia melanoma oncolysate." Mt Sinai J Med **59**(3): 227-33.
- Wan, Y., P. Emtage, et al. (1999). "Enhanced immune response to the melanoma antigen gp100 using recombinant adenovirus-transduced dendritic cells." Cell Immunol **198**(2): 131-8.
- Wang, R. F. (2001). "The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity." Trends Immunol **22**(5): 269-76.
- Wang, S., Z. F. Boonman, et al. (2003). "Role of TRAIL and IFN-gamma in CD4+ T cell-dependent tumor rejection in the anterior chamber of the eye." J Immunol **171**(6): 2789-96.
- Wang, Z., E. Choice, et al. (2000). "Bactericidal and tumoricidal activities of synthetic peptides derived from granulysin." J Immunol **165**(3): 1486-90.
- Waterhouse, P., L. E. Marengere, et al. (1996). "CTLA-4, a negative regulator of T-lymphocyte activation." Immunol Rev **153**: 183-207.
- Waterhouse, P., J. M. Penninger, et al. (1995). "Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl α -4." Science **270**(5238): 985-8.
- Weber, J. S., F. L. Hua, et al. (1999). "A phase I trial of an HLA-A1 restricted MAGE-3 epitope peptide with incomplete Freund's adjuvant in patients with resected high-risk melanoma." J Immunother **22**(5): 431-40.
- Wells, A. D., H. Gudmundsdottir, et al. (1997). "Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. Signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response." J Clin Invest **100**(12): 3173-83.
- Weng, W. K. and R. Levy (2001). "Expression of complement inhibitors CD46, CD55, and CD59 on tumor cells does not predict clinical outcome after rituximab treatment in follicular non-Hodgkin lymphoma." Blood **98**(5): 1352-7.

- Whiteside, T. L. (1999). "Signaling defects in T lymphocytes of patients with malignancy." Cancer Immunol Immunother **48**(7): 346-52.
- Whiteside, T. L., L. M. Jost, et al. (1992). "Tumor-infiltrating lymphocytes. Potential and limitations to their use for cancer therapy." Crit Rev Oncol Hematol **12**(1): 25-47.
- Whitmire, J. K. and R. Ahmed (2000). "Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses." Curr Opin Immunol **12**(4): 448-55.
- Whitmire, J. K., R. A. Flavell, et al. (1999). "CD40-CD40 ligand costimulation is required for generating antiviral CD4 T cell responses but is dispensable for CD8 T cell responses." J Immunol **163**(6): 3194-201.
- Wiest, D. L., A. Bhandoola, et al. (1997). "Incomplete endoplasmic reticulum (ER) retention in immature thymocytes as revealed by surface expression of "ER-resident" molecular chaperones." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1884-9.
- Williamson, B. D., E. A. Carswell, et al. (1983). "Human tumor necrosis factor produced by human B-cell lines: synergistic cytotoxic interaction with human interferon." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(17): 5397-401.
- Willis, T. G. and M. J. Dyer (2000). "The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies." Blood **96**(3): 808-22.
- Wing, E. J., D. M. Magee, et al. (1989). "Recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor enhances monocyte cytotoxicity and secretion of tumor necrosis factor alpha and interferon in cancer patients." Blood **73**(3): 643-6.
- Winkler, U., M. Jensen, et al. (1999). "Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8)." Blood **94**(7): 2217-24.
- Wintterle, S., B. Schreiner, et al. (2003). "Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis." Cancer Res **63**(21): 7462-7.
- Witzig, T. E., L. I. Gordon, et al. (2002). "Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma." J Clin Oncol **20**(10): 2453-63.
- Wu, J., Y. Song, et al. (1999). "An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10." Science **285**(5428): 730-2.
- Yee, C., J. A. Thompson, et al. (2002). "Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 16168-73.

- Yin, C., C. M. Knudson, et al. (1997). "Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo." Nature **385**(6617): 637-40.
- Yokoyama, W. M., L. B. Jacobs, et al. (1989). "A murine T lymphocyte antigen belongs to a supergene family of type II integral membrane proteins." J Immunol **143**(4): 1379-86.
- Younes, A., B. Pro, et al. (2004). "Phase II clinical trial of interleukin-12 in patients with relapsed and refractory non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease." Clin Cancer Res **10**(16): 5432-8.
- Zeng, G., Y. Li, et al. (2002). "Generation of NY-ESO-1-specific CD4+ and CD8+ T cells by a single peptide with dual MHC class I and class II specificities: a new strategy for vaccine design." Cancer Res **62**(13): 3630-5.
- Zhou, P., L. Qian, et al. (1997). "Mcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions." Blood **89**(2): 630-43.
- Zwaan, C. M., D. Reinhardt, et al. (2003). "Gemtuzumab ozogamicin: first clinical experiences in children with relapsed/refractory acute myeloid leukemia treated on compassionate-use basis." Blood **101**(10): 3868-71.

Annexe :
Diaporama-présentation orale de la thèse

Génération et mécanismes d'action anti-tumorale d'effecteurs lymphocytaires T CD4⁺ dans les lymphomes B malins

Jian-Qing Mi
Docteurant en biologie

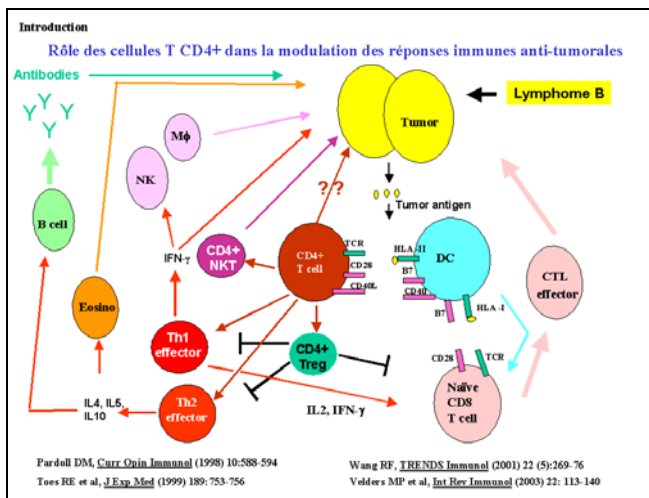
• Directeur de thèse : Pr. Jean-Jacques SOTTO
Responsable scientifique: Dr. Thierry BONNEFOIX

• Inserm E 353,
GRL, Groupe de Recherche sur les Lymphomes et les Leucémies
• Directeur du Laboratoire : Pr. D. LEROUX

14 Octobre 2005

Sommaire

- Introduction
- Objectifs du travail
- Premier Modèle
- Deuxième Modèle
- Conclusion générale
- Perspectives



L'expansion et l'activation de lymphocytes T CD4+ nécessitent la présence de cellules présentatrices d'antigènes (APC)

Adhérence
CD11a: CD54
CD58 : CD2

Reconnaissance
TCR : MHC-II

Co-stimulation
B7 : CD28
CD40: CD40L

APC
↓
Cellules dendritiques
Macrophage
Cellules B

Banchereau J et al, *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12:881-922

Cellules de lymphome B

→ Cellules présentatrices d'antigène (APC)

Plumas J et al, *Eur J Immunol.* 1995 Dec;25(12):3332-41;
Chaperot L et al, *Exp Hematol.* 1999 Mar;27(3):479-88; Jacob MC et al, *Leukemia* 1999 Sep;13(9):1428-33

En pathologie – lymphomes B

Modèle humain

Situation polyclonale T → Prolifération de lymphome B folliculaire
Situation allogénique
Umetsu DT et al, *J Immunol.* 1990 Apr 1; 144 (7): 2550-7

T CD4+ → B malignes

Clones T → Cytotoxicité contre les cellules B de lymphome
Situation autologue
Yssel H et al, *J Exp Med.* 1984 Jul 1; 160 (1): 239-54

Travaux antérieurs du Laboratoire

T CD4+ ← Activer B malignes
Au niveau Polyclonaux et monoclonal
Jacob MC et al, *Blood* (1990) 75:1154-62
Bonnefoix T et al, *Immunol. Lett.* (1991) 27(2):135-9
Bonnefoix T et al, *Scand. J. Immunol.* (1991) 34:91-100
Shi I, Bonnefoix T et al, *Br. J. Haematol* (1995) 90:837-43

T CD4+ → B malignes
1 Modèle Clones T Situation autologue → Mise en cycle des cellules de lymphome B folliculaire
Martín I, Bonnefoix T et al, *Eur J Immunol* 1999. 29:3188-3195

Autres fonctions
???

Objectifs du travail de thèse :

Explorer la fonction effectrice des lymphocytes T CD4+ vis-à-vis des lymphocytes B malins dans un système autologue

Deux nouveaux modèles:

Premier Modèle – Lymphome B de la zone marginale

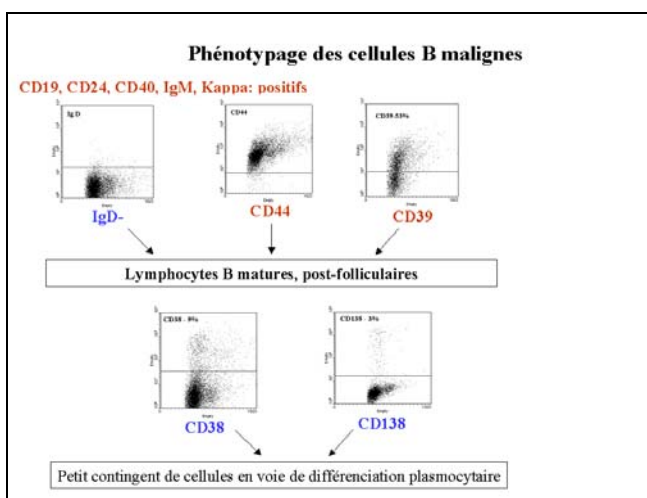
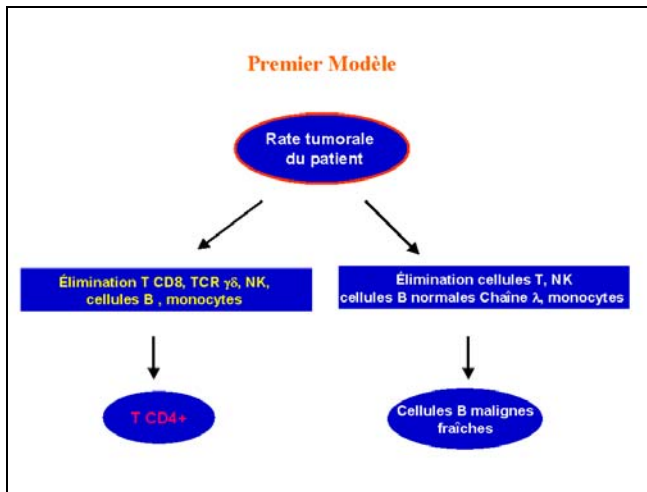
1) Etudier les fonctions effectrices des TIL-T CD4+ venant de la rate du patient sur les cellules B malignes autologues

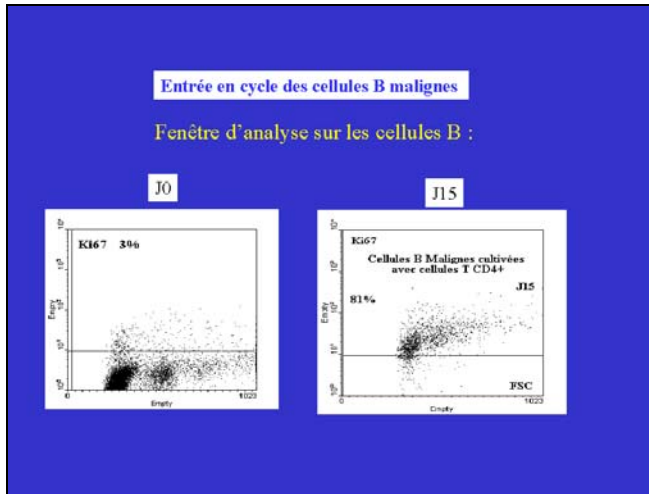
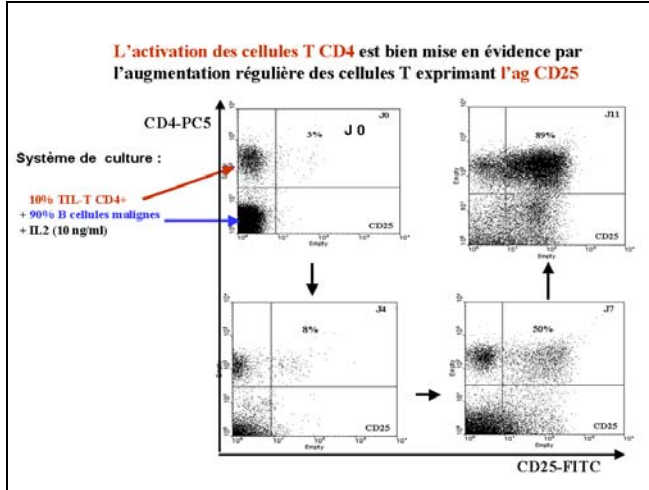
Deuxième Modèle – Lymphome B folliculaire

2) Etudier les fonctions effectrices des PBL-T CD4+ vis-à-vis des cellules B de la lignée tumorale autologue

TIL: Tumor Infiltrating Lymphocytes

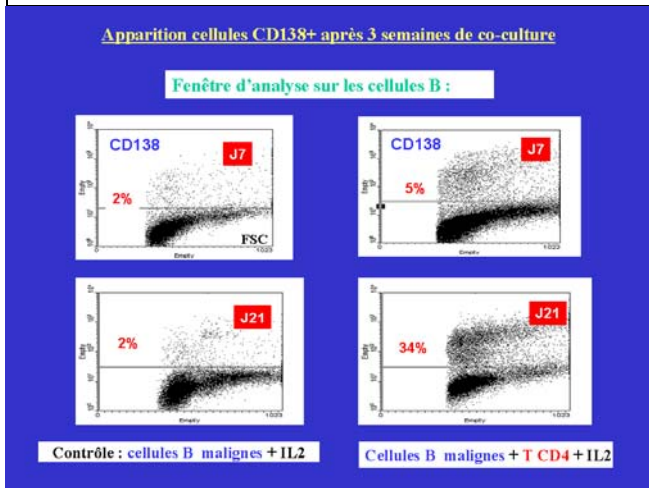
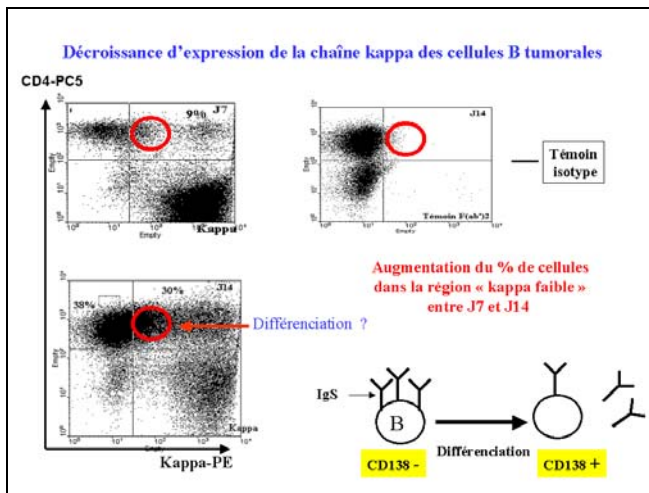
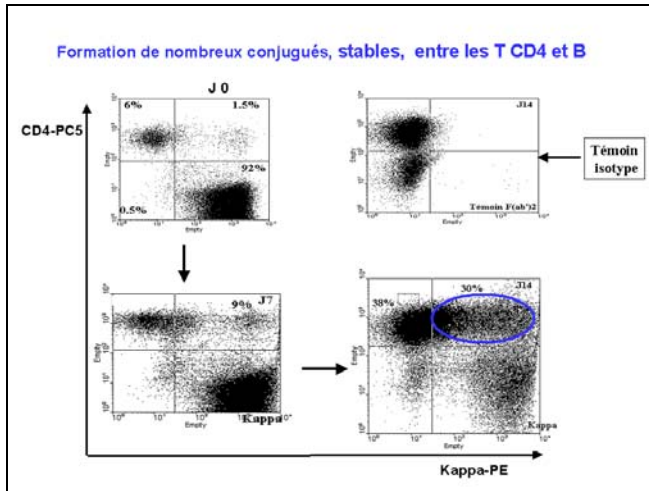
PBL: Peripheral Blood Lymphocytes



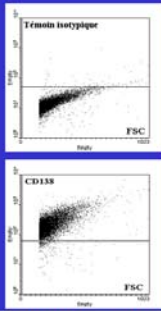


- Premier phénomène: Activation des cellules T
- Deuxième phénomène: Entrée en cycle des cellules B malignes

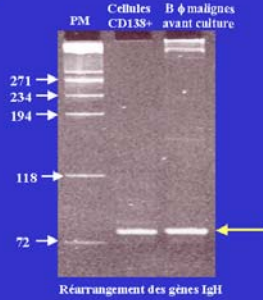
D'autres phénomènes?



Les cellules CD138 positives sont-elles issues du clone B malin initial ?



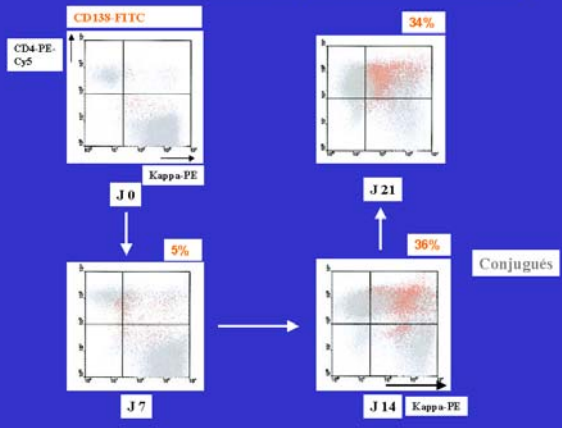
Oui



Purification des cellules CD138 +
(billes immuno-magnétiques - Dynal)

Réarrangement des gènes IgH

Apparition cellules CD138+ après 3 semaines de co-culture

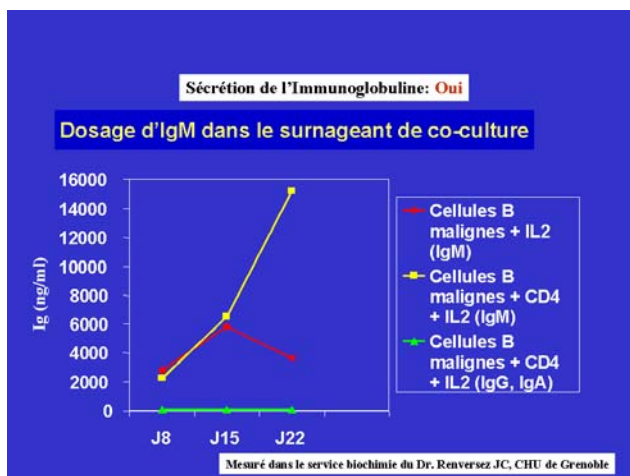
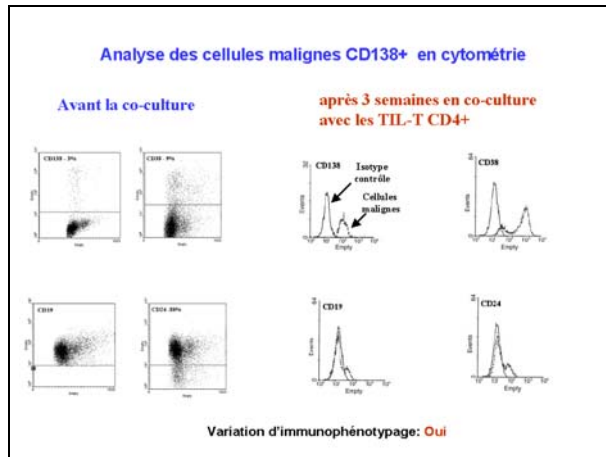
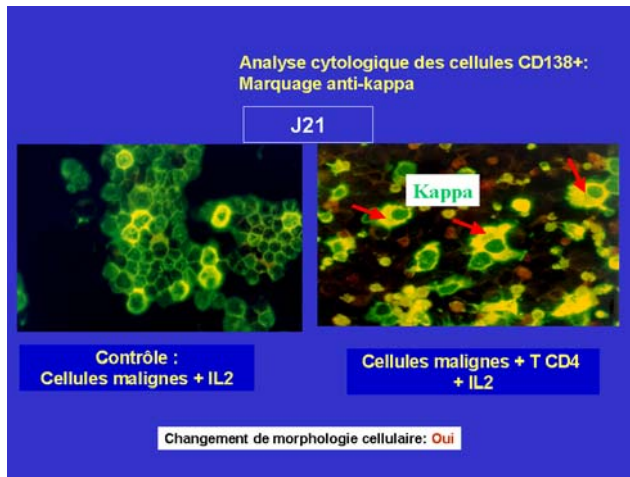


Les cellules malignes CD138+ sont-elles réellement à la phase terminale plasmocytaire ?

Changement de morphologie cellulaire ?

Variation d'immunophénotypage ?

Sécrétion de l'immunoglobuline comme des plasmocytes ?



Conclusion du premier modèle

Dans un modèle de Lymphome B de la zone marginale
Les fonctions effectrices TIL-T CD4+ vis-à-vis des cellules B tumorales

Formation de Conjugés stables ↓ Décroissance d'expression de la chaîne κ des cellules B tumorales

Cellules B tumorales:
Induction d'une différenciation plasmocytaire terminale par les TIL-T CD4+ autologues

Bonnefoix T, Mé JQ & Sotto JJ, Blood (2002) 99:388-90

Deuxième Modèle

Lymphome B folliculaire

Etudier les effets fonctionnels des PBL-T CD4+ vis-à-vis des cellules venant de la lignée B tumorale autologue

PBL: Peripheral Blood Lymphocytes

Cette lignée continue de lymphome B folliculaire a été obtenue dans notre laboratoire

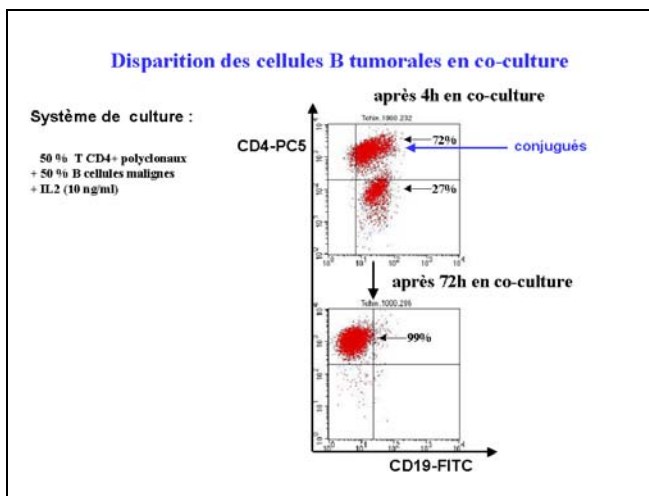
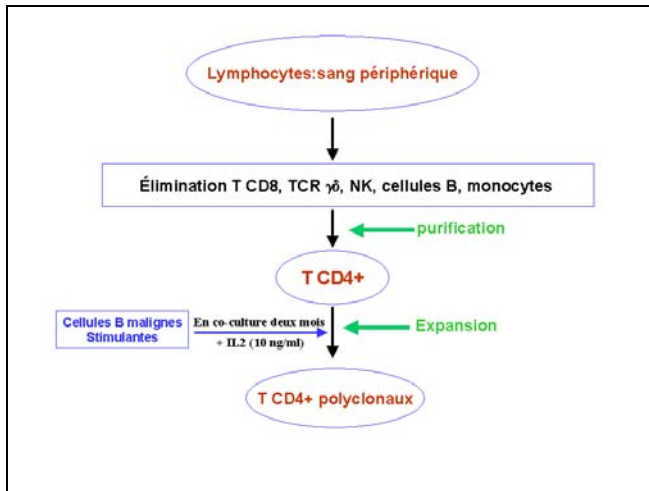
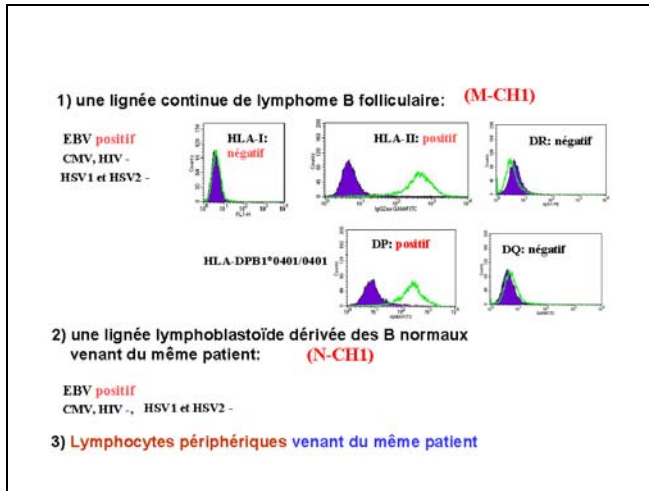
Stratégie originale :

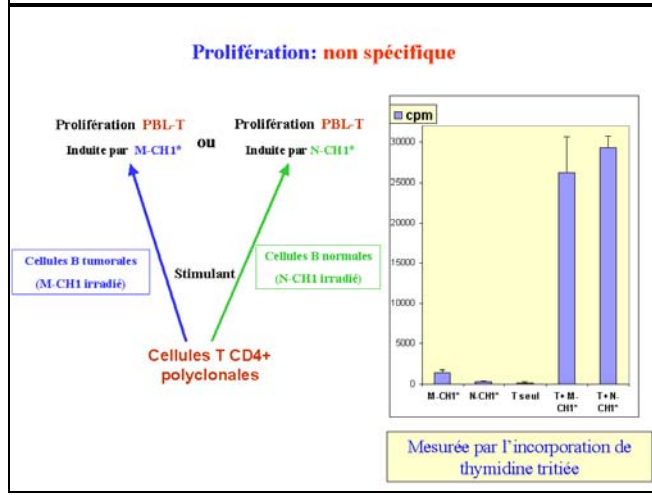
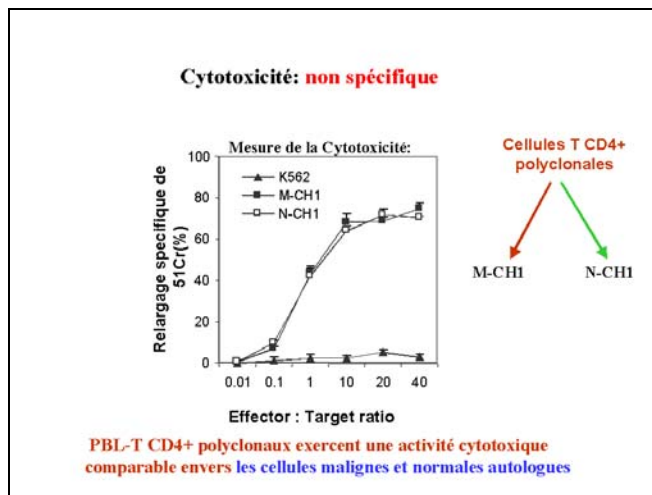
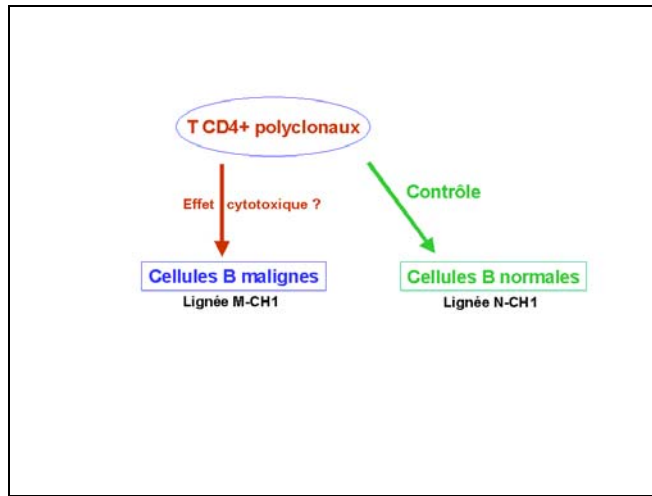
Fragment tumeur ↓ Lignée continue

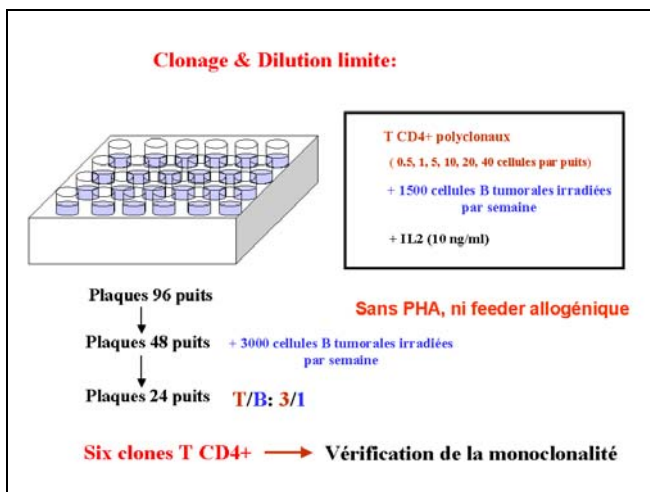
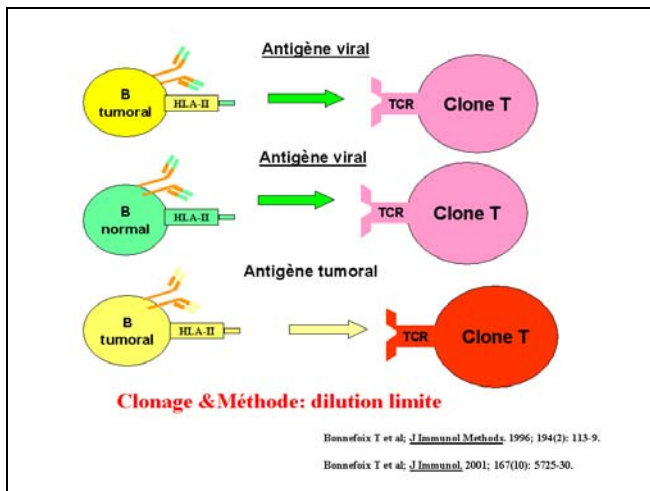
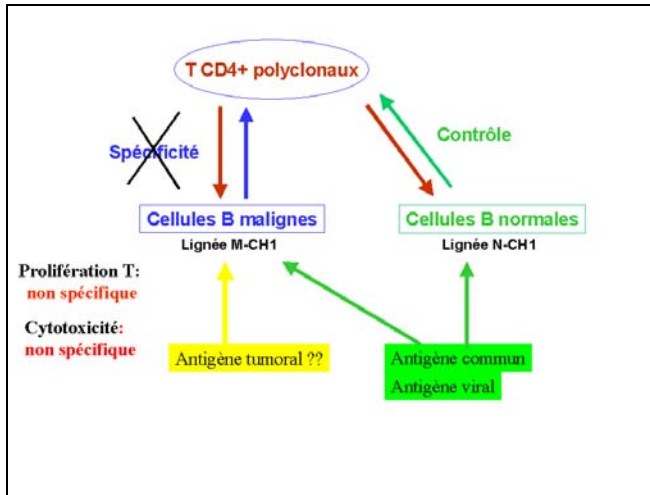
Souris SCID ↓ Culture in vitro 6 mois

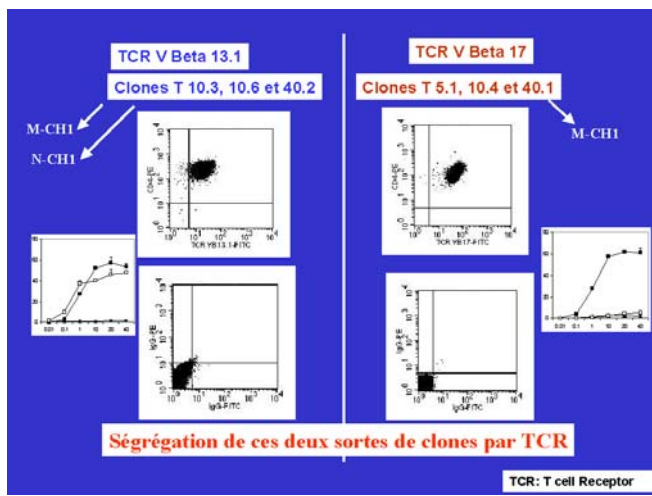
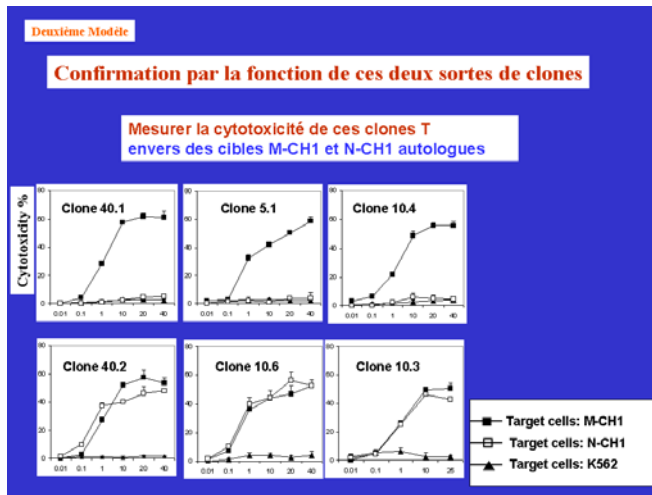
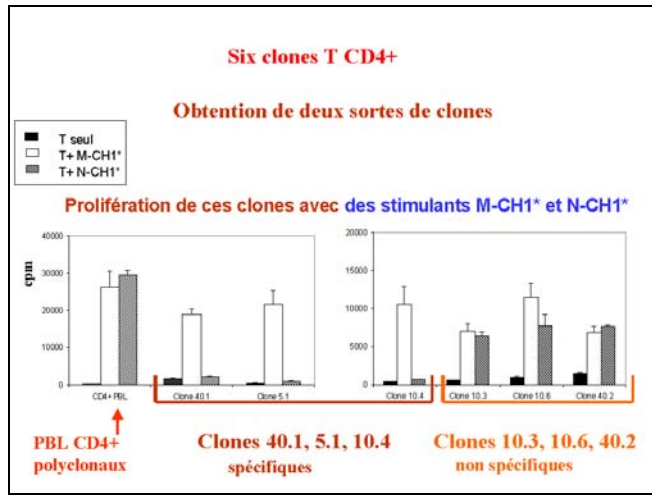
Prise de greffe → 4 passages → In vivo

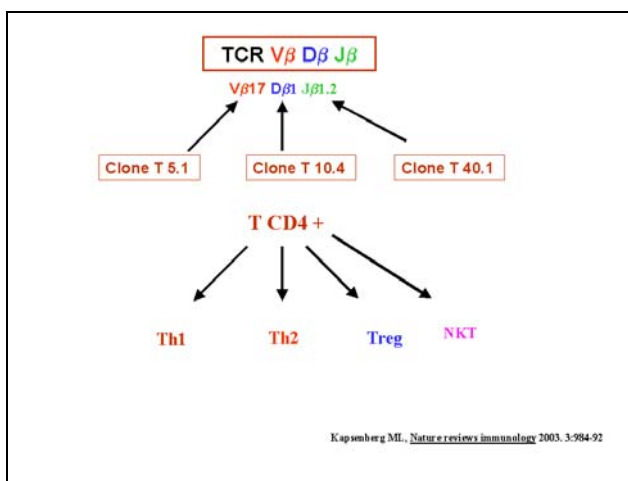
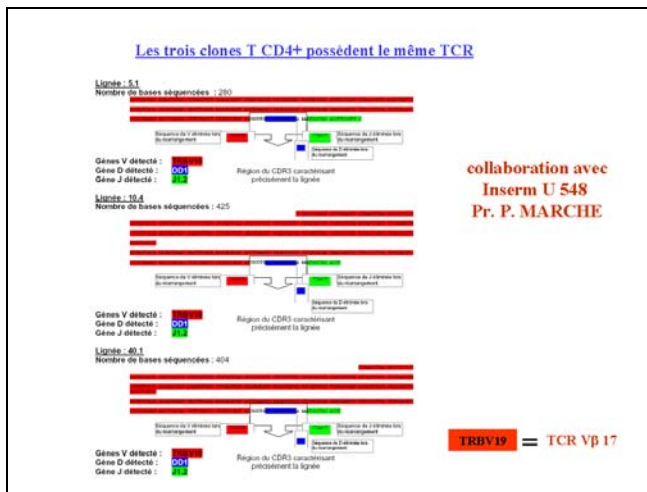
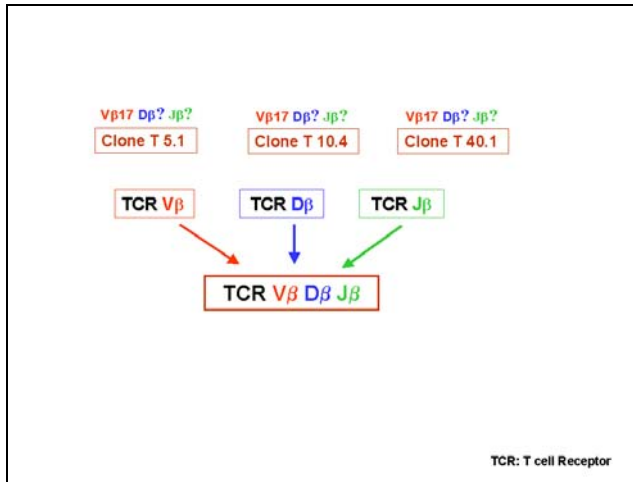
Technique développée par Mme M. Jacrot, MCU, Faculté de Médecine, Grenoble

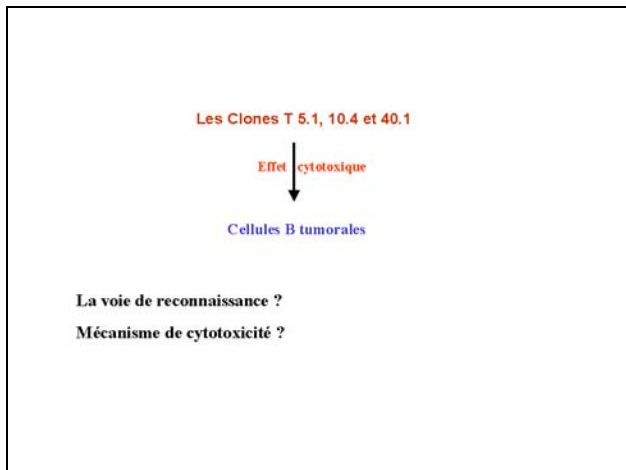
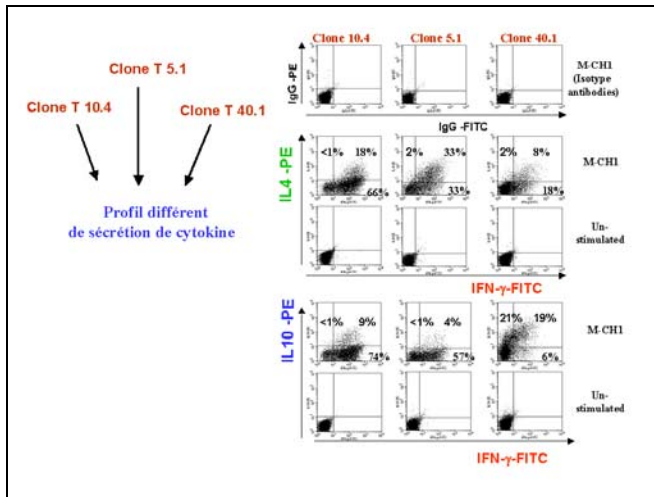
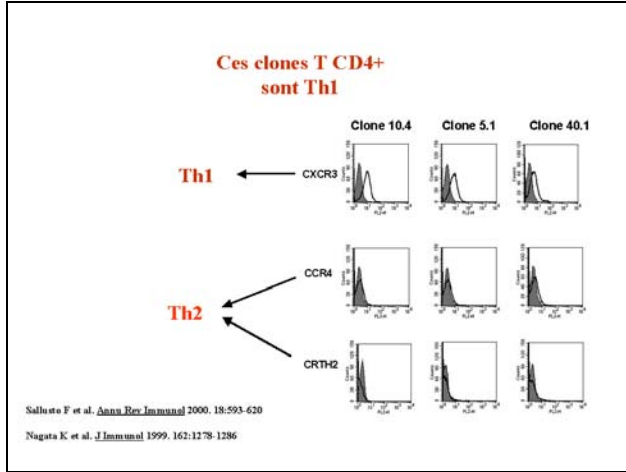


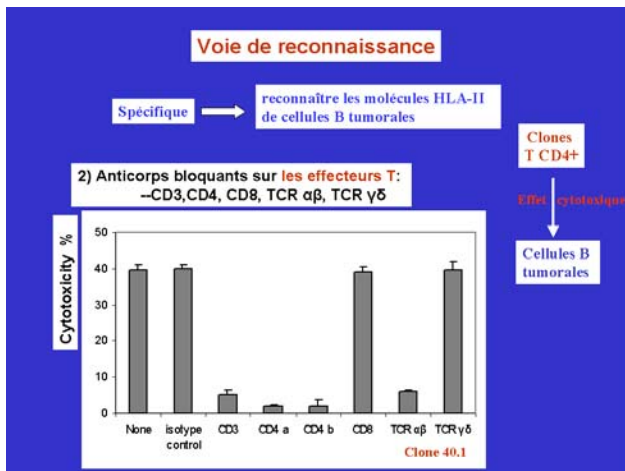
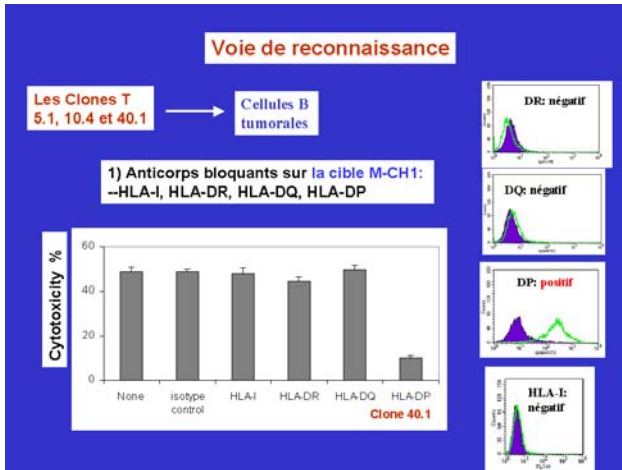
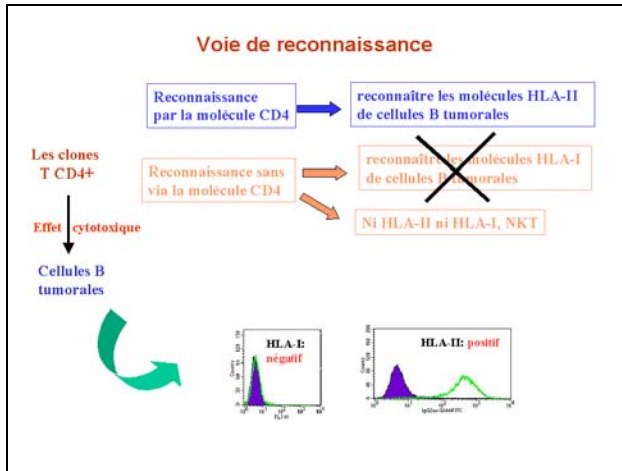


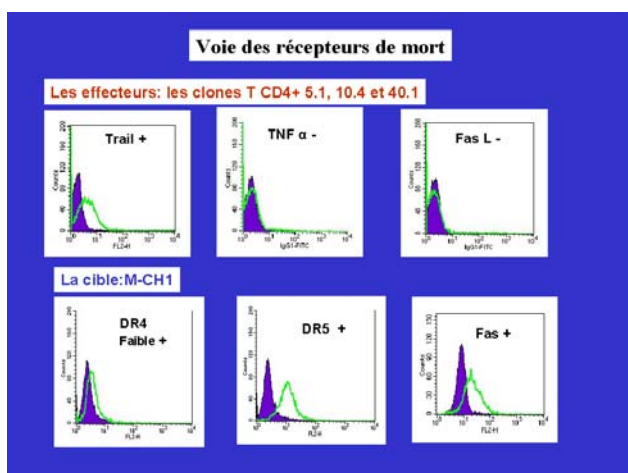
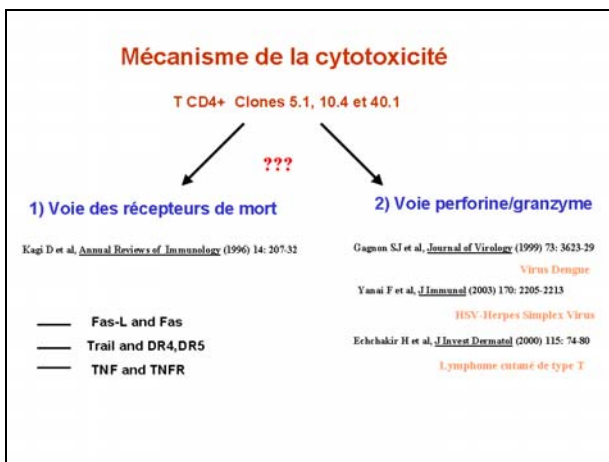
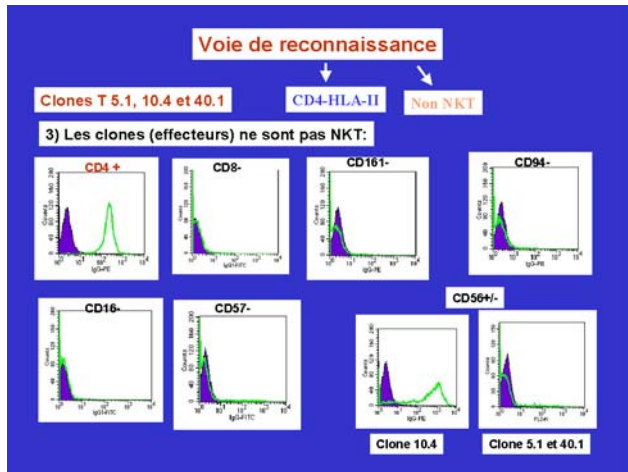


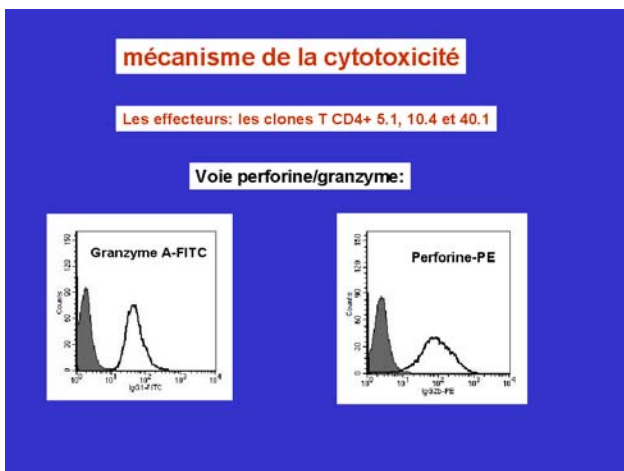
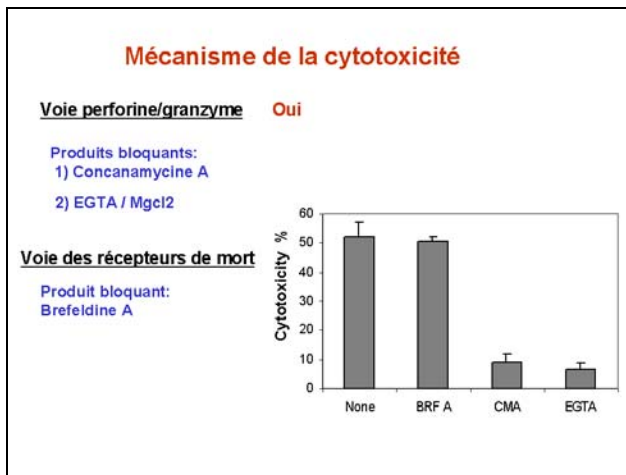
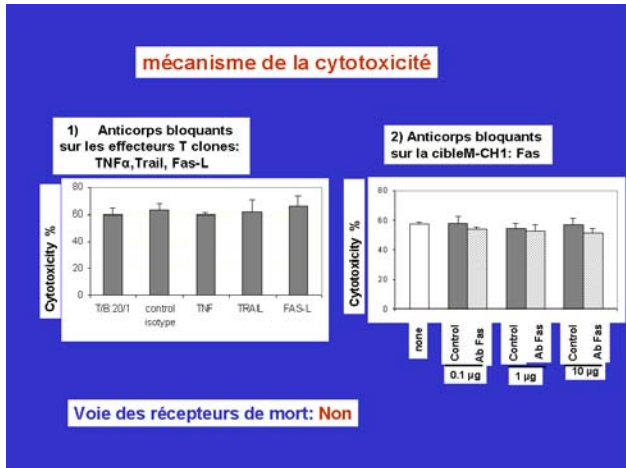












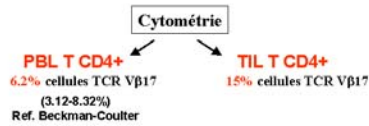
Deuxième Modèle

Conclusions

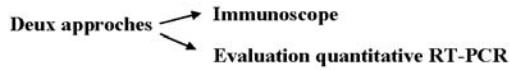
- 1) Obtenir des clones T CD4+ cytotoxiques spécifiques contre la lignée tumorale autologue
- 2) Ces clones possèdent tous TCR V β 17 D β 1 J β 1.2
- 3) Tous les clones sont Th1, cependant ils possèdent un profil de cytokine différent
- 4) La reconnaissance de l'antigène tumoral est spécifique au travers de la molécule HLA - DP
- 5) Mécanisme cytotoxique : voie Perforine/Granzyme

Données complémentaires :

Place in VIVO des clones CD4+ V β 17 obtenus in Vitro ??

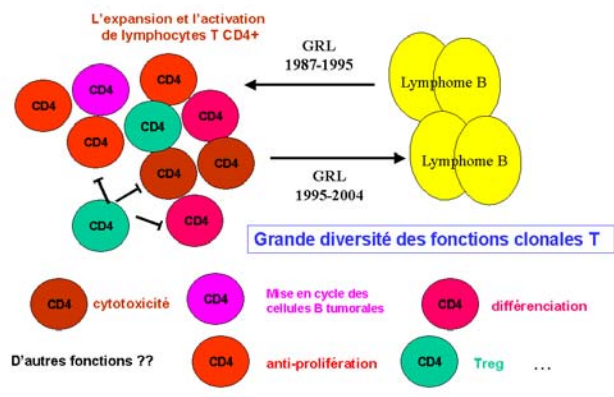


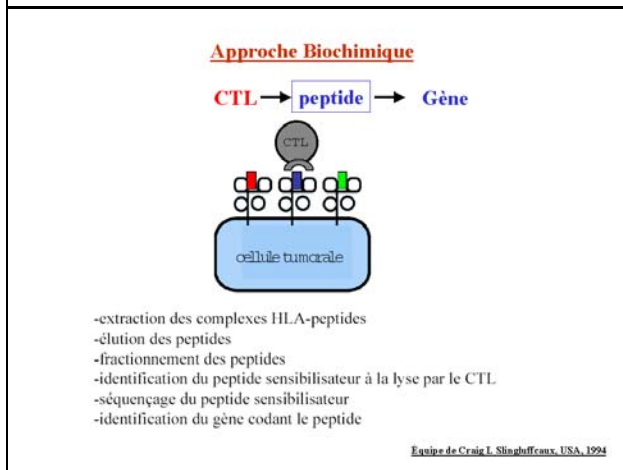
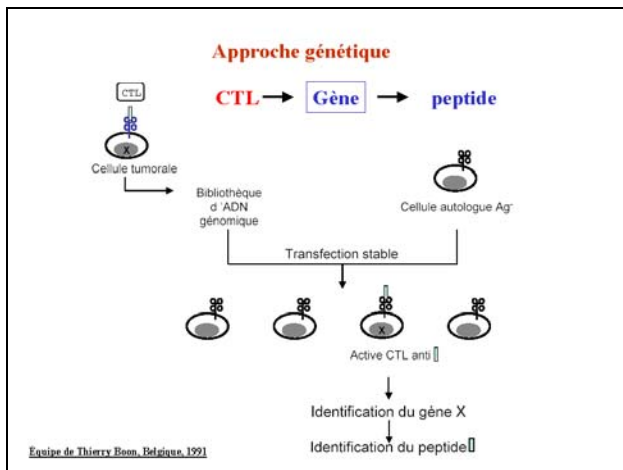
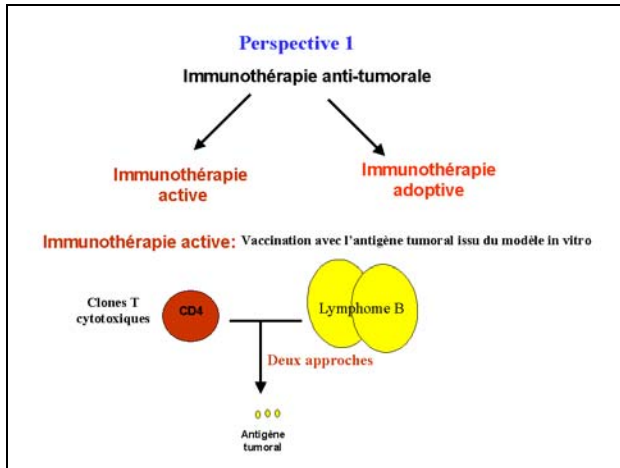
Collaboration avec Inserm U548 du Pr. P. MARCHE:

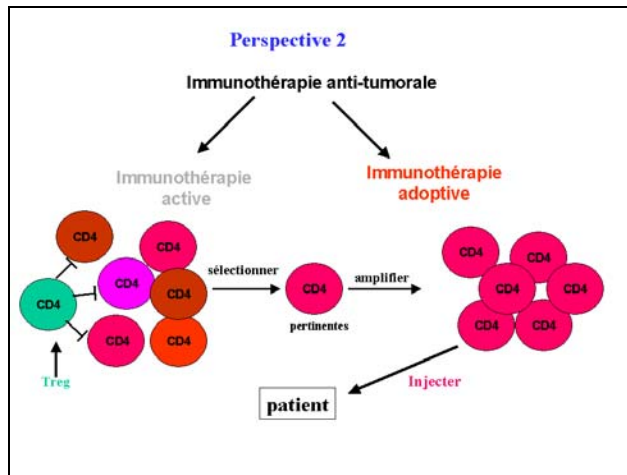


M. JQ & Bonnefoix T. Publication à soumettre

Conclusion générale







Perspective 3

Grande diversité des fonctions clonales T

Problématique particulière des Treg

Méthode par dilution limite

Bonnefoix T, Bonnefoix P, Mi JQ et al; *J Immunol*, 2003; 170(6):2884-94 .
 Bonnefoix T, Bonnefoix P, Perron P, Mi JQ et al; *J Immunol*, 2005; 174(6):3421-31.

Evaluation quantitative des Treg associés aux TIL-T
 (Contrat ARC 2003-2006 - T. Bonnefoix)



INSTITUT ALBERT BONNIOT
ONCOLOGIE ET ONCOGÈNE MOLECULAIRES

Remerciements...



UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
SCIENTES TECHNOLOGIE MÉTIERS

Pr. J.J. SOTTO

Dr. T. BONNEFOIX

Mr. P. PERRON

Toute l'équipe Inserm E353
du Pr. D. LEROUX

EFS site Grenoble du Pr. J.C. BENSÀ
et l'équipe du Dr. M.C.JACOB

Le service d'Hématologie Clinique
du Pr. J.Y. CAHN

Tous les personnels
de l'Institut A. BONNIOT

Mes proches, mes amis...

Collaboration

Inserm
Institut national
de la santé et de la recherche médicale

Inserm U548
Pr. P. MARCHE

