



HAL
open science

Immunosuppression associée à l'enzyme interleukine-4 induced gene 1 (IL4I1) : régulation de l'expression dans les cellules humaines et rôle dans l'échappement tumoral à la réponse immune dans un modèle murin

Fanette Lasoudris

► To cite this version:

Fanette Lasoudris. Immunosuppression associée à l'enzyme interleukine-4 induced gene 1 (IL4I1) : régulation de l'expression dans les cellules humaines et rôle dans l'échappement tumoral à la réponse immune dans un modèle murin. Sciences agricoles. Université Paris-Est, 2011. Français. NNT : 2011PEST0089 . tel-00734087

HAL Id: tel-00734087

<https://theses.hal.science/tel-00734087>

Submitted on 20 Sep 2012

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

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

Université Paris-Est Créteil-Val de Marne
UFR Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-EST

Discipline : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Fanette LASOUDRIS

le 25 mars 2011

Immunosuppression associée à l'enzyme

Interleukin-4 induced gene 1 (IL4I1):

Régulation de l'expression dans les cellules humaines et rôle dans
l'échappement tumoral à la réponse immune dans un modèle murin.

Directeur de Thèse :

Monsieur le Professeur Philippe GAULARD

Co-Directeur de Thèse :

Madame le Docteur Valérie MOLINIER-FRENKEL

JURY

Monsieur le Professeur Eric TARTOUR
Madame le Docteur Armelle PREVOST-BLONDEL
Monsieur le Docteur Pierre LANGLADE-DEMOYEN
Madame le Docteur Flavia CASTELLANO
Monsieur le Professeur Philippe GAULARD
Madame le Docteur Valérie MOLINIER-FRENKEL

Président du Jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de Thèse
Co-Directeur de Thèse

« C'est ce que je fais qui m'apprend ce que je cherche »
Pierre Soulages, peintre de « l'OutreNoir », 1953

*"La souris est un animal qui, tué en quantité suffisante
et dans des conditions contrôlées, produit une thèse de doctorat."*
Woody Allen, réalisateur

REMERCIEMENTS

Je remercie vivement le Professeur **Eric TARTOUR** d'avoir accepté la présidence de ce jury. Je remercie les Docteurs **Pierre LANGLADE-DEMOYEN** et **Armelle PREVOST-BLONDEL** pour avoir accepté d'évaluer ce manuscrit. Je remercie également Armelle pour ses conseils avisés durant les 4 années de collaboration.

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé à Créteil au sein de l'unité INSERM U955 équipe 09 dirigée par le Pr **Philippe GAULARD** auquel j'adresse un grand merci pour m'avoir accueillie et encadrée durant ce travail.

Je remercie également les membres de l'Association pour la Recherche Thérapeutique, Génétique et Immunologique dans les Lymphomes (**ARTGIL**) pour avoir accepté de financer les six derniers mois de ma thèse.

Je remercie mes directrices de thèse les Docteurs **Flavia CASTELLANO** et **Valérie MOLINIER-FRENKEL** pour avoir cru en cette petite étudiante motivée et terriblement anxieuse, arrivée il y a maintenant 6 ans. Malgré quelques divergences, vous m'avez soutenue et guidée dans cette épreuve quotidienne qu'est la thèse, je ne pourrai jamais assez vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Je remercie le Professeur **Karen LEROY**, les Docteurs **Christiane COPIE-BERGMAN**, **Nicolas ORTONNE** et l'ensemble de l'U955 équipe 09 pour leurs conseils avisés lors des réunions d'équipe. Je remercie **Nadine MARTIN**, **Maryse BAIA** et **Céline COUSIN** pour leur amitié, leurs conseils et leur aide technique dans de nombreuses expériences. Je remercie également **Tiphonie AUGUSTE** pour sa capacité à me faire relâcher la pression à 13h. Bon courage à toi pour ta thèse.

Un grand merci à tous les membres des plateformes animalerie et cytométrie de l'IMRB, **Sophia BALUSTRE**, **Adeline HENRI** et **Auréli GUGUIN** qui ont su me guider et m'aider dans mon apprentissage de la recherche. Elles sont toutes les trois devenues des amies. Merci à vous les filles.

Je remercie particulièrement le Docteur **Chrystelle GUITER** pour avoir été un soutien inconditionnel depuis mes premiers pas dans le laboratoire. D'une collègue, tu es très vite devenue une amie et un soutien dans mes nombreuses périodes de doute et d'incertitudes. Prends soin de toi.

Je ne saurais assez remercier deux personnes qui me sont devenues très chères ; le Docteur **Marion TRAVERT** et **Anne DUMAINE**. Dans ces derniers temps si difficiles, vous avez été ma bouée de sauvetage au sein du laboratoire et dans la vie de tous les jours. Vous avez su me comprendre et anticiper les moments de solitude. Merci les filles, j'attends le prochain « rose paradis » avec impatience !!

Je remercie également les anciens du labo qui en sont partis : Les Docteurs **Jeanine MARQUET**, **Yenlin HUANG** et **Coralie CHAISE** pour leur précieux conseils et leur amitié. Coralie, malgré les 800 Km qui nous séparent, tu as su m'épauler dans les derniers moments de la thèse. Je ne saurais assez te remercier pour ta sincère amitié, tes horribles chansons qui me manquent chaque jour un peu plus, nos longues conversations téléphoniques et bien sûr pour *Carbone*.

Un grand merci à mes meilleures amies **Lydie TRIVELLATO** et **Gaëlle LACOUR** qui ont su égayer mes moments de détente et supporter mes crises d'angoisse.

Je ne saurais finir sans remercier ma famille sans qui tout ceci n'aurait jamais été possible. A mes parents **Aline et Louis**, merci à vous pour vos sacrifices, votre écoute, votre sagesse. Votre soutien sans faille pour vos filles, vous fait sans doute passer un énième examen avec moi et je vous en serai toujours reconnaissante. A mes sœurs **Juliette** et **Camille-Charlotte** qui croient en moi plus que moi-même et qui veillent toujours sur leur petite sœur. Merci d'être là pour moi. Une spéciale dédicace à mon beau-frère **Laurent LALOUX** qui a su me « pistonner » pour arriver là où j'en suis. Je remercie également ma belle-sœur **Betty EMATCHOUA** pour sa gentillesse et son écoute attentive à mes plaintes. Une dédicace à mes neveux et nièces **Eléonore**, **Aristide**, **Neela** et le prochain à venir.

INTRODUCTION GENERALE.....9

I-IMMUNITE ANTI-TUMORALE.....10
A. LA THEORIE DE L'IMMUNOSURVEILLANCE..... 10
B. LES ACTEURS DE LA REPOSE ANTI-TUMORALE..... 12
1. La réponse innée..... 12
2. La réponse adaptative..... 18
3. Populations lymphocytaires T non conventionnelles..... 24
II-MECANISMES D'ECHAPPEMENT A LA REPOSE IMMUNITAIRE ANTI-TUMORALE.....27
A. « IMMUNOEDITING » OU IMMUNOSELECTION : LA THEORIE DES TROIS E..... 27
B. LES MECANISMES D'ECHAPPEMENT MIS EN PLACE PAR LES CELLULES TUMORALES..... 31
1. Mécanismes limitant la détection des tumeurs..... 31
2. Mécanismes inhibant les fonctions du système immunitaire..... 35
III-LES ENZYMES IMMUNOSUPPRESSIVES.....56
A. LE METABOLISME DE L'ARGININE : ARGINASES ET SYNTHETASES DE L'OXYDE NITRIQUE..... 56
1. Les arginases (Arg)..... 57
2. Les synthétases de l'oxyde nitrique (NOS)..... 61
3. Coopération de l'Arg I et de iNOS dans l'immunosuppression..... 64
B. METABOLISME DU TRYPTOPHANE : L'INDOLEAMINE 2,3-DIOXYGENASE (IDO)..... 66
1. Structure de la protéine IDO..... 67
2. Fonctions de la protéine IDO..... 69
B. METABOLISME DE LA PHENYLALANINE : INTERLEUKINE 4-INDUCED GENE 1..... 74
1. Les oxydases des L-acides aminés..... 74
2. L'enzyme Interleukin 4-induced gene 1 (IL4I1.)..... 77
D. AUTRES ACIDES AMINES IMPLIQUES DANS L'IMMUNOSUPPRESSION : L-CYSTEINE, L-GLUTAMINE ET L-HISTIDINE..... 83
IV-OBJECTIFS DE TRAVAIL85

RESULTATS87

I-DICHOTOMIE D'EXPRESSION ET D'ACTIVATION DE LA PROTEINE IL4I188
II-ROLE IMMUNOMODULATEUR DE LA PROTEINE IL4I1 DANS LE DEVELOPPEMENT TUMORAL102
A. MISE EN PLACE D'UN MODELE D'ETUDE DE L'EXPRESSION D'IL4I1 PAR LA TUMEUR..... 102
III-ETUDE STRUCTURE/FONCTION DE LA PROTEINE IL4I1138
A. INTRODUCTION..... 138
B. MATERIELS ET METHODES..... 139
1. Mutagenèse dirigée de la protéine IL4I1..... 139
2. Transformation bactérienne..... 140
3. Extraction plasmidique et Séquençage de l'ADN obtenu..... 140
4. Lignée cellulaire et transfection des plasmides mutés dans les cellules B16GP33..... 140
5. Caractérisation de l'expression d'IL4I1 dans les clones développés..... 141
6. Caractérisation de l'activité enzymatique de la protéine IL4I1 exprimée..... 142
C. RESULTATS..... 143
1. Développement des mutants IL4I1..... 143
2. La sécrétion des mutants DeltaPS, E478A et le double mutant R129A/E478A est diminuée... 145
3. Les mutations DeltaPS, E478A et la double mutation R129A/E478A modifient l'activité de la protéine IL4I1..... 146
4. Tous les mutants présentent un défaut de cinétique de sécrétion..... 147
D. CONCLUSION..... 148

<u>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u>	<u>149</u>
<u>ANNEXE</u>	<u>156</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>217</u>

LISTE DES ABBREVIATIONS

1-MT	1-méthyl tryptophane
3-HAA	3-Hydroxyanthranilic Acid
α -GalCer	α -galactosylcéramide
AIP	Apoptosis inducing protein
ARG1	Arginase 1
AP1	Activator protein
β 2-m	β 2-microglobuline
CIITA	Proteine transactivatrice de classe I
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CpG	oligodeoxynucléotides riche en GC
CSF	Colony stimulating factor
CTL	Lymphocyte T cytotoxique
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphoma-associated Antigen 4
DAMP	Damage-Associated Molecular Patterns
DC	cellule dendritique
EAE	Encephalomyélite auto-immune experimentale
eNOS	Synthétase de l'oxyde nitrique endothéliale
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FDA	Food and Drug Administration
FAS-L	Fas ligand
FoxP3	Forkhead box protein 3
GAS	IFN γ -activated site
GCN2	General Control Nonrepressed 2
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
gp33	Epitope de la glycoprotéine du virus de la chorioméningite
lymphocytaire	
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HLA	Human Leukocyte Antigen
HMGB1	High mobility group box1
HSP	Heat shock protein
IAP	Inhibitor Apoptosis Protein
iDC	Cellule dendritique immature

IDO	Indoléamine 2,3 Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IL411	Interleukin 4 induced gene 1
IL-4 R α 1	Chaîne alpha commune du récepteur à l'interleukine 4 et 13
iNKT	Cellule NKT invariante
iNOS	Synthétase de l'oxyde nitrique Inductible
IRF-1	IFN-regulatory factor I
ISRE	IFN-stimulated response elements
KIR	Killer-cell immunoglobulin-receptor
KO	Knock out
L-NMMA	NG-monométhyl-L-arginine (L-NMMA),
L-NAME	NG-nitro-L-arginine-méthyl-ester (
LAAO	Activité L-Amino-Acid Oxydase
LCMV	Virus de la Chorioméningite Lymphocytaire
LMP	Low molecular mass polypeptide
LPS	Lipopolysaccharides
MART1	Melanoma antigen recognize by T cell 1
MCA	Methylcholanthrène
MCP-1/CCL2	Monocyte chimoattractant protein 1
MDSC	myeloid derived suppressor cells
MIP-1 β /CCL4	Macrophage Inflammatory Proteins
mNOS	Synthétase de l'oxyde nitrique mitochondriale
MOA	Monoamines Oxydases
MTOC	Centre organisateur des microtubules
mTOR	Mamalian Target Of Rapamicyn
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NCR	Natural Cytotoxicity Recptors
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
NK	Cellules Natural Killer
NKT	Natural killer T
nNOS	Synthétase de l'oxyde nitrique neuronale
NO	oxyde nitrique

Nor-NOHA	N-hydroxy-nor-L-arginine
ONOO-	Peroxynitrites
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PD-1/PDL1	Programmed cell Death 1/Programmed cell Death ligand 1
PDGF	Platelet derived growth factor
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
SCF	Stem cell factor
SDF-1	Stromal cell-derived factor-1
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SHP-2	SH-2 domain-containing protein tyrosine phosphatase
TAM	Tumor associated macrophage
TAN	Tumor infiltrating neutrophil
TAP	Transporter associated with antigen processing
T-bet	T-box transcription factor
TCR	T-cell receptor
TDO	Tryptophane 2,3-dioxygenase
TFH	Cellules T follicular helper
TGF	Transforming growth factor
Th	T helper
TIL	Tumor infiltrating lymphocyte
TLR	Toll like receptor
TNF/TNFR	Tumor necrosis factor/tumor necrosis receptor
TNM	Tumeur primitive, ganglions régionaux et métastases
TRAIL	TNR related associated inducing ligand
Treg	Lymphocytes T régulateurs
TRP-2	Tyrosinase related protein 2
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

INTRODUCTION GENERALE

I-IMMUNITE ANTI-TUMORALE

A. La théorie de l'Immunosurveillance.

Le système immunitaire a pour fonction de maintenir l'intégrité des cellules et des tissus face aux agressions endogènes et aux substances étrangères et agents infectieux auxquels l'organisme est exposé.

Depuis l'apparition des premiers concepts à la fin du XIXème siècle, la notion d'immunité anti-tumorale a été très controversée. C'est en 1891 au *Memorial Hospital* de New York que le chirurgien William Coley constate chez un patient la régression spontanée d'un sarcome de stade avancé à l'occasion d'un épisode infectieux. Fort de cette observation, il met au point une stratégie visant à stimuler le système immunitaire avec des extraits bactériens et obtient des régressions tumorales après des inoculations répétées. Ces premiers résultats encourageants l'amènent à développer la première « immunothérapie » anti-tumorale consistant en un mélange inactivé de bactéries Gram positives (*Streptococcus pyogenes*) et Gram négatives (*Serratia marcescens*), la toxine de Coley. Des idées similaires apparaissent chez ses contemporains. Ainsi, en 1909, Paul Ehrlich prédit que le système immunitaire doit être capable de réprimer la croissance de carcinomes grâce à des molécules chimiques ciblant les tumeurs, les « magic bullets », initiant ainsi plus d'un siècle de débats [Dunn et al. 2004].

Il a fallu attendre les années 50-60, et une meilleure compréhension de la transplantation, de l'immunobiologie des tumeurs et de l'immunogénétique pour que soit formulée la théorie de l'immunosurveillance du cancer par Frank Macfarlane Burnet et Sir Lewis Thomas [Burnet 1967]. Cette théorie propose que l'apparition de cellules tumorales chez l'homme soit un phénomène fréquent, détectable par le système immunitaire. Ainsi, la réponse immunitaire permettrait de détruire les cellules transformées avant le développement clinique des tumeurs. Par la suite, de nombreuses expérimentations ont tenté de valider cette hypothèse.

A la fin des années 70, la caractérisation de la souris Nude athymique, qui présente une diminution significative du nombre de lymphocytes T, a constitué un modèle d'étude important. Osias Stutman a montré que l'incidence des tumeurs spontanées ou chimiquement induites n'était pas significativement augmentée chez cette souris

immunodéprimée [Stutman 1979]. Ces résultats, confirmés par d'autres équipes, ont conduit à l'abandon de la théorie de l'immunosurveillance. On sait aujourd'hui que les souris Nude représentent un modèle imparfait d'immunosuppression. En effet, en dépit de l'absence de thymus, elles conservent un nombre de lymphocytes T suffisant pour induire une réponse dépendante des T et présentent une forte augmentation des cellules de la réponse innée compensatoire.

Dans les années 90, de nouvelles avancées technologiques dans la génétique de la souris, permettant la production de souris invalidées pour des gènes clés de la réponse immunitaire, et dans la production d'anticorps monoclonaux, ciblant les molécules codées par ces gènes, vont enfin permettre de démontrer le rôle du système immunitaire dans la réponse anti-tumorale. Une augmentation de l'incidence du développement tumoral en absence d'interféron γ (IFN γ) fonctionnel a ainsi pu être démontrée [Dighe et al. 1994; Street et al. 2002]. Des résultats similaires ont été observés pour la perforine, composant des granules cytotoxiques des cellules T CD8⁺ et « Natural Killer », ou la recombinaison RAG2, intervenant dans le réarrangement des récepteurs antigéniques des lymphocytes T (TCR) et B [Shankaran et al. 2001; Street et al. 2002]. L'ensemble de ces résultats indique un rôle protecteur des cellules NK et des lymphocytes T de type Th1 et T cytotoxiques vis-à-vis de l'apparition des tumeurs.

Parallèlement, différentes études épidémiologiques ont été menées chez l'homme. On observe chez des patients immunodéprimés une augmentation du nombre de cas de cancers rares, viro-induits, tels que les lymphomes liés au virus d'Epstein Barr ou encore le sarcome de Kaposi associé au virus de l'herpès de type 8 [Penn 1988], soulignant le rôle de l'immunité anti-virale dans le contrôle de ces tumeurs. Cependant, des études plus récentes de larges cohortes de patients sous traitement immunosuppresseur ou infectés par le Virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ont permis de constater une augmentation à long terme de la fréquence de tumeurs non viro-induites, habituellement observées dans la population générale [Simard et al. 2010; Simard et al. 2010]. Le rôle du système immunitaire dans le contrôle du développement des cancers est donc aujourd'hui admis.

De nombreuses études ont montré chez l'animal que l'immunité cellulaire est majoritairement responsable du rejet des tumeurs. Chez l'homme, la présence d'un infiltrat lymphocytaire dense de type Th1 et CD8⁺ *in situ* dans les tumeurs solides est associé à un meilleur pronostic [Galon et al. 2007; Pages et al. 2008; Pages et al. 2009]

B. Les acteurs de la réponse anti-tumorale.

1. La réponse innée.

La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense de l'organisme contre les cellules tumorales. Elle implique des cellules qui ne reconnaissent pas spécifiquement l'antigène et qui ne nécessitent donc pas de sensibilisation préalable.

- Les cellules phagocytaires.

Les cellules phagocytaires regroupent les polynucléaires et les macrophages. Ces cellules sont capables d'exercer leurs propriétés phagocytaires vis-à-vis des cellules tumorales directement ou après activation du complément. De telles propriétés participent à l'effet thérapeutique des anticorps monoclonaux ciblant des molécules de surface des cellules lymphomateuses (anticorps anti-CD20, utilisé dans le traitement de nombreux lymphomes B) [Glennie et al. 2007]. De plus, elles expriment ou sécrètent des ligands des récepteurs de mort tels que le Fas Ligand (FasL) ou TNF related associated inducing ligand (TRAIL) et peuvent induire la mort cellulaire par libération d'oxyde nitrique (NO) et/ou de dérivés oxygénés [Allavena et al. 2008].

Lorsqu'ils ont été stimulés de façon adéquate, les phagocytes mononucléés, macrophages et cellules dendritiques, présentent également une activité antitumorale *via* la sécrétion d'IFN de type I (α et β). Par exemple, la protéine nucléaire « high mobility group box 1 » (HMGB1), libérée par les cellules tumorales nécrotiques, induit les macrophages à sécréter des IFN de type I ainsi que d'autres cytokines proinflammatoires, telles que le Tumor necrosis factor α (TNF α) et l'interleukine 6 (IL6) [Scaffidi et al. 2002; Lotze et al. 2005]. L'IFN α peut moduler les effecteurs de la réponse immunitaire en activant les cellules NK, les macrophages, et les cellules dendritiques et en augmentant la génération, la survie et l'activité cytotoxique des lymphocytes T [Marrack et al. 1999; Matikainen et al. 1999; Palmer et al. 2000]. L'IFN α peut également inhiber la croissance tumorale. Il diminue l'expression des oncogènes et augmente l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) permettant une meilleure reconnaissance par le système immunitaire

adaptatif [Gutterman 1994]. L'IFN α est utilisé en clinique pour le traitement des patients atteints de mélanomes métastatiques [Di Pucchio et al. 2006; Rizza et al.].

- Les polynucléaires éosinophiles.

En conditions physiologiques, les éosinophiles sont principalement retrouvés au niveau des muqueuses. Ils sont activés en présence de complexes immuns et exercent une activité cytotoxique *via* la libération de granules riches en enzymes. Ils sont essentiellement impliqués dans la défense contre les infections par les helminthes.

Le recrutement de polynucléaires éosinophiles par la tumeur est observé dans différents types de cancers et notamment les carcinomes [Lotfi et al. 2007]. Leur présence est associée à un meilleur pronostic des cancers ORL [Goldsmith et al. 1992; Dorta et al. 2002; Fujii et al. 2002], des cancers gastro-intestinaux [Ishibashi et al. 2006], et des cancers colorectaux [Nielsen et al. 1999; Fernandez-Acenero et al. 2000]. Une étude récente a montré que les éosinophiles humains sont capables d'interagir directement avec les cellules tumorales de la lignée de carcinome colorectal Colo-205 via un contact CD11b/CD18. Le contact avec la cellule tumorale induit la libération par l'éosinophile de TNF α et de la molécule cytotoxique granzyme A, lui permettant d'exercer une fonction tumoricide [Legrand et al. 2010].

- Les cellules « Natural Killer ».

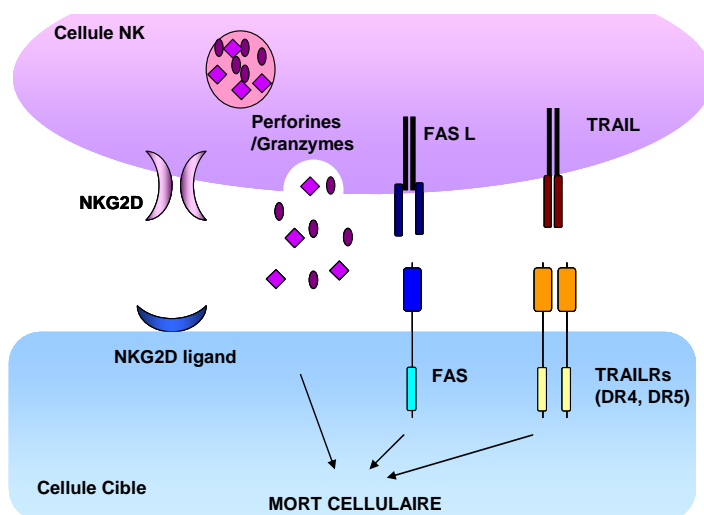
Les cellules NK reconnaissent leurs cellules cibles indépendamment des antigènes exposés sur les molécules de CMH. L'activation des cellules NK est immédiate et déclenche la cytotoxicité ou la production de cytokines telles que l'IFN γ . Ces cellules sont traditionnellement classées parmi les effecteurs innés, cependant des données récentes indiquent qu'elles pourraient conserver la mémoire d'activations antérieures [Vivier et al. 2011]

Les cellules NK sont considérées comme des acteurs majeurs de la réponse contre les cellules infectées par des virus et contre les cellules tumorales. Leur activation est contrôlée par l'équilibre entre des signaux activateurs et inhibiteurs [Lanier 2005]. L'expression des molécules de CMH-I du soi est un attribut commun des cellules normales qui conduit à l'engagement à la surface des cellules NK de récepteurs inhibiteurs, tels que

les récepteurs de la famille des « Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors » (KIR), et le dimère CD94/NKG2A. La perte d'expression de tout ou partie des molécules de CMH-I est, en revanche, fréquente au cours du processus de transformation cellulaire [Piontek et al. 1985; Ljunggren et al. 1990]. De plus, les cellules tumorales peuvent exprimer des ligands pour les récepteur activateurs de type « Natural Cytotoxicity Receptors » (NCR) ou NKG2D. L'équilibre des signaux penche alors en faveur de l'activation des cellules NK conduisant à la lyse des cellules tumorales, phénomène qui est aisément mis en évidence *in vitro*. [Lanier 2005].

Les molécules CMH-I non classiques MICA et MICB représentent les principaux ligands de NKG2D. Ils sont retrouvés constitutivement exprimés sur de nombreuses tumeurs, incluant des hémopathies malignes aussi bien que des tumeurs d'origine épithéliale [Diefenbach et al. 2003; Bahram et al. 2005]. L'expression de ces ligands est également augmentée dans les cellules cancéreuses en réponse aux dommages de l'ADN induits par les radiations ionisantes ou les agents alkylants [Coudert et al. 2006].

La lyse des cellules tumorales fait intervenir plusieurs mécanismes identiques à ceux utilisés par les lymphocytes T cytotoxiques (cf page 21), tels que l'activation des récepteurs de mort de la famille TNF (Fas-L, TRAIL) et la libération de granules cytotoxiques contenant les molécules perforine et granzyme [Whiteside et al. 1995] (Figure 1).



D'après Hayakawa et Smyth. *Adv Can Res.* 2006

Figure 1: Fonctions cytotoxiques des cellules NK.

La reconnaissance de la cellule cible est induite par la liaison du récepteur activateur NKG2D avec ses ligands (MICA, MICB) exprimés à la surface des cellules tumorales cibles. Les cellules NK une fois activées induisent la mort de la cellule cible à travers différents mécanismes incluant la libération de granules cytotoxiques contenant perforines et granzymes. Ils expriment également à leur surface les ligands des récepteurs de mort de la famille des TNFR (FASL et TRAIL). La liaison de ces ligands avec les récepteurs de mort à la surface de la cellule cible induit l'activation de la voie des caspases.

Les cellules NK circulent dans le sang, la lymphe et peuvent être attirées au site de la tumeur par des chimiokines inflammatoires telles que MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1)/CCL2, MIP-1β (Macrophage Inflammatory Protein-1β)/CCL4 et

RANTES/CCL-5. Les cytokines inflammatoires IL-12, IL-18, IL-15 et IFN de type I sécrétées par les cellules dendritiques stimulent la prolifération, la production d'IFN γ , TNF α et Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) et les fonctions cytotoxiques des cellules NK [Ferlazzo et al. 2002].

Le rôle des cellules NK dans l'immunosurveillance anti-tumorale a notamment été mis en évidence *in vivo* chez les souris portant la mutation homozygote *beige*. Ces souris qui possèdent des NK dépourvus d'activité lytique, ont une incidence élevée de tumeurs spontanées ou induites [Karre et al. 1980; Karre et al. 1980; Talmadge et al. 1980]. Une augmentation du nombre de lymphomes spontanés et de sarcomes induits par des carcinogènes est également observée chez des souris déficientes en perforine [van den Broek et al. 1996; Smyth et al. 2000]. Il a été montré que l'IL-21 (cytokine de la famille de l'IL-2 et de l'IL-15, produite par les NKT et les lymphocytes T CD4⁺ de type Th17) augmente l'activité cytotoxique et la production d'IFN γ des cellules NK murines [Kasaian et al. 2002]. En accord avec cette observation, un traitement *in vivo* par l'IL-21 induit une forte augmentation de l'activité anti-tumorale des cellules NK [Ma et al. 2003; Brady et al. 2004].

Les cellules NK pourrait également agir en stimulant l'induction de la réponse adaptative. La lyse des cellules tumorales par les cellules NK génère des débris potentiellement phagocytés par les cellules présentatrices d'antigène professionnelles ce qui facilite la présentation d'antigènes tumoraux aux lymphocytes T [Mocikat et al. 2003]. En accord avec cette hypothèse, l'élimination des cellules NK murines à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine NK1.1, inhibe la génération de lymphocytes T cytotoxiques anti-tumoraux [Kurosawa et al. 1995].

- Les cellules dendritiques à l'interface de la réponse immunitaire innée et adaptative.

Les cellules dendritiques (DC) constituent une population cellulaire hétérogène essentielle à l'orchestration des réponses immunitaires innée et adaptative. Les cellules dendritiques immatures (iDC) sont stratégiquement localisées au niveau des barrières muqueuses et dans les tissus conjonctifs de la plupart des organes, où elles jouent le rôle de sentinelles du système immunitaire. Grâce à des récepteurs spécifiques, elles sont, en effet, capables de détecter des motifs moléculaires associés aux pathogènes (« Pathogen-

Associated Molecular Patterns » [PAMP]) ou des signaux de danger (« Damage-Associated Molecular Patterns » [DAMP]) émis par les cellules soumises à un stress. De plus, elles sont pourvues d'une grande capacité d'endocytose et phagocytose. Les iDC sont capables de se mobiliser très rapidement (en moins d'une heure) au site d'une inflammation, en réponse à la production locale de chimiokines [McWilliam *et al.* 1994; McWilliam *et al.* 1996]. Une fois activées, les iDC engagent le processus de maturation qui comprend de nombreux changements morphologiques et fonctionnels. Elles perdent les structures adhésives, réorganisent leur cytosquelette et acquièrent une mobilité cellulaire importante. L'expression des récepteurs aux chimiokines (CCR7, CXCR4 et CCR4) leur permet de migrer dans les organes lymphoïdes secondaires [Winzler *et al.* 1997; Ueno *et al.* 2007]. Elles perdent leurs récepteurs de phagocytose et augmentent leur capacité à présenter les antigènes. De plus, elles induisent l'expression de molécules de costimulation telles que le CD40, le CD80 et CD86 et sécrètent de nombreuses cytokines qui vont leur permettre d'activer la différenciation des lymphocytes T spécifiques des antigènes qu'elles présentent à la surface de leurs molécules de CMH.

De nombreuses études *in vitro* ont montré que les cellules nécrotiques peuvent induire une activation des DC [Mocikat *et al.* 2003]. Les molécules activatrices endogènes responsables de cette maturation, les DAMP, incluent les « heat shock proteins » (HSP), la protéine nucléaire HMGB1, les β -défensines et l'acide urique [Bianchi 2007] (**Figure 2**).

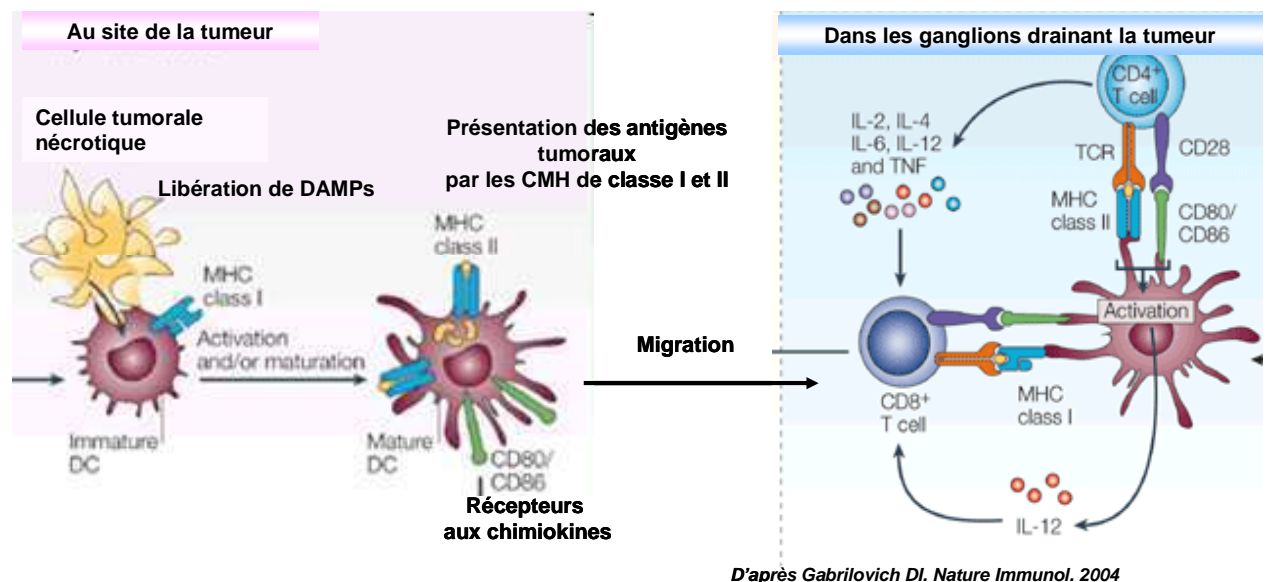


Figure 2: Activation des cellules dendritiques et déclenchement de la réponse immunitaire adaptative.

Au sein de la tumeur, les cellules tumorales nécrotiques activent les cellules dendritiques par la libération de DAMPs. Après activation, les cellules dendritiques qui ont capturés les antigènes tumoraux vont maturer et exprimer à leur surface les molécules de costimulation CD80/CD86 et des récepteurs aux chimiokines (CCR7, CXCR4, CCR4) qui vont leur permettre de migrer vers le ganglion drainant la tumeur. Au sein du ganglion, elles vont activer les lymphocytes T CD4+ et CD8+ spécifiques des antigènes tumoraux qu'elles leur présentent via les molécules CMH de classe I et II.

Les DAMP sont habituellement des molécules intracellulaires qui acquièrent des propriétés immunostimulantes lorsqu'elles sont exposées ou sécrétées par les cellules endommagées ou mourantes [Garg *et al.* 2010]. Une fois accessibles, les DAMP peuvent se lier à différents récepteurs, tels que les « Toll-like receptors » (TLR). Par exemple, HMGB1 se lie aux TLR2 et 4 [Messmer *et al.* 2004; Park *et al.* 2004; Apetoh *et al.* 2007].

La forte activation des DC induite par les DAMP a suscité l'utilisation de certains d'entre eux (HMGB1, HSP70, grp96, HSP90) comme adjuvants vaccinaux chez l'homme et la souris [Srivastava *et al.* 1991; Rovere-Querini *et al.* 2004; Apetoh *et al.* 2007]. D'autres types de ligands des récepteurs activateurs des DC (PAMP ou analogues synthétiques) ont connu un développement similaire. Par exemple, l'équipe de R Levy a récemment développé un vaccin composé de cellules tumorales mélangées à des oligodeoxynucléotides hypométhylés riches en GC (CpG). L'injection de ce vaccin chez la souris a permis d'activer les cellules dendritiques *via* le TLR9, induisant une réponse lymphocytaire T antitumorale qui a conduit à la régression de tumeurs préétablies [Goldstein *et al.* 2011].

Pour induire une réponse immune adaptative, les peptides antigéniques issus de la dégradation intracellulaire des protéines, doivent être présentés sous forme de complexes CMH-II/peptide ou CMH-I/peptide reconnus de manière spécifique par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ respectivement. Les antigènes tumoraux sont issus des corps apoptotiques ou des protéines de choc thermique phagocytés/endocytés par les cellules dendritiques. Ils sont donc initialement destinés à être présentés par les molécules de CMH-II. Néanmoins, plusieurs travaux ont mis en évidence l'existence d'une voie « croisée » permettant la présentation d'antigènes d'origine exogène par les molécules CMH-I [Harding *et al.* 1994]. L'existence d'une telle présentation serait essentielle à l'induction d'une réponse cellulaire T CD8⁺ spécifique des cellules tumorales. L'étude de nombreux modèles tumoraux a montré que la présentation « croisée » des antigènes tumoraux a lieu au sein des ganglions drainant la tumeur [Marzo *et al.* 1999]. Son mécanisme précis reste cependant inconnu et pourrait impliquer le protéasome et les protéines « transporter associated with antigen processing » (TAP) [Limmer *et al.* 2000]. La théorie de la présentation croisée reste controversée [Bevan 2006]. Pour certains, il s'agit d'un phénomène trop rare et qui nécessite des doses d'antigènes trop importantes pour être efficace *in vivo* [Ochsenbein *et al.* 2001]. Il reste donc à démontrer que la présentation croisée joue un rôle important dans l'immunité anti-tumorale.

2. La réponse adaptative.

L'immunosurveillance adaptative repose sur la reconnaissance spécifique des antigènes dérivés des cellules tumorales par les lymphocytes B, acteurs de l'immunité humorale et par les lymphocytes T, acteurs de l'immunité cellulaire. La réponse cellulaire T jouant un rôle prédominant dans l'immunité anti-tumorale, nous nous sommes concentrés sur la description de ses mécanismes.

- Les lymphocytes T auxiliaires (T « helper »).

Les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle crucial d'orchestration de la réponse immunitaire. Ils recrutent et activent les autres cellules immunitaires telles que les lymphocytes T CD8⁺, les lymphocytes B, les macrophages, et les granulocytes [Zhu et al. 2010].

En 1986, Coffman et Mosmann ont mis en évidence pour la première fois l'existence de clones lymphocytaires différant par la nature des cytokines produites et qu'ils ont baptisés « T helper type 1 » (Th1) et Th2 [Mosmann et al. 1986]. Cette description initiale a été depuis enrichie par la découverte de nouveaux types, certains encore imparfaitement caractérisés, tels que les Th17 [Harrington et al. 2005], les T régulateurs (Treg) [Sakaguchi et al. 1995], les T_{FH} [Fazilleau et al. 2009], les Th9 [Dardalhon et al. 2008; Veldhoen et al. 2008] et Th22 [Eyerich et al. 2009]. La différenciation des lymphocytes T auxiliaires représente en fait une spécialisation fonctionnelle coordonnée par un programme génétique, lui-même dicté par des facteurs de transcription spécifiques (figure 3).

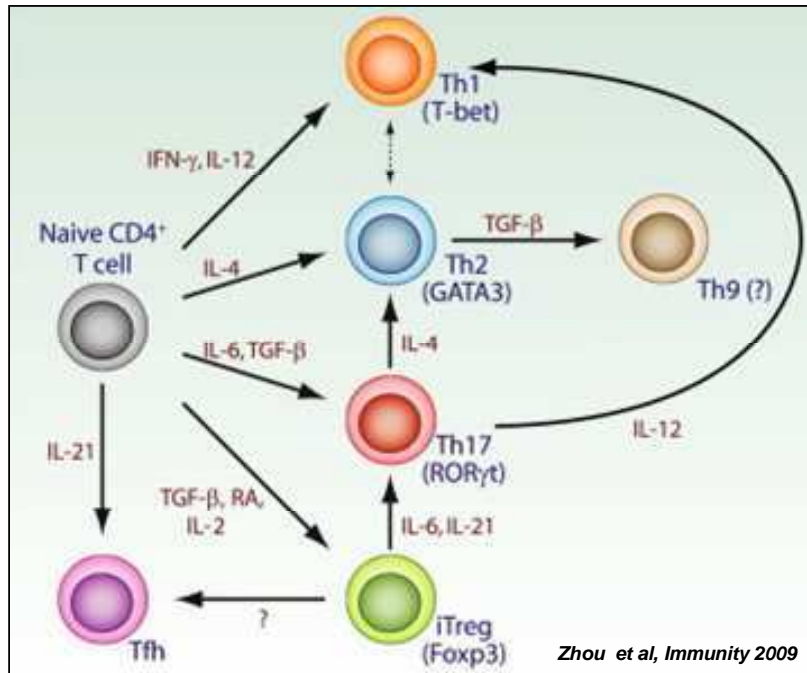


Figure 3: Le milieu cytokinique détermine la différenciation et la conversion des cellules CD4+.

Après avoir rencontré les antigènes présentés par les cellules présentatrices de l'antigène. Les cellules T CD4⁺ naïves peuvent se différencier en Th1, Th2, Th17, Treg et T_{FH}. Ces programmes de différenciation sont contrôlés par les cytokines produites par les cellules de l'immunité innée. L'IL-12 et l'IFN γ sont cruciales pour la différenciation Th1. L'IL-4 induit la différenciation en Th2 et le TGF β associé à l'IL-6 induit la différenciation Th17. La différenciation Treg est induite par le TGF β , l'acide rétinoïque (RA), et l'IL-2 alors que la différenciation en cellules T_{FH} requiert l'IL-21. Des facteurs de transcription spécifiques à chaque sous-type dirigent cette différenciation : T-bet pour les cellules Th1, GATA3 pour les cellules Th2, ROR γ t pour les Th17 et Foxp3 pour les Treg.

Une relative plasticité de ces lignées a été mise en évidence. Ainsi, les cellules Treg peuvent se convertir en cellules Th17 sous l'effet de l'IL-6 et de l'IL-21.

Les mécanismes impliqués dans la génération des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ ne sont pas encore complètement élucidés. Un signal de différenciation dit « troisième signal » reçu par les lymphocytes naïfs pendant leur activation est impliqué. Ce signal est principalement représenté par des cytokines produites par les DC présentant l'antigène ou d'autres cellules du microenvironnement où a lieu l'interaction physique entre les DC et les lymphocytes T [Zhou et al. 2009].

Seuls les lymphocytes Th1 ont été formellement impliqués dans la protection contre la croissance tumorale. Les cellules Th1 sont caractérisées par la production d'IFN γ , d'IL-2 et de TNF α et β . Elles jouent un rôle dans l'activation des cellules NK, dans l'amplification des fonctions phagocytaires et bactéricides des macrophages, dans la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques et l'acquisition par ces cellules d'un phénotype mémoire [Bourgeois et al. 2002; Janssen et al. 2003; Williams et al. 2006; Zhu et al. 2008]. La différenciation Th1 est induite sous l'influence de l'IL-12 et de l'IFN γ par les facteurs de transcription « Signal Transducer and Activator of Transcription » (STAT) 4, STAT1 et « T-

box transcription factor » (T-bet) [Glimcher et al. 2000]. Les souris déficientes dans les voies de signalisation impliquant ces facteurs montrent des réponses Th1 réduites [Magrham et al. 1996; Piccotti et al. 1998] et développent des tumeurs avec une plus grande fréquence que les souris contrôles [Shankaran et al. 2001; Peng et al. 2004; Werneck et al. 2008; Lee et al.]. La restauration de l'expression de T-bet dans les cellules T de souris déficientes pour ce gène inhibe le développement de métastases pulmonaires de mélanome [Lee et al. 2010].

Il a été montré qu'après une forte activation par l'antigène, les cellules Th1 peuvent directement tuer les cellules tumorales en sécrétant de hauts niveaux d'IFN γ , de TNF- α et de granules cytotoxiques contenant perforine et granzyme [DeNardo et al. 2010]. Des données récentes soulignent une participation originale des lymphocytes T CD4⁺ à la réponse antitumorale : dans un modèle de lymphome agressif induit par l'oncogène myc, Rakhra et al ont montré que les cellules T CD4⁺ participent à la régression tumorale associée à l'inactivation de myc en remodelant le microenvironnement tumoral, notamment via la sécrétion de thrombospondine, un inhibiteur de l'angiogénèse [Rakhra et al. 2010].

Chez l'homme, le rôle majeur de la réponse Th1 dans le contrôle du cancer a été récemment confirmé. Dans une étude permettant de déterminer l'influence de la qualité de la réponse immunitaire au site tumoral sur le pronostic de patients atteints de cancer du colon, l'équipe de J Galon a en effet, montré que l'expression d'un groupe de gènes associés à la réponse Th1 et T cytotoxique (comprenant notamment les gènes codant l'IFN γ et T-bet) est corrélée à un plus faible taux de rechute [Galon et al. 2006].

Les cellules Th2 sont caractérisées par la production d'IL-4, IL-5 et IL-13. [Mowen et al. 2004]. Par l'intermédiaire de ces cytokines, les lymphocytes Th2 sont susceptibles de promouvoir la survie et la prolifération des cellules tumorales, notamment en favorisant la différenciation de macrophages intratumoraux de type M2 (cf paragraphe ci-dessous) [Aspord et al. 2007; DeNardo et al. 2009]. Chez l'homme dans les carcinomes gastriques, un fort ratio Th1/Th2 corrèle avec un meilleur pronostic associé à un taux de survie à 5 ans plus élevé [Ubukata et al. 2010].

Un nouveau sous-type de lymphocytes T CD4⁺ a été identifié en 2005 : les Th17, caractérisés par la production d'une cytokine proinflammatoire, l'IL-17A, communément appelée IL-17. Les Th17 jouent un rôle majeur dans l'inflammation et les maladies auto-immunes [Harrington et al. 2005] et sont également retrouvés dans les tumeurs humaines

et murines [Kryczek et al. 2007; Sfanos et al. 2008]. Au sein de la tumeur, les cellules Th17 sont fonctionnelles et sécrètent de l'IL-17 [Kryczek et al. 2009].

Le rôle de l'IL-17 dans le cancer est controversé, car elle peut à la fois faciliter l'activation de cellules immunes antitumorales et promouvoir la progression tumorale par son effet proinflammatoire [Murugaiyan et al. 2009].

La majorité de l'activité pro-tumorale de l'IL-17 est liée à son rôle pro-angiogénique. En effet, l'IL-17 stimule les cellules stromales et les fibroblastes à produire des facteurs angiogéniques tels que le « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEGF) [Honorati et al. 2006]. Ainsi, le nombre de cellules Th17 présent dans la tumeur a été corrélé positivement avec la densité des microvaisseaux tumoraux [Numasaki et al. 2003]. L'IL-17 induit également d'autres facteurs présentant un rôle majeur dans l'angiogénèse et l'invasion tumorale tels que l'IL-6, le TGF- β , les prostaglandines E2, le NO et l'IL-8 [Fossiez et al. 1996; Kehlen et al. 1999]. Ainsi, des lignées de carcinome cervical présentent une plus grande capacité à former des tumeurs chez des souris immunodéficientes lorsqu'elles surexpriment l'IL-17 [Tartour et al. 1999].

Même si l'IL-17 a été impliquée dans la progression tumorale, un nombre croissant d'études chez l'homme et la souris suggèrent un rôle anti-tumoral des cellules Th17. Par exemple, chez des patients atteints de cancer de la prostate, une corrélation inverse est retrouvée entre l'infiltration des cellules Th17 et le stade clinique de la maladie [Sfanos et al. 2008]. De même, chez des patientes atteintes de cancer de l'ovaire, la présence des cellules Th17 dans la tumeur est fortement associée à un infiltrat de cellules effectrices de type Th1, CD8⁺ et NK et négativement corrélée avec la présence de cellules Treg [Kryczek et al. 2009]. L'expression forcée d'IL-17 dans des cellules tumorales (tumeurs hématopoïétiques et fibrosarcome) peut supprimer la croissance tumorale en augmentant l'immunité anti-tumorale chez des souris immunocompétentes [Hirahara et al. 2001; Benchetrit et al. 2002]. En outre, la croissance tumorale et les métastases pulmonaires sont augmentées chez les souris déficientes pour l'IL-17 injectées avec la lignée de cancer du colon M38. Cette augmentation est associée avec une diminution des cellules NK et des cellules Th1 dans la tumeur et les ganglions drainants [Kryczek et al. 2009].

- Les lymphocytes T CD8⁺.

L'effet cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs est la principale fonction du système immunitaire adaptatif contre les tumeurs. La reconnaissance des cellules

tumorales par les lymphocytes T CD8⁺ via l'engagement du récepteur T induit la lyse de ces cellules par plusieurs mécanismes [Kagi et al. 1994].

Les lymphocytes T cytotoxiques renferment des granules préformés contenant de nombreuses enzymes cytolitiques dont les perforines et les granzymes A et B. Après engagement du TCR, la réorganisation du cytosquelette de la cellule CD8⁺ permet d'orienter les granules vers la cellule cible avant l'exocytose dépendante du calcium. Toujours en présence de calcium, les molécules de perforine s'assemblent pour former des pores dans la membrane plasmique de la cellule cible, permettant le passage des granzymes et l'induction de l'apoptose [Trapani et al. 2002; Law et al. 2010] (figure 4).

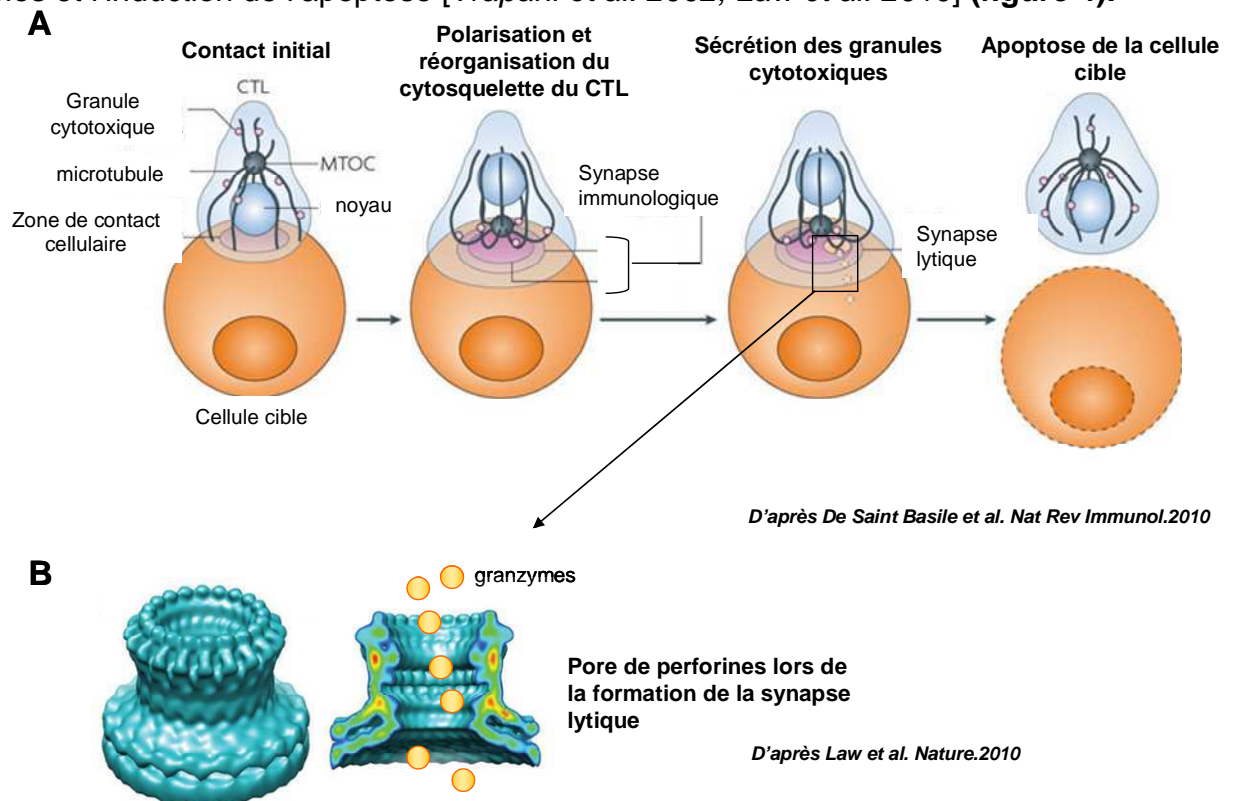


Figure 4: Formation de la synapse immunologique. (A) Après reconnaissance de la cellule cible, le lymphocyte T cytotoxique (CTL) réoriente son centre organisateur des microtubules (MTOC) et son réseau de microtubules en direction de la zone de contact avec la cellule cible où se forme la synapse immunologique. En quelques minutes, les granules cytotoxiques se déplacent le long des microtubules en direction de la synapse et s'accumulent au niveau du MTOC, directement au contact de la membrane plasmique. Les molécules de perforine libérées vont former un pore dans la membrane de la cellule cible (B) permettant l'entrée des molécules de granzyme dans la cellule cible. Les granzymes activent la voie des caspases ce qui conduit à la mort par apoptose de la cellule cible. **(B)** Reconstruction d'une vue par cryomicroscopie électronique de la surface et d'une coupe d'un pore de perforine. La coupe est colorée en fonction de la densité protéique. Le rouge représente les régions de plus forte densité protéique. La résolution est de 28,5 Å

Les lymphocytes T cytotoxiques expriment également les ligands de récepteurs de mort tels que FasL ou TRAIL et peuvent induire l'apoptose des cellules cibles exprimant ces récepteurs [Kagi et al. 1994; Gonzalez et al. 2010].

Enfin, les lymphocytes T cytotoxiques sécrètent des cytokines telles que l'IFN γ ou le TNF- α qui peuvent exercer une action anti-tumorale directe, ce qui a été montré *in vivo* à l'aide d'anticorps neutralisants et dans des modèles de souris génétiquement déficientes pour ces cytokines ou leurs récepteurs [Barth *et al.* 1991; Dighe *et al.* 1994; Prevost-Blondel *et al.* 2000]. Le récepteur du TNF appartient à la famille des récepteurs de mort, tandis que l'IFN γ inhibe la prolifération des cellules tumorales, active les cellules de l'immunité innée, et induit une augmentation de l'expression des molécules de CMH permettant d'améliorer la reconnaissance des antigènes par les lymphocytes T [Tannenbaum *et al.* 2000] (figure 5).

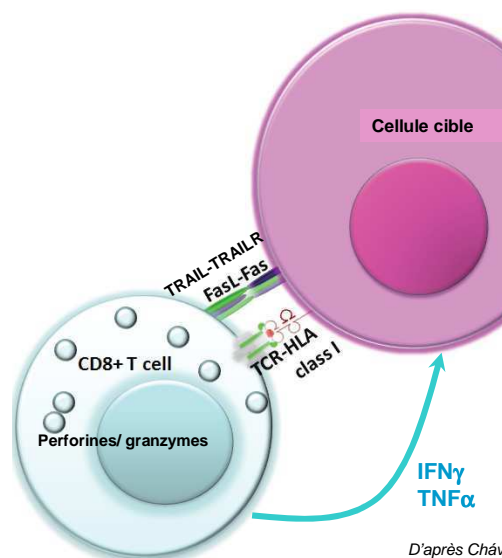


Figure 5: Les différents mécanismes cytotoxiques mis en place par la cellule T CD8⁺ pour tuer la cellule cible:

Le lymphocyte T CD8⁺ cytotoxique reconnaît l'antigène présenté par les molécules de CMH-I à la surface de la cellule cible. Il peut libérer le contenu de ses granules de perforine et granzymes (cf figure 4). Il exprime également à sa surface TRAIL et FasL qui se lient aux récepteurs de mort exprimés à la surface de la cellule cible. Enfin, il sécrète les cytokines IFN γ et TNF α qui exercent une activité anti-tumorale directe.

L'existence de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'antigènes tumoraux a été mise en évidence dès les années 80. A partir de lymphocytes T isolés de biopsies tumorales de patients atteints de mélanome (« tumor infiltrating lymphocytes », TIL), cultivés et amplifiés *in vitro* en présence de faibles quantités d'IL-2, Topalian et collaborateurs ont obtenu des lignées de lymphocytes T CD8⁺ ayant une activité cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales autologues [Topalian *et al.* 1989]. Le mélanome apparaît unique parmi les cancers humains dans sa capacité à induire l'expansion de nombres élevés de lymphocytes T cytotoxiques au cours de son évolution naturelle. Dans de rares cas, cette

expansion a été associée à l'apparition de régressions spontanées, parfois concomitantes d'une activité autoimmune vis-à-vis des mélanocytes normaux, sous forme de lésions de vitiligo [Mackensen et al. 1994; Lengagne et al. 2004]. La caractérisation de ces lymphocytes T CD8⁺ a permis l'identification de nombreux antigènes du mélanome, certains partagés par d'autres types de tumeurs [Boon et al. 2006]. La capacité des TIL à migrer vers la tumeur pour reconnaître et lyser les cellules de mélanome a été utilisée dans des essais cliniques d'immunothérapie adoptive. Des résultats encourageants (49% à 72% de réponses objectives chez des patients au stade métastatique) ont été obtenus lors de conditionnements lymphoablatifs concomitants [Rosenberg et al. 2009; Goff et al. 2010]. Ces résultats mettent en évidence le rôle délétère de certains acteurs de l'immunité conditionnés par la tumeur à exercer une activité immunosuppressive, comme nous le détaillerons plus loin.

Le rôle majeur des lymphocytes T cytotoxiques dans la protection de l'hôte contre le développement tumoral a été récemment mis en évidence dans le cancer du colon. Dans le travail de J Galon précédemment mentionné, une étude des populations T cytotoxiques naïves et mémoire a été réalisée par immunohistochimie sur les puces tissulaires de 415 tumeurs coliques et a prouvé, pour la première fois, le rôle prédominant de la réponse T cytotoxique dans le contrôle des tumeurs. En effet, la présence d'un infiltrat T CD8⁺ cytotoxique dans la tumeur et à son bord invasif représentait un facteur pronostic de poids supérieur et indépendant de la classification TNM, habituellement utilisée pour stratifier les patients [Galon et al. 2006; Galon et al. 2007].

3. Populations lymphocytaires T non conventionnelles.

- Les cellules « Natural Killer T ».

Les cellules Natural Killer T (NKT) expriment des marqueurs de cellules NK (par exemple la molécule NK1.1 chez la souris) et un TCR de type $\alpha\beta$. Ce sont essentiellement des cellules CD4⁺ qui répondent à des antigènes lipidiques ou glycolipidiques présentés par la molécule de CMH-I non classique CD1d [Godfrey et al. 2010]. Il existe au moins deux sous-populations NKT, les NKT de type I ou invariants (iNKT) et les NKT de type II. Les iNKT expriment un TCR semi-invariant comportant une chaîne α de type V α 24J α 18 chez l'homme et V α 14J α 18 chez la souris. Elles sont activées par différents glycolipides

en présence d'IL-12. Le ligand α -galactosylcéramide (α -GalCer) est un des premiers ligands des iNKT décrit chez l'homme et la souris [Kawano et al. 1997; Brossay et al. 1998].

Une des caractéristiques principales des cellules NKT est la production de taux élevés de cytokines dès les premières minutes après la stimulation de leur TCR. En fonction du contexte de leur activation, les cellules NKT sont capables de produire une grande variété de cytokines telles que l'IL-2, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-10, l'IL-13, le TGF β , l'IFN γ , le TNF α et même l'IL-17 [Bendelac et al. 2007 ; Zimmer et al. 2009]. A travers la production de ces cytokines, les NKT peuvent stimuler de nombreux types cellulaires incluant des cellules du système immunitaire inné (les cellules dendritiques et les cellules NK) et des cellules du système immunitaire adaptatif (les lymphocytes B et les lymphocytes T conventionnels). Les cellules NKT joueraient notamment un rôle clé dans la polarisation de la réponse T auxiliaire.

Les iNKT et les NKT de type II jouent un rôle opposé dans le développement tumoral. Tandis que les NKT de type II favoriseraient la croissance des tumeurs *via* la production d'IL-13 et la stimulation des cellules myéloïdes suppressives (cf pages 48) [Terabe et al. 2005], les iNKT participent, au contraire, au rejet tumoral [Taniguchi et al. 2011]. Chez les souris déficientes en cellules iNKT, on observe notamment une susceptibilité exacerbée à l'induction chimique de fibrosarcomes [Smyth et al. 2000]. Les cellules iNKT stimulées par l' α -GalCer sont capables de tuer de nombreuses lignées tumorales par une activité lytique dépendante de la voie perforine/granzyme [Kawano et al. 1999]. Dans des modèles murins de transfert adoptif de cellules tumorales, l'injection d' α -GalCer *in vivo* active les cellules iNKT, prévient le développement de métastases et prolonge la survie [Kobayashi et al. 1995; Kawano et al. 1998]. Un essai de phase I consistant en l'injection de DC présentant l' α -GalCer couplé à l'injection de cellules NKT pré-activées a été réalisé chez 10 patients atteint de cancer ORL. Une augmentation importante des cellules NKT dans les tissus tumoraux a été observée chez 7 patients et une régression tumorale chez 5 patients [Yamasaki et al. 2010].

- Les lymphocytes T $\gamma\delta$.

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont définis par un TCR constitué d'une chaîne γ et d'une chaîne δ . Ils reconnaissent leur cible de façon indépendante du CMH. Cette sous-

population de lymphocytes T est minoritaire dans les localisations lymphoïdes classiques (moins de 5% des lymphocytes T du sang) mais abondante dans certains tissus, notamment épithéliaux [Rey et al. 2009]. Chez l'homme, la majorité des T $\gamma\delta$ circulants exprime un TCR V γ 9V δ 2. Comme les NKT, ils sont capables de s'activer et de proliférer très rapidement en réponse à une infection par des pathogènes bactériens ou parasitaires, mais également en présence de cellules tumorales [Kronenberg et al. 2007; Rey et al. 2009]. Les ligands des lymphocytes T $\gamma\delta$ décrits à ce jour sont des phosphoantigènes du soi ou étrangers. Dans les cellules tumorales, le phosphoantigène naturel des cellules T $\gamma\delta$ est l'isopentényl pyrophosphate (IPP), un métabolite du mévalonate dont la biosynthèse est stimulée dans les cellules cancéreuses [Gober et al. 2003]. Le mode de présentation de l'IPP est encore inconnu. Les cellules T $\gamma\delta$ expriment également à leur surface des récepteurs activateurs de type NK tels que NKG2D [Das et al. 2001].

Après une stimulation antigénique, les cellules T $\gamma\delta$ sécrètent de fortes quantités de cytokines pro-inflammatoires IFN γ et TNF α , surexpriment le récepteur de l'IL-2 et se différencient en cellules cytotoxiques. La cytotoxicité des lymphocytes T $\gamma\delta$ implique la voie perforine/granzyme et la voie Fas/FasL [Bonneville et al. 2006]. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ ont été impliqués dans la lyse de nombreux types de lignées et de cellules tumorales primaires [Viey et al. 2005; Alexander et al. 2008; Todaro et al. 2009; Gomes et al.]. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont également capables de stimuler l'activité cytotoxique des cellules NK vis-à-vis des cellules tumorales [Maniar et al. 2010] et de sécréter des chimiokines (MIP-1 α et β /CCL4, RANTES/CCL5) qui recrutent des lymphocytes T activés, des DC et des polynucléaires neutrophiles [Boismenu et al. 1996]. Enfin, il a été récemment montré *in vitro* que les lymphocytes T $\gamma\delta$ humains sont capables d'effectuer la présentation croisée d'antigènes (« cross-priming ») pour l'activation des lymphocytes T CD8⁺ [Brandes et al. 2009].

II-MECANISMES D'ÉCHAPPEMENT A LA REPONSE IMMUNITAIRE ANTI-TUMORALE

En dépit d'arguments solides suggérant sa validité,, la théorie de l'immunosurveillance semble ne prendre en compte qu'une seule dimension de la relation complexe entre les cellules tumorales et le système immunitaire. En effet, des individus en apparence immunocompétents peuvent développer des cancers, ce qui traduit l'échec de leur réponse immunitaire à détruire toutes les cellules transformées. En outre, des travaux récents ont montré que la pression de sélection exercée par le système immunitaire, peut elle-même promouvoir l'émergence de tumeurs peu immunogènes [*Shankaran et al. 2001*]. A la faveur de cette sélection immune apparaissent des tumeurs capables, à leur tour, de manipuler de façon active le système immunitaire pour faciliter leur croissance et freiner leur destruction.

A. « Immunoediting » ou immunosélection : la théorie des trois E.

Au début des années 2000, Dunn et Schreiber ont proposé de réviser la théorie de l'immunosurveillance afin d'y inclure la dualité du rôle du système immunitaire lors du développement tumoral. La théorie de l'« immunoediting » qui en est issue, décrit un processus dynamique composé de trois phases « E »: Elimination, Equilibre et Echappement [*Dunn et al. 2002; Dunn et al. 2004*] (**figure 6**).

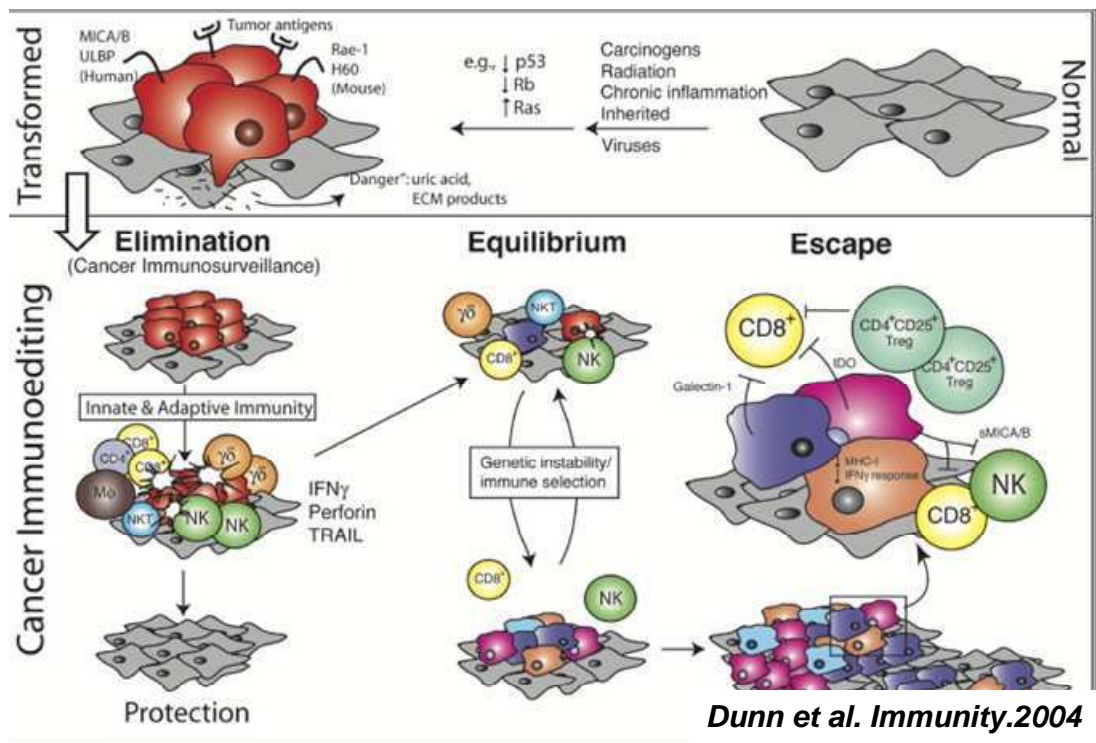


Figure 6: Représentation schématique des trois phases du processus d'immunoediting

Les cellules normales (cellules grises) sujettes à de multiples stimulations oncogéniques se transforment et deviennent tumorales (cellules rouges). Dès les premières étapes du développement tumoral, ces cellules vont exprimer différents marqueurs tumoraux et générer des signaux pro-inflammatoires de danger qui initient le processus d'immunoediting. Dans la première phase: Elimination, les cellules et molécules de l'immunité innée et adaptative peuvent éradiquer la tumeur en développement et protéger l'hôte de la formation tumoral. Cependant, si ce processus échoue, les cellules tumorales vont entrer dans la phase d'équilibre. Elles sont alors maintenues de manière chronique et « sculptées » par le système immunitaire environnant. A l'issue de cette phase, des variants tumoraux peuvent apparaître et échapper à la réponse immunitaire par différents mécanismes. La tumeur pourra alors se développer et devenir cliniquement détectable.

1. Première phase : l'élimination.

La phase d'élimination reprend le concept original de la théorie de l'immunosurveillance et peut elle-même être divisée en 4 étapes. Durant la première étape, lorsque qu'une tumeur atteint une certaine taille, elle commence à envahir le milieu environnant et requiert l'augmentation de ses réserves de sang. Pour cela, elle produit des molécules stromagéniques et angiogéniques [Hanahan et al. 1996]. Le remodelage du stroma qui en résulte induit la production de signaux inflammatoires et le recrutement de cellules immunitaires innées, telles que cellules NK, macrophages, cellules T $\gamma\delta$ et cellules NKT [Matzinger 1994; Girardi et al. 2001; Smyth et al. 2001]. Ces cellules reconnaissent

des molécules exprimées à la surface des cellules tumorales et produisent des cytokines pro-inflammatoires, telles que le $TNF\alpha$ et l' $IFN\gamma$.

Dans la seconde étape, l' $IFN\gamma$ induit la mort de quelques cellules tumorales [Bromberg et al. 1996]. Il permet également la production de chimiokines, telles que CXCL10, CXCL9, CXCL11, par les cellules tumorales et/ou les cellules du stroma environnant [Luster et al. 1987; Cole et al. 1998]. Ces chimiokines à activité anti-angiogénique, bloquent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans la tumeur et recrutent un nombre croissant de cellules de l'immunité innée [Luster et al. 1993; Sgadari et al. 1996; Qin et al. 2000]. Les débris des cellules tumorales mortes à la suite de cette première attaque immunitaire sont phagocytés par les cellules dendritiques.

Dans la troisième étape, la réponse immunitaire innée s'amplifie et les DC provenant du site tumoral induisent l'activation de lymphocytes T $CD4^+$ Th1 et T cytotoxiques spécifiques de la tumeur dans le ganglion drainant [Bancroft et al. 1991; Ikeda et al. 2002; Takeda et al. 2002].

Dans la quatrième et dernière étape, les lymphocytes T activés migrent au site de la tumeur. Les lymphocytes T $CD4^+$ Th1 produisent de l'IL-2 aidant à maintenir la fonction et la viabilité des lymphocytes T cytotoxiques. Ces derniers reconnaissent spécifiquement leur cellules cibles dont l'immunogénicité a été augmenté par l' $IFN\gamma$ [Shankaran et al. 2001] et vont induire leur mort de façon directe (système perforines/granzymes et Fas/FasL) et indirecte (sécrétion de cytokines).

A la fin de cette étape, soit l'élimination des cellules tumorales est complète, soit certaines cellules tumorales n'ont pu être détruites, et on entre alors dans la phase d'équilibre.

2. Deuxième phase : l'équilibre.

L'équilibre est probablement la plus longue des trois phases. En effet, chez l'homme, il a été estimé qu'il existe généralement un intervalle d'une vingtaine d'années entre l'exposition initiale à un carcinogène et la détection clinique d'une tumeur [Loeb et al. 2003].

Durant cette phase, le système immunitaire de l'hôte et les quelques variants tumoraux ayant survécu à la phase d'élimination entrent dans un équilibre dynamique, au cours duquel la pression de sélection exercée sur la tumeur est associée à la destruction

de nombreux variants et à l'apparition de nouveaux clones, plus résistants aux attaques du système immunitaire. L'hétérogénéité et l'instabilité génétique (des dizaines de milliers de mutations et des altérations génétiques majeures peuvent être détectées) sont les principales forces qui permettent aux cellules tumorales de survivre [Loeb 1991; Loeb et al. 2003]. Les lymphocytes T et l'IFN γ contribueraient de façon majeure à la pression de sélection exercée sur ces cellules.

Des trois phases de la théorie de l'immunoediting, la phase d'équilibre est la moins connue. Une preuve de son existence a été apportée par l'équipe de RD Schreiber en 2007 [Koebel et al. 2007]. Administré en une seule faible dose à des souris, le 3-méthylcholanthrène (MCA) est responsable de l'apparition de sarcomes dans une partie seulement des animaux. Après injection d'anticorps éliminant les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ ou neutralisant l'IFN γ et l'IL12 aux souris n'ayant pas développé de tumeur deux cents jours après l'injection du carcinogène, Schreiber et ses collaborateurs ont observé l'apparition de sarcomes dans près de la moitié des souris. En revanche, les souris traitées avec un anticorps anti-NK1.1 (éliminant les cellules NK), ne développent pas de tumeur. Les cellules tumorales maintenues en état d'équilibre par le système immunitaire présentent une forte immunogénicité alors que les cellules naturellement issues de la phase d'équilibre sont très peu immunogènes. L'absence d'implication de la réponse immunitaire innée dans la phase d'équilibre permettrait de la distinguer de la phase d'élimination impliquant à la fois l'immunité innée et adaptative [Koebel et al. 2007].

Au cours de l'équilibre, trois devenir sont envisageables pour la tumeur : i) les cellules tumorales sont totalement éliminées, ii) la phase d'équilibre se poursuit ou iii) les cellules tumorales échappent au système immunitaire et s'engagent dans la phase finale du processus d'immunoediting.

3. Troisième phase : l'échappement.

Certains des variants tumoraux produits durant la phase d'équilibre ont développé une résistance à la détection et/ou l'élimination par le système immunitaire qui leur permet de croître dans un environnement immunologiquement intact. De plus, ces cellules peuvent acquérir la capacité de manipuler les fonctions régulatrices et tolérogènes du système immunitaires à leur profit. C'est à cette phase que la tumeur devient cliniquement détectable [Dunn et al. 2004].

B. Les mécanismes d'échappement mis en place par les cellules tumorales.

1. Mécanismes limitant la détection des tumeurs.

- Perte de l'expression des antigènes de tumeur.

Les tumeurs humaines portent des antigènes qui peuvent être reconnus par des lymphocytes T autologues. Certains de ces antigènes sont spécifiques de la tumeur alors que d'autres sont également présents sur des cellules normales. Les antigènes spécifiques de tumeurs sont issus de protéines ubiquitaires mutées du fait de l'instabilité génétique des cellules tumorales ou de protéines normales du développement embryonnaire exprimées de façon aberrante par ces cellules. Un cas particulier est représenté par la protéine idiotypique. Cet antigène, issu du réarrangement de la partie variable des gènes codant les chaînes lourde et légère d'immunoglobuline et des éventuelles mutations somatiques subies lors du passage par le centre germinatif, est spécifique de chaque lymphocyte B. Dans les lymphomes B, elle représente donc un antigène spécifique exprimé uniquement par le clone tumoral. A l'inverse, les antigènes de différenciation sont exprimés à la fois par la tumeur et par les cellules normales dont elle est issue. Par exemple, la tyrosinase est exprimée par les mélanocytes normaux et par les cellules de mélanome.

L'expression des antigènes tumoraux est hétérogène, y compris au sein d'une même tumeur. La perte d'expression des antigènes peut avoir lieu indépendamment de la dérégulation de l'expression des molécules de CMH. La diminution de l'expression des antigènes du mélanome tels que gp100, « melanoma antigen recognize by T cell 1 » (MART1) et de la tyrosinase est associé à une progression de la maladie [*de Vries et al. 1998*]. Hofbauer et collaborateurs ont montré que 100% des cellules de mélanome de grade 1 expriment MART1 contre seulement 75% des cellules de mélanome de grade 4 [*Hofbauer et al. 1998*]. Chez la souris, Kmiecik et collaborateurs ont montré une perte de l'expression de l'antigène HER-2/neu à la surface des cellules de carcinome mammaire échappant au système immunitaire. Cette perte d'expression est due à la méthylation du promoteur de l'antigène neu sous l'effet de l'IFN γ [*Kmiecik et al. 2007*].

Parfois, l'antigène est exprimé mais accumule des mutations pouvant abolir sa reconnaissance. Cette situation a notamment été observé dans le lymphome folliculaire au

cours d'essais cliniques utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre l'idiotype [Miller et al. 1982]. Dans 50% des cas, après le traitement, les tumeurs n'étaient plus reconnues par les anticorps suite à la sélection des clones présentant une séquence idiotypique mutée [Meeker et al. 1985; Brown et al. 1989]

- Altération de la présentation antigénique.

La présentation antigénique par les molécules du CMH (Human Leukocyte Antigen [Glatzel et al.] chez l'homme) est cruciale à la fois dans l'induction et dans le maintien de la réponse T cytotoxique. Des altérations de l'apprêtement et/ou de la présentation antigénique ont été décrites dans de nombreuses tumeurs. Ainsi, une perte ou une diminution de l'expression des molécules de classe I est observée dans 16 à 80% des cellules tumorales au sein d'une tumeur [Marincola et al. 2000]. Différents mécanismes moléculaires peuvent être impliqués, incluant des défauts de synthèse de la chaîne β_2 -microglobuline, une altération des mécanismes contrôlant l'expression des molécules HLA et des anomalies de certains composants de la machinerie d'apprêtement de l'antigène [Chang et al. 2005] (figure 7).

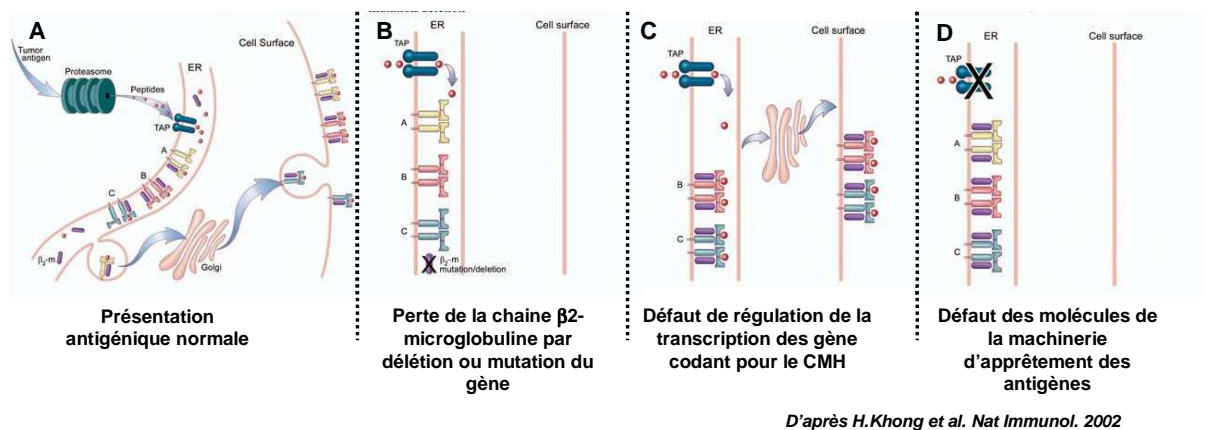


Figure 7: Les mécanismes moléculaires responsables de la perte d'expression des molécules de CMH-I. (A) Les antigènes tumoraux sont dégradés en peptides dans le protéasome. Ces peptides sont ensuite transportés par les molécules TAP dans le réticulum endoplasmique (ER) où ils se lient aux molécules de CMH-I formées par l'association d'une chaîne lourde et de la β_2 -microglobuline (β_2 -m). Les complexes CMH-peptide sont ensuite acheminés à travers l'appareil de Golgi à la surface membranaire. Plusieurs défauts dans la présentation antigénique peuvent entraîner la perte partielle ou totale de l'expression des molécules de CMH-I et sont associés à un échappement tumoral au système immunitaire : mutations ponctuelles ou pertes nucléotidiques dans le gène codant pour la chaîne β_2 -m (B), hyperméthylations et/ou altération de la structure de la chromatine des régions promotrices des gènes codant pour les molécules impliquées dans la présentation antigénique (C), dysfonctions de la machinerie d'apprêtement de l'antigène par mutation ou perte des gènes codant les protéines du protéasome LMP2 et LMP7 ou les molécules de transport TAP1 et TAP2 (D).

La perte totale de l'expression des molécules HLA est le plus souvent due à un défaut d'expression de la chaîne β_2 -microglobuline qui est requise pour la formation du complexe chaîne lourde- β_2 -microglobuline-peptide et pour son maintien à la surface membranaire [Hicklin et al. 1998]. Des altérations du gène codant la β_2 -microglobuline sont observées dans 21% des carcinomes du colon, 15% des mélanomes et moins de 5% des autres types de tumeur [Seliger 2008].

Des mécanismes épigénétiques tels que l'hyperméthylation et/ou l'altération de la structure de la chromatine des régions promotrices des gènes codant pour les molécules HLA-A, B et C sont également impliqués dans la diminution de l'expression de ces molécules [Campoli et al. 2008], notamment par les carcinomes de l'œsophage [Nie et al. 2001] et les mélanomes [Fonsatti et al. 2003].

Dans les cancers ORL, Ferris et collaborateurs ont montré que la diminution de la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T cytotoxiques peut être due à des dysfonctions de la machinerie d'apprêtement antigénique [Ferris et al. 2006]. L'expression des sous-unités du protéasome « low molecular mass polypeptide » (LMP) 2 et LMP7, des transporteurs peptidiques TAP1 et TAP2 et de la tapasine peut être fortement diminuée voire abolie dans les carcinomes rénaux, mammaires et pulmonaires et dans les mélanomes [Seliger et al. 1996; Vitale et al. 1998]. Des mutations de ces protéines ont été identifiées dans les neuroblastomes et dans les carcinomes pulmonaires [Chen et al. 1996; Seliger 2008].

- Modulation de l'expression des molécules HLA de classe I non classiques HLA-E, F et G.

La première molécule HLA de classe I non classique décrite est la molécule HLA-G qui est impliquée dans la tolérance materno-fœtale. De façon générale, les molécules de CMH-I non classiques sont capables d'interagir avec des récepteurs inhibiteurs des cellules NK. Par exemple, la molécule HLA-G interagit avec le récepteur inhibiteur KIR2DL4 [Carosella et al. 1995]. Par ce biais, ces molécules joueraient un rôle dans l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire [O'Callaghan et al. 1998; Cabestre et al. 1999].

Une expression anormale de la molécule HLA-G a été mise en évidence dans les gliomes, les rétinoblastomes, les carcinomes du sein, du colon, du rein, de la vessie, de

l'endomètre, des ovaires aussi bien que dans les leucémies lymphoïdes chroniques B, les lymphomes T et les lymphomes B non hodgkiniens [Rouas-Freiss et al. 2007; Sebti et al. 2007; Gros et al. 2008]. Au sein de ces tumeurs, HLA-G peut être exprimée et sécrétée par les cellules tumorales elles-mêmes mais également par des cellules du microenvironnement tumoral, telles que les macrophages et les cellules dendritiques [Ugurel et al. 2001; Amiot et al. 2003; Rebmann et al. 2003; Le Friec et al. 2004]. Les niveaux de protéine HLA-G dans le sérum des patients atteints de glioblastome multiforme sont inversement corrélés avec la survie de ces patients et le stade de la maladie [Ugurel et al. 2001; Rebmann et al. 2003].

En outre, Fournel et collaborateurs ont montré que l'isoforme HLA-G1 purifiée est capable, *in vitro*, de déclencher l'apoptose des cellules T CD8⁺ activées *via* la voie Fas/FasL en interagissant avec les molécules CD8 [Fournel et al. 2000].

HLA-G facilite également l'expression membranaire de HLA-E. Cette dernière peut se complexer à d'autres molécules de CMH-I afin d'être reconnue par le récepteur inhibiteur CD94/NKG2A et ainsi protéger les cellules tumorales de la lyse induite par les cellules NK [Borrego et al. 1998; O'Callaghan et al. 1998]. Dans les tumeurs, l'expression de la molécule HLA-E est augmentée dans les glioblastomes, les carcinomes du colon et des ovaires [Marin et al. 2003].

- Modulation de l'expression des molécules HLA de classe II HLA-DR, -DQ et -DP.

L'expression des molécules HLA de classe II par les cellules tumorales est associée à une augmentation de l'infiltration de cellules T dans les carcinomes mammaires, colorectaux, cervicaux et laryngés [Hilders et al. 1993; Coleman et al. 1994; Matsushita et al. 1996] mais également à un meilleur pronostic dans les hépatocarcinomes et les lymphomes B [Roberts et al. 2006; Xie et al. 2009]. Ainsi, la perte de l'expression de ces molécules à la surface des cellules tumorales pourrait être associée à une progression tumorale.

L'expression des gènes codant pour les molécules HLA de classe II ou pour leurs protéines accessoires (chaîne invariante Ii et HLA-DM) est contrôlée par la protéine transactivatrice de classe II (CIITA). L'hyperméthylation du promoteur IV du gène codant CIITA et la modification de la structure de la chromatine par la déacétylation des histones empêchent le recrutement des facteurs de transcription nécessaire à la transcription de ce gène entraînant ainsi un défaut de l'expression des molécules HLA de classe II dans les

lignées et tumeurs primaires humaines [Campoli et al. 2004; Morimoto et al. 2004; Satoh et al. 2004; Reith et al. 2005; Tomasi et al. 2006 ; Wright et al. 2006].

2. Mécanismes inhibant les fonctions du système immunitaire.

- Défaut d'activation des lymphocytes T et anergie

L'activation des cellules T nécessite deux types de signaux, la reconnaissance du complexe CMH-peptide (signal 1) et un deuxième signal co-stimulateur. Le second signal représente en fait une somme de signaux en provenance de molécules activatrices telles que CD28 et de molécules inhibitrices telles que « Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 » (CTLA-4) ou « programmed cell death 1 » (PD-1) [Leitner et al. 2010]. Le devenir de la réponse immunitaire dépend de l'équilibre entre signaux activateurs et inhibiteurs. L'absence de signal costimulateur induit un état durable d'insensibilité spécifique à l'antigène, appelé anergie qui résulte du blocage de la transcription du gène codant l'IL-2 et de l'expression d'un répertoire spécifique de gènes, dont celui codant l' « E3 ubiquitine ligase » GRAIL responsable de la dégradation du TCR par le protéasome [Hsiao et al. 2009; Nurieva et al. 2010]. L'état d'anergie est caractérisé par une répression active de la signalisation en aval du TCR et se traduit par l'incapacité des lymphocytes T à proliférer et à synthétiser les différentes cytokines nécessaires à l'induction et au maintien de la réponse immunitaire [Chappert et al. 2010]. *In vitro*, seul l'apport d'IL-2 exogène peut empêcher l'induction de l'anergie provoquée par l'absence de costimulation [Beverly et al. 1992; Zarek et al. 2007] (figure 8).

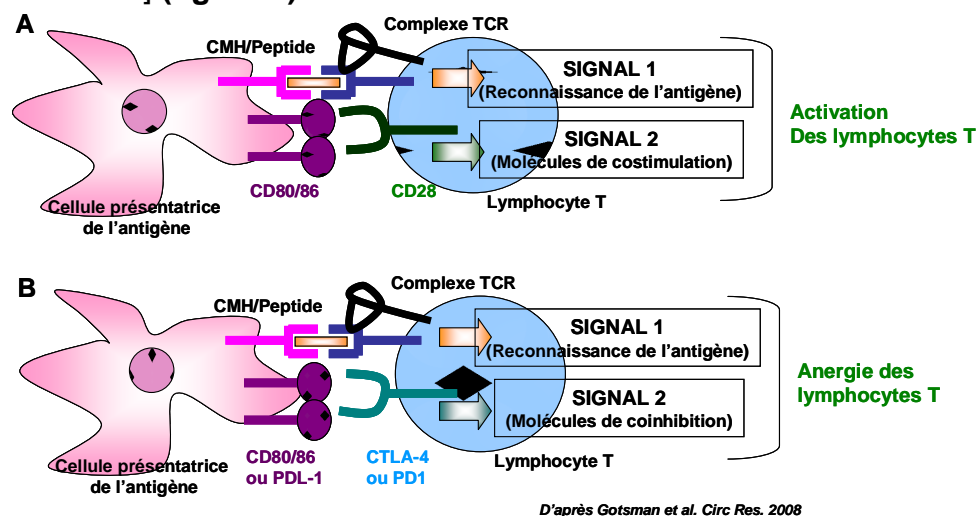


Figure 8: Mécanismes d'induction de l'activation ou de l'anergie des lymphocytes T. (A) L'activation complète des lymphocytes T nécessite à la fois une reconnaissance des complexes CMH-peptide exprimés à la surface de la cellule présentatrice et un deuxième signal costimulateur tel que celui apporté par la liaison de CD28 avec ses ligands CD80/CD86. (B). La liaison de CD80/86 et PDL-1 avec respectivement CTLA-4 et PD1 induit un signal coinhibiteur qui peut conduire à l'anergie des lymphocytes T.

La protéine transmembranaire CTLA-4 présente une plus forte avidité pour CD80 et CD86 que CD28 avec lequel elle entre en compétition. La liaison de CTLA-4 à ses ligands réduit l'expression de l'IL-2 et de son récepteur et arrête les cellules à la phase G1 du cycle [Walunas et al. 1994; Krummel et al. 1996; Walunas et al. 1998]. La liaison de CTLA-4 induit également la production de cytokines immunosuppressives et interfère avec le signal issu de CD28 et du TCR [Walunas et al. 1996]. En effet, CTLA-4 est associé avec le TCR et la phosphatase « SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase » (SHP-2), ce qui permet la déphosphorylation de la chaîne ζ du TCR et inhibe la phosphorylation de la protéine p56^{lck} empêchant ainsi la transmission du signal d'activation [Lee et al. 1998].

Des analyses phénotypiques ont révélé qu'un pourcentage plus important des lymphocytes T infiltrant la tumeur exprime CTLA-4 en comparaison aux lymphocytes T circulants. Dans le microenvironnement tumoral, l'interaction de CTLA-4 avec ses ligands induit et/ou soutient le phénotype régulateur des lymphocytes T [Lohr et al. 2003; Loser et al. 2005]

L'utilisation d'anticorps bloquant CTLA-4 stimule l'immunité anti-tumorale chez la souris [Leach et al. 1996; Mokyr et al. 1998]. Certains de ces anticorps, tels que l'ipilimumab, sont actuellement en essai clinique chez des patients en stade avancé de cancer [Hodi et al. 2003; Phan et al. 2003; Maker et al. 2005]. Les résultats du premier essai randomisé rapportant l'effet de ces anticorps chez des patients atteints de mélanome métastatique ont été récemment publiés. Une augmentation significative de la survie a été observée dans le bras recevant l'ipilimumab en association à une vaccination contre l'antigène gp100 en comparaison aux bras contrôles recevant indépendamment chacun de ces traitements [Hodi et al. 2010].

L'interaction de PD-1 avec son ligand PDL-1 (ou B7-H1) induit l'anergie ou l'apoptose des lymphocytes T [Dong et al. 2002; Tsushima et al. 2007]. PDL-1 a été détecté par immunohistochimie dans la majorité des tumeurs humaines incluant le mélanome, les carcinomes ORL, pulmonaires, ovariens, mammaires et coliques [Dong et al. 1999; Flies et al. 2006; Azuma et al. 2008] et a été associée à une agressivité accrue de certains de ces cancers [Thompson et al. 2004; Ghebeh et al. 2007]. Les lymphocytes T infiltrant les lésions de mélanome métastatique présentent une plus forte expression de PD-1 que les lymphocytes T du sang périphérique autologue ou des tissus normaux [Ahmadzadeh et al. 2009; Mumprecht et al. 2009]. Ces lymphocytes T expriment également CTLA-4 et

présentent un défaut de production d'IFN γ , TNF α et IL-2 [Ahmadzadeh et al. 2009]. *In vitro*, l'utilisation d'anticorps anti-PD-1 permet de contrer l'anergie induite dans les lymphocytes T [Tsushima et al. 2007]. Des essais cliniques utilisant ces anticorps bloquants sont en cours [Alexandrescu et al. 2010].

La stimulation du CD28 et l'IL-2 participent à l'activation de la serine/thréonine kinase « mammalian Target of Rapamycin » mTOR qui a récemment été décrite comme un rhéostat de l'activation lymphocytaire [Powell et al. 2010]. Le rôle fondamental de cette kinase a été suggéré initialement par des expériences montrant que son inhibition par la rapamycine induit l'anergie de lymphocytes T stimulés par des anticorps agonistes de CD28 et CD3. [Powell et al. 1999]. A l'inverse, des lymphocytes transfectés avec une construction codant pour mTOR sont insensibles à l'induction d'anergie par la rapamycine [Zheng et al. 2007]. La kinase mTOR participe à deux complexes catalytiques mTORC1 et mTORC2 qui diffèrent par la nature des sous-unités qui les composent et par leurs cibles moléculaires. Le complexe mTORC1, considéré comme la cible principale de la rapamycine est le mieux caractérisé. Il phosphoryle en particulier les protéines S6K1 et 4E-BP1, permettant ainsi la traduction des ARNm matures et la synthèse protéique [Harris et al. 2003] (figure 9).

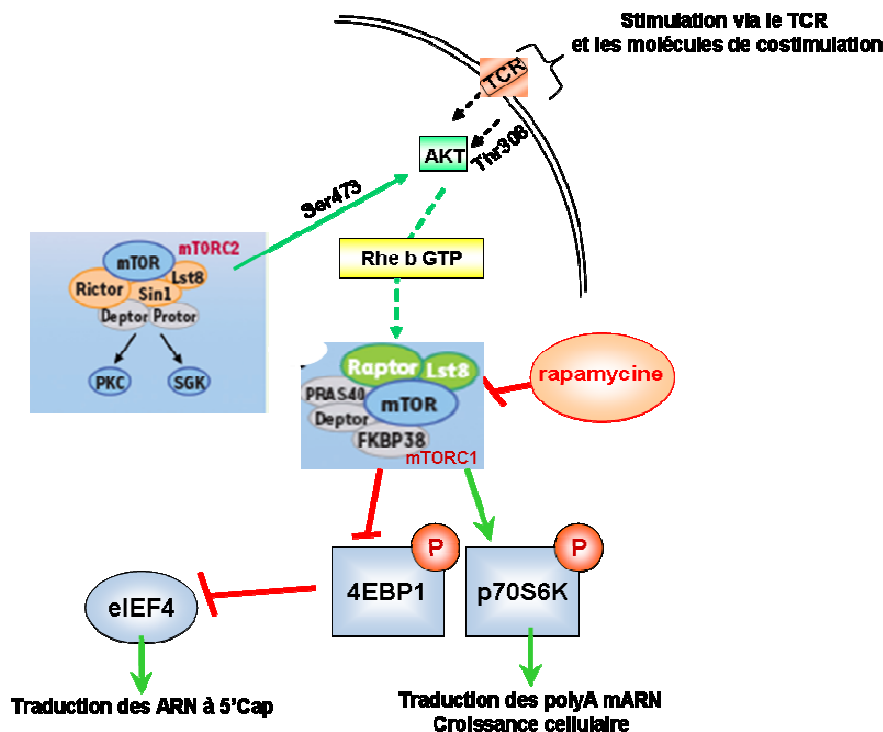


Figure 9: Voie de signalisation Akt/mTOR. La stimulation du TCR et de la molécule de costimulation CD28 participent à l'activation de la sérine/thréonine kinase mTOR. Cette kinase participe à deux complexes protéiques: mTORC1 et mTORC2. mTORC1 est composé des protéines mTOR, Rictor, Sin1, Lst8, Deptor et Protor, mTORC2 est composé de mTOR, Raptor, PRAS40, Lst8, Deptor et FKBP38. Le complexe mTORC1 phosphoryle les protéines S6K1 et 4EBP1 permettant la traduction des ARNm matures et la synthèse protéique. L'inhibition de mTORC1 par la rapamycine induit l'anergie des lymphocytes T.

L'activation de la voie Akt/mTORC1 est également nécessaire à l'augmentation de l'activité métabolique des lymphocytes T, à travers la stimulation de la glycolyse et l'augmentation de l'expression des récepteurs aux nutriments. L'induction du programme de prolifération du lymphocyte activé est, en effet, extrêmement exigeante en dépense métabolique et énergétique [Powell et al. 2010].

Il est désormais admis que la kinase mTOR intègre l'ensemble des signaux en provenance des molécules costimulatrices et coinhibitrices et des récepteurs aux cytokines. En outre, son niveau d'activation est dépendant de la quantité de différents nutriments, tels que les acides aminés, et de l'ATP présents dans le microenvironnement lymphocytaire [Zheng et al. 2007; Cobbold et al. 2009].

Plusieurs études chez la souris et l'homme ont montré que les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'antigènes tumoraux présentent des caractéristiques de cellules anergiques : ils sont rarement cytotoxiques *ex vivo*, prolifèrent mal et expriment souvent un phénotype de cellule naïve (CD45RA⁺, CCR7⁺) [Lee et al. 1999; Dunbar et al. 2000; Li et al.]. Chez les patients atteints de mélanome métastatique, les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de MART-1 ou de la tyrosinase, malgré un phénotype effecteur, sont incapables de lyser des cellules cibles et de sécréter des cytokines en présence du peptide chargé sur des cellules présentatrices autologues [Lee et al. 1999; Maczek et al. 2005]. De telles cellules sont également retrouvées chez des patients atteints de macroglobulinémie de Waldenstrom, une variété de lymphome B [Li et al. 2010]. L'absence d'expression de molécules de costimulation ou l'acquisition de l'expression de molécules de coinhibition, par les cellules cancéreuses ou les DC du ganglion drainant, peut participer à l'induction de l'anergie des cellules T [Guinan et al. 1994; Lee et al. 2010]. De nombreuses études ont montré que la transfection de CD80 aux cellules tumorales augmente leur capacité à déclencher une réponse T efficace [Townsend et al. 1993; La Motte et al. 1999; Li et al. 2011]. D'autres mécanismes conduisant à l'inactivation de mTOR peuvent être évoqués, tels que la dégradation d'acides aminés essentiels par des enzymes immunosuppressives exprimées dans la tumeur (cf chapitre III). Les inhibiteurs de mTOR font l'objet d'un récent intérêt en oncologie du fait de leur action antiproliférative sur les cellules tumorales. Ces effets antitumoraux directs devront être mis en balance avec le risque associé à l'inhibition de la réponse T antitumorale.

- Résistance à l'apoptose

Les cellules tumorales peuvent développer des mécanismes de résistance à la mort induite par les lymphocytes T cytotoxiques. Ces mécanismes incluent l'expression de molécules anti-apoptotiques, la diminution, selon différentes modalités, du signal proapoptotique de la voie des récepteurs de morts ou des granules cytotoxiques et l'activation de la voie Nuclear Factor κ B (NF κ B) (**figure 10**).

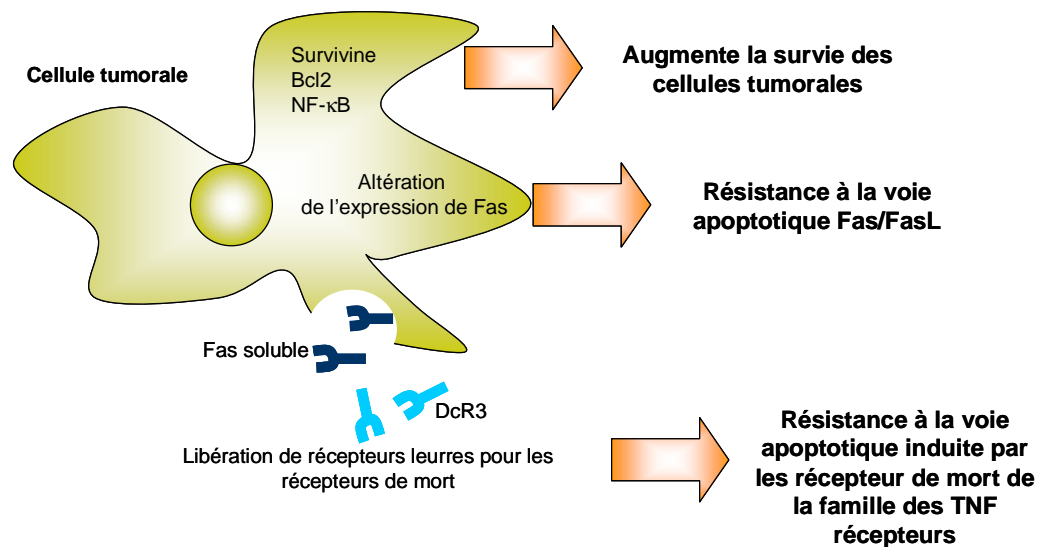


Figure 10: Mécanismes de résistance à l'apoptose développés par les cellules tumorales Les cellules tumorales peuvent exprimer différentes molécules anti-apoptotiques telles que la survivine et Bcl-2. Dans de nombreux cancers, le facteur de transcription NF κ B est constitutivement activé donnant un avantage sélectif à la cellule tumorale. La cellule tumorale peut également inhiber la voie d'apoptose impliquant les récepteurs de mort de la famille TNF. Ainsi, la perte ou la mutation du gène codant pour la protéine Fas induit une diminution d'expression de Fas à la surface cellulaire. Enfin, les cellules tumorales peuvent sécréter des récepteurs solubles agissant comme leurres des ligands de mort.

Les cellules tumorales peuvent exprimer des molécules antiapoptotiques. L'inhibiteur de sérine protéase PI-9/SPI-6, exprimé par de nombreux types de tumeurs humaines et murines, inhibe la lyse induite par les granules cytotoxiques en inactivant le granzyme B [Medema et al. 2001]. La protéine cFlip inhibe l'activation de la caspase 8 qui représente la caspase initiatrice de la voie de signalisation des récepteurs de mort [Medema et al. 1999]. *In vivo*, les tumeurs surexprimant cFLIP sont capables d'échapper à la réponse immunitaire, en dépit de la présence d'une voie apoptotique perforine/granzyme fonctionnelle [Djerbi et al. 1999; Medema et al. 1999]. La survivine, un inhibiteur des

caspases effectrices membre de la famille des « inhibitor apoptosis protein » (IAP) est exprimée dans de nombreuses tumeurs mais absente des cellules normales [Altieri 2010]. Enfin, une surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est observée dans de nombreux cancers, en particulier dans les lymphomes folliculaires et certains lymphomes à grandes cellules B [Tsujimoto et al. 1985]. Une forte expression de Bcl-2 peut contribuer à un mauvais pronostic [Campos et al. 1993; Hermine et al. 1996] et à une résistance accrue aux traitements [Weller et al. 1995; Schmitt et al. 2000].

Une résistance à l'apoptose suite à l'engagement de Fas avec son ligand FasL, inductible à la surface des cellules immunitaires effectrices, a été mise en évidence dans de nombreux cancers. Plusieurs mécanismes ont été décrits, parmi lesquels un défaut d'expression de Fas à la surface des cellules tumorales [Leithauser et al. 1993; Shin et al. 1999] ou des altérations fonctionnelles de la molécule. Dans un modèle murin de mélanome, Owen-Schaub et collaborateurs ont montré que la diminution d'expression de Fas favorise l'apparition de métastases en conférant à la tumeur un avantage sélectif [Owen-Schaub et al. 1998]. Landowski et collaborateurs ont mis en évidence, dans 10% des myélomes, des mutations de la région cytoplasmique de Fas qui conduisent à l'expression membranaire d'une protéine incapable d'induire l'apoptose *ex vivo* [Landowski et al. 1997]. De la même façon, la perte d'expression ou des mutations des récepteurs de mort TRAIL-R ont été observées dans diverses tumeurs humaines [Fisher et al. 2001; Shin et al. 2001].

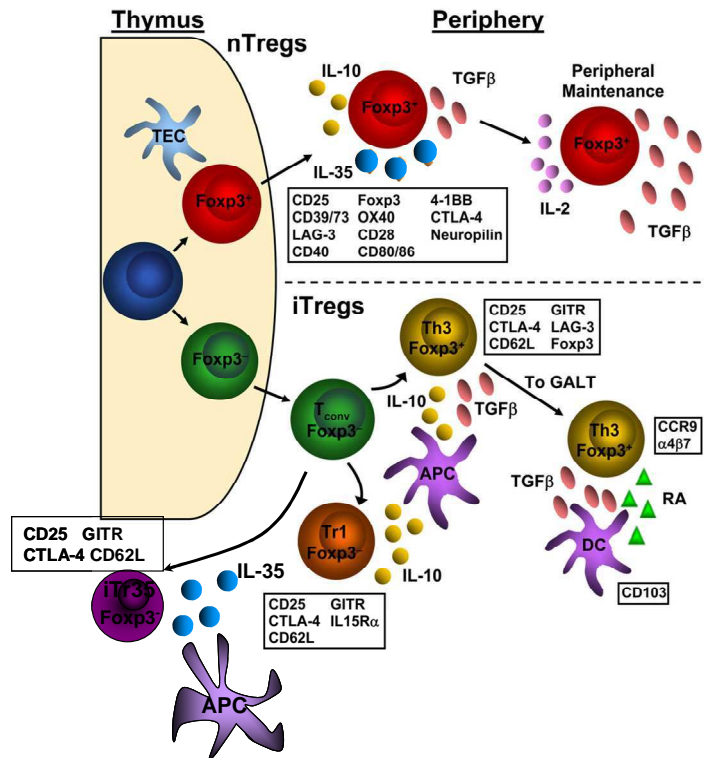
Les tumeurs peuvent également exprimer des récepteurs solubles qui serviront de leurres pour les ligands des récepteurs de mort. Deux récepteurs solubles, Fas soluble et le « decoy receptor 3 » (DcR3), inhibent de façon compétitive le récepteur Fas. La protéine DcR3 peut également inhiber la lyse induite par TRAIL [Ozoren et al. 2003]. Des niveaux élevés de Fas soluble ont été détectés dans le sérum de patients atteints de lymphome T ou de tumeurs non lymphoïdes telles que le mélanome [Ugurel et al. 2001]. Une amplification du gène codant DcR3 ou une augmentation de l'expression de la protéine ont été détectés dans des carcinomes et des glioblastomes [Ibrahim et al. 2001; Roth et al. 2001; Takahama et al. 2002; Chen et al. 2008]. Macher-Goeppinger et collaborateurs ont montré que la forte expression de DcR3 observée dans 9.3% des carcinomes rénaux est associée à une fréquence accrue de métastases ganglionnaires et inversement corrélée avec la survie des patients [Macher-Goeppinger et al. 2008].

Le facteur de transcription NF κ B est également impliqué dans la résistance à l'apoptose de certains types de tumeurs [Bours et al. 2000]. Physiologiquement, NF κ B est

séquestré dans le cytoplasme sous forme inactive par la protéine I κ B α . Divers stimuli externes incluant les cytokines, les PAMP et les DAMP peuvent conduire à l'ubiquitinylation d'I κ B α et à sa dégradation consécutive par le protéasome. NF- κ B migre alors dans le noyau, où en fonction du contexte, il peut activer des gènes pro- ou anti-apoptotiques. Dans de nombreux cancers humains, en particulier dans le lymphome de Hodgkin, des mutations ou une amplification des gènes codant les protéines du dimère NF κ B et/ou des protéines régulatrices de son activation sont impliqués dans la survie cellulaire [Kuppers 2009; Schumacher et al.].

- Les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs

La tolérance au soi et l'homéostasie du système immunitaire sont activement maintenus en périphérie par une sous-population de lymphocytes T CD4⁺, dits T régulateurs (Treg) exprimant fortement la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25), cytokine essentielle à leur survie. Deux sous-populations ont été décrites : les lymphocytes Treg naturels développés dans le thymus et les lymphocytes Treg induits en périphérie à partir des T CD4⁺ conventionnels lors d'une stimulation antigénique [Workman et al. 2009]. Le programme suppresseur des Treg est gouverné par le facteur de transcription « Forkhead box P3 » (FoxP3). Parmi les populations T CD4⁺ immunosuppressives induites en périphérie, les lymphocytes Treg de type 1 (Tr1) [Groux et al. 1997] et les lymphocytes T helper 3 (Th3) [Chen et al. 1994] sont respectivement induits par l'IL-10 et le TGF- β et produisent chacun ces cytokines immunosuppressives [Chen et al. 1994; Groux et al. 1997]. Plus récemment, les iTr 35 induits par l'IL-35 et exerçant leur rôle immunosuppresseur *via* cette cytokine, ont été décrits. Ce dernier sous-type n'exprime pas FoxP3 [Vieira et al. 2004; Collison et al. 2010]. Les lymphocytes Treg représentent environ 5% des lymphocytes T CD4⁺ circulants. Chez la souris, environ la moitié serait induit en périphérie [Lathrop et al. 2008]. Les lymphocytes Treg naturels et induits ont un phénotype similaire comprenant l'expression de CD25, CTLA-4, « glucocorticoid-induced TNF receptor » (GITR), et de la sélectine L (CD62L) et l'absence d'expression du récepteur à l'IL-7 (CD127) (**Figure 11**).



D'après C. Workman. Cell Mol Life SC. 2009

Figure 11: Développement et phénotype des Treg.

Les Treg naturels (nTreg) se développent à partir de lymphocytes T CD4⁺ dans le thymus sous contrôle du facteur de transcription FoxP3. En périphérie, les nTreg peuvent sécréter les cytokines IL-10, IL-35 et TGFβ. Les Treg inductibles (iTreg) sont générés à partir de lymphocytes T CD4⁺ conventionnels naïfs sous l'influence des cytokines IL-35, IL-10 et/ou TGFβ qui induisent respectivement les populations iTr35, Tr1 et Th3. L'acide rétinoïque sécrété par les cellules dendritiques CD103⁺ du tissu lymphoïde associé aux muqueuses peut également participer à l'induction des iTreg de type Th3.

Les lymphocytes Treg sont capables de supprimer des réponses immunitaires variées induites à l'encontre d'antigènes du soi ou du non-soi. Une fois activés de façon spécifique de l'antigène, ils peuvent exercer leur effet suppresseur indépendamment de celui-ci [Nishikawa et al. 2010]. Cependant, les mécanismes de suppression impliquent généralement un contact du Treg avec sa cellule cible ou au moins un rapprochement [Collison et al. 2010]

Parmi les facteurs conditionnant la différenciation périphérique en Treg, un rôle de la voie mTOR a été récemment montré. L'inactivation chimique ou génétique de cette voie chez la souris facilite la différenciation des lymphocytes T conventionnels en Treg *in vitro* et *in vivo* [Delgoffe et al. 2009]. En accord avec ces données, la stimulation de lymphocytes T CD4⁺ dans un milieu appauvri en acides aminés essentiels augmente leur différenciation en lymphocytes Treg en présence de faibles concentrations de TGFβ [Cobbold et al. 2009]. La consommation de tryptophane par l'enzyme Indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) exerce un effet similaire [Baban et al. 2009; Sharma et al. 2009], (voir ci-dessous le paragraphe consacré à cette enzyme).

De nombreuses études ont montré que les lymphocytes Treg sont augmentés dans le microenvironnement tumoral et les ganglions de drainage de différents types de cancer [Woo et al. 2001; Liyanage et al. 2002; Curiel et al. 2004; Viguier et al. 2004; Kawaida et al. 2005; Sato et al. 2005; Schaefer et al. 2005; Yang et al. 2006], ce qui est généralement associé à un mauvais pronostic [Sasada et al. 2003; Curiel et al. 2004; Sato et al. 2005; Bates et al. 2006], à l'exception de certains types de lymphomes [Alvaro et al. 2005; Carreras et al. 2006]. Le recrutement des lymphocytes Treg CCR4⁺ au sein de la tumeur peut être lié à la chimiokine CCL22 exprimée par les cellules tumorales ou les macrophages infiltrant la tumeur [Curiel et al. 2004; Ishida et al. 2006].

Les lymphocytes Treg naturels ou induits disposent de trois types de mécanismes suppresseurs : production de cytokines immunosuppressives, inhibition dépendante du contact et interaction avec les cellules présentatrices d'antigènes (**Figure 12**).

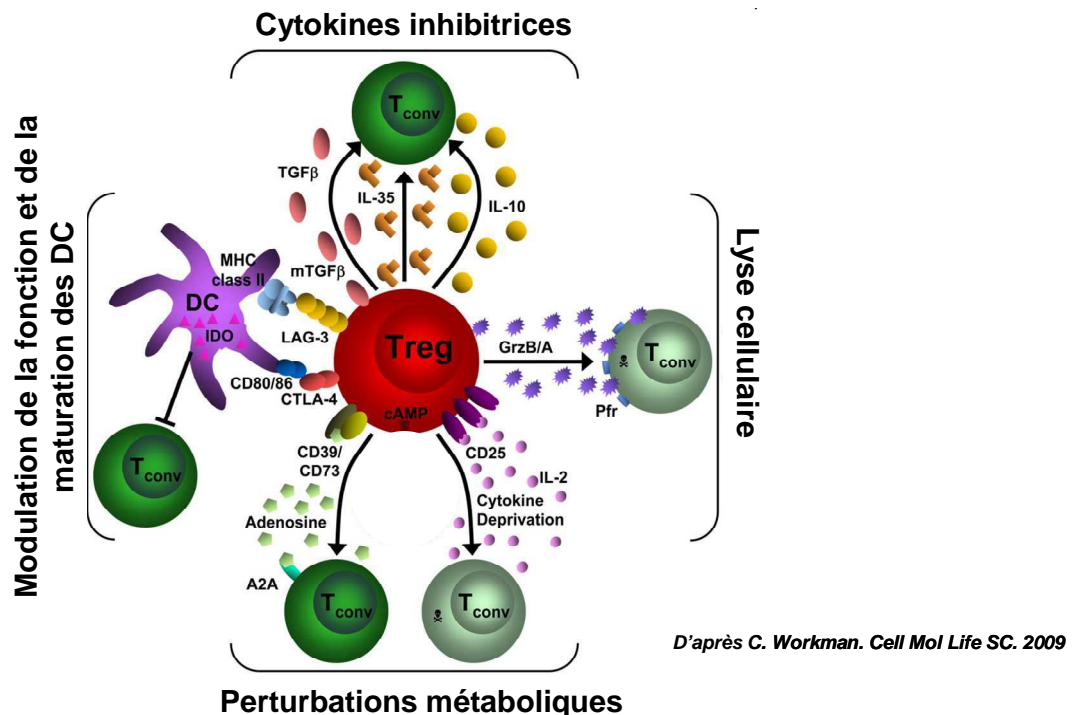


Figure 12: Mécanismes de suppression induits par les Treg.

Les Treg produisent des cytokines inhibitrices (IL-10, TGFβ et IL-35). Ils peuvent également induire la mort d'un lymphocyte T conventionnel (Tconv) via la sécrétion de granules cytotoxiques perforine/granzymes. Ils interfèrent avec le métabolisme des lymphocytes Tconv en les privant d'IL-2 ou de nutriments. Ils modulent la maturation ou la fonction des cellules dendritiques (DC) via l'interaction de CTLA-4 avec CD80/86. Enfin, ils induisent l'expression de l'enzyme immunosuppressive IDO par les DC. GrzB/A= granzyme B ou A, Pfr= perforine.

Les cytokines inhibitrices TGF-β, IL-10, et IL-35 peuvent être exprimées par les lymphocytes Treg et jouer un rôle dans leur effet suppresseur [Sojka et al. 2008; Tang et al. 2008; Collison et al. 2009]. Le TGF-β est essentiel pour le maintien des lymphocytes

Treg naturels [Huber et al. 2004]. En périphérie, il permet le développement à partir de cellules T CD4⁺ naïves de lymphocytes de type Th3, qui eux-mêmes exercent leurs fonctions suppressives *via* la production de TGF- β [Weiner 2001]. Au sein d'une tumeur, les cellules cancéreuses et les cellules dendritiques peuvent sécréter le TGF β nécessaire à cette différenciation [Ghiringhelli et al. 2005; Liu et al. 2007]. Le TGF- β exprimé à la membrane des lymphocytes Treg inhibe les cellules NK en diminuant l'expression du récepteur activateur NKG2D à leur surface, ce qui facilite la croissance de tumeurs chez la souris [Ghiringhelli et al. 2005].

L'IL-10 peut être produite par les lymphocytes Treg, en particulier les Treg induits de type Tr1 [Vieira et al. 2004]. De nombreuses expériences confirment son rôle dans l'immunosuppression induite *in vivo* par les lymphocytes Treg. Dans un modèle murin dans lequel la tolérance à une greffe de peau allogénique est induite par le transfert adoptif de cellules CD4⁺ CD25⁺, l'injection d'un anticorps bloquant le récepteur de l'IL-10 provoque le rejet des transplants [Kingsley et al. 2002]. Dans un modèle de carcinogénèse induite par les ultra-violets, connu pour la forte expansion de la population Treg, les souris inactivées pour l'IL10 sont protégées du développement de carcinomes de la peau, du fait de la perte des capacités suppressives de ces Treg vis-à-vis des lymphocytes T conventionnels CD4⁺ CD25⁻ [Loser et al. 2007]. Chez l'homme, Strauss et collaborateurs ont montré que les lymphocytes Treg infiltrant des carcinomes ORL produisent de l'IL-10 et du TGF- β . Dans un système autologue *in vitro* comprenant les lymphocytes Treg isolés de ces patients, l'utilisation d'anticorps neutralisant ces cytokines restaure de façon synergique la prolifération des lymphocytes T [Strauss et al. 2007].

Récemment, l'équipe de D. Vignali a identifié une nouvelle cytokine, l'IL-35, produite par les lymphocytes Treg naturels. Cette cytokine, membre de la famille de l'IL-12, est un hétérodimère composé de la chaîne IL-27 β EBI3 (Epstein-Barr-virus-induced-gene 3) et de la chaîne IL-12 α p35 [Collison et al. 2008]. La capacité suppressive *in vitro* et *in vivo* des lymphocytes Treg Ebi3^{-/-} et IL12 α ^{-/-} est diminuée par rapport aux lymphocytes Treg exprimant ces protéines. De plus, l'IL-35 recombinante inhibe *in vitro* la prolifération des lymphocytes T [Collison et al. 2007]. Grâce à la production d'IL-35 et d'IL-10, les Treg naturels transforment en périphérie chez l'homme et la souris les lymphocytes T conventionnels en lymphocytes Treg Foxp3⁻ appelés iTr35, qui, à leur tour, présentent une activité suppressive dépendante de la sécrétion d'IL-35 [Collison et al. 2010]. Dans des modèles de mélanome et d'adénocarcinome colorectal, Vignali et ses collaborateurs

ont également montré que les lymphocytes Treg FoxP3⁻ et Foxp3⁺ infiltrant la tumeur expriment l'IL-35, ces derniers exprimant plus fortement la cytokine que les Treg Foxp3⁺ de la rate. Dans ces modèles tumoraux, l'IL-35 inhibe la prolifération de lymphocytes T conventionnels, [Collison et al. 2010] ce qui facilite la croissance tumorale.

Les lymphocytes Treg peuvent également tuer les cellules T conventionnelles et d'autres populations de cellules immunes de façon dépendante de la voie perforine/granzymes. [Grossman et al. 2004; Gondek et al. 2005; Cao et al. 2007]. Dans un modèle de transfert adoptif de cellules tumorales chez la souris, Cao et collaborateurs ont montré que 5 à 30% des lymphocytes Treg du microenvironnement tumoral exprimaient fortement le granzyme B et que cette expression était responsable de l'élimination de cellules NK et T CD8⁺ antitumorales et de l'échappement de la tumeur à leur contrôle. [Cao et al. 2007].

Enfin, les lymphocytes Treg ont été impliqués dans la modulation des fonctions des cellules présentatrices d'antigène par le biais de cytokines ou de molécules de surface. Par exemple, l'IL-10 induit l'expression de la molécule inhibitrice B7-H4 à la surface des cellules présentatrices d'antigène, ce qui empêche l'activation optimale des lymphocytes T [Kryczek et al. 2006]. Dans les carcinomes ovariens humains, l'étude des populations infiltrant la tumeur a montré une corrélation entre l'intensité de l'expression de B7-H4 à la surface des macrophages et le nombre de lymphocytes Treg, ces deux paramètres étant également associés au pronostic [Kryczek et al. 2006; Kryczek et al. 2007]. Les lymphocytes Treg peuvent également induire la diminution de l'expression des molécules de costimulation CD80/86 et l'expression de l'enzyme immunosuppressive IDO au niveau des cellules présentatrices de l'antigène, par un contact direct dépendant de CTLA-4. [Grohmann et al. 2002; Fallarino et al. 2006]. L'IDO a une double action : elle inhibe directement la prolifération des lymphocytes T effecteurs et active les lymphocytes Treg dans les ganglions drainant la tumeur, ce qui leur permet à leur tour d'induire l'expression des molécules co-inhibitrices PDL-1 et PDL-2 à la surface des cellules dendritiques [Sharma et al. 2007]. Chez la souris dont les lymphocytes Treg sont déficients en CTLA-4, une robuste réponse anti-tumorale peut être développée [Wing et al. 2008].

D'autres types de mécanismes ont pu être mis en évidence dans l'effet inhibiteur des Treg, tels que la compétition avec les lymphocytes T effecteurs pour les ressources en IL-2 [Barthlott et al. 2005; Pandiyan et al. 2007]. Le rôle joué par ces populations cellulaires est donc complexe et multiforme et pourrait différer selon le type et la localisation de la tumeur. De plus, il est important de noter que les lymphocytes Treg sont éduqués *in vivo* à

maintenir la tolérance au soi. Ainsi, il a été récemment montré que les lymphocytes Treg mémoires spécifiques des antigènes du soi, s'activent précocement dans le ganglion de drainage lors de l'émergence d'une tumeur et prennent rapidement l'avantage face aux lymphocytes T effecteurs. Leur expansion précoce, qui coïnciderait avec la surexpression d'IDO par les cellules présentatrices d'antigène, constitue un frein initial au développement d'une immunité antitumorale efficace [Darrasse-Jeze *et al.* 2009]. Une telle vision du développement de la réponse immunitaire antitumorale va à l'encontre de la théorie de l'immunoediting.

- Les lymphocytes T CD8⁺ régulateurs

Bien que les lymphocytes T CD8⁺ régulateurs aient été décrits dès le début des années 70 par Gershon et ses collaborateurs [Gershon *et al.* 1970], ces cellules restent très mal caractérisées. Les premières études ont été menées dans des modèles animaux de maladies auto-immunes. Ainsi, les lymphocytes T CD8⁺ régulateurs ont été associés à la protection contre l'encephalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) chez les rongeurs [Sun *et al.* 1988; Jiang *et al.* 1992; Lohse *et al.* 1995].

Le phénotype des lymphocytes T CD8⁺ régulateurs n'est pas encore clairement établi. Cependant, chez l'homme et la souris, des populations exprimant des marqueurs caractéristiques des cellules T activées, CD122, CD25 ou CD45 ont été décrites [Cosmi *et al.* 2004; Xystrakis *et al.* 2004; Rifa'i *et al.* 2008]. Ces cellules n'expriment généralement pas le facteur de transcription Foxp3 [Filaci *et al.* 2011].

Des lymphocytes T régulateurs CD8⁺ sécrétant de l'IL-10 ont été mis en évidence par Jarnicki et collaborateurs dans un modèle murin de cancer du colon. De façon surprenante, l'élimination des T CD8⁺ dans ce modèle diminue significativement le développement de métastases pulmonaires après injection intraveineuse des cellules tumorales, tandis qu'elle augmente la charge tumorale dans le cas d'injection sous-cutanée. Ainsi l'environnement physiologiquement immunosuppresseur des poumons semble favorable à l'induction d'une population régulatrice CD8⁺ [Jarnicki *et al.* 2006].

Chez l'homme, une population cellulaire qui présente une activité suppressive et exprime CD8, CCR7, CD45RO et IL-10 a été décrite chez des patientes atteintes de carcinome ovarien. Le développement de cette population est induit par les cellules dendritiques plasmacytoïdes infiltrant la tumeur et ne dépend pas de la présence de lymphocytes Treg CD4⁺. Grâce à l'expression du récepteur CCR7, ces cellules migrent au

site de la tumeur en réponse la chimiokine MIP-3 β /CCL19. L'IL10 leur permet de supprimer la réponse effectrice T *via* l'inhibition des cellules présentatrices d'antigène [Wei *et al.* 2005]. Le mécanisme exact de cette suppression reste cependant encore à définir.

Dans un modèle murin de carcinogénèse chimique de la peau, une comparaison du transcriptome de lymphocytes T CD8⁺ circulants et intra-tumoraux montre chez ces derniers un profil transcriptionnel associant des molécules Th17 (ROR γ T, IL17) et des molécules régulatrices (FoxP3, IL-10). Ce profil d'expression est fortement associé avec la progression de la lésion bénigne vers la transformation en carcinome. Cette étude montre en outre, que ces lymphocytes expriment l'enzyme Interleukin-4 induced gene 1 (IL4I1), objet de cette thèse, pouvant suggérer un nouveau mécanisme d'immunosuppression induit par les lymphocytes T CD8⁺ pro-tumoraux [Kwong *et al.* 2010].

- Les cellules dendritiques (DC) tolérogènes.

Il est sans doute important de noter d'emblée que le rôle quotidien des DC est de permettre le maintien de la tolérance aux antigènes du soi, ce qui nécessite une capacité à faciliter la différenciation et l'expansion des Treg [Reis e Sousa 2006].

Les DC tolérogènes sont habituellement définies par un phénotype immature ou semi-mature (faible expression des molécules de CMH et/ou de co-stimulation) responsable d'une diminution de leur capacité à activer les lymphocytes T. Elles présentent souvent une forte production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF β) et peuvent exprimer à leur surface des molécules co-inhibitrices de l'activation lymphocytaire T, telles que PDL-1 ou B7-H4 [Tsushima *et al.* 2007]. De plus, les DC tolérogènes peuvent exprimer l'enzyme IDO [von Bergwelt-Baildon *et al.* 2006]. Comme précédemment évoqué, IDO bloque la prolifération des lymphocytes T effecteurs et active la différenciation et les fonctions des lymphocytes Treg [Munn *et al.* 1999; Sharma *et al.* 2007].

Certains facteurs présents dans l'environnement tumoral, tels que l'IL-10, le TGF β , la prostaglandine E2, le VEGF et le SDF-1 [Zou *et al.* 2001; Chemnitz *et al.* 2006] peuvent être responsables de la génération de ces DC tolérogènes.

De nombreuses DC myéloïdes mais également plasmacytoïdes sont présentes dans les tumeurs ou dans les ganglions drainant le site tumoral [Chaux *et al.* 1997; Enk *et al.* 1997; Nestle *et al.* 1997; Troy *et al.* 1998; Troy *et al.* 1998]. Cependant, la plupart de ces

cellules ont un phénotype immature [Gabrilovich 2004]. Perrot et collaborateurs ont rapporté que les DC infiltrant la tumeur, isolées de patients atteints de cancer du poumon, sont « semi-matures » et tolérogènes. Après stimulation *in vitro* par des ligands des TLR, elles restent incapables de murer totalement, sécrètent peu de cytokines inflammatoires et ne migrent pas sous l'effet de facteurs chimiotactiques [Perrot et al. 2007]. Les DC des ganglions drainant la tumeur présentent également un état d'activation réduit associé à une augmentation de la sécrétion d'IL-10 [Essner 2006; Shu et al. 2006]. Ce phénomène est corrélé avec un défaut d'activation des lymphocytes T et une diminution de leur production de cytokines. Le nombre de DC immatures et de cellules souches hématopoïétiques exprimant CD34 est également augmenté dans le sang circulant de patients atteints de cancer [Gabrilovich et al. 1997; Ishida et al. 1998]. Après culture *in vitro*, ces dernières sont incapables de se différencier en DC totalement matures [Lathers et al. 1999] et leur cytotoxicité vis-à-vis des cellules tumorales est diminuée [Essner 2006].

- Les cellules myéloïdes suppressives.

La capacité des tumeurs à affecter la myélopoïèse et induire l'expansion de cellules myéloïdes de phénotype immature, présentant une activité immunosuppressive, a été largement documentée aussi bien dans les modèles animaux que chez l'homme [Gabrilovich et al. 2001; Zea et al. 2005; Gallina et al. 2006; Huang et al. 2006]. Ces cellules ont récemment reçu la dénomination commune de « Myeloid-derived suppressor cells » (MDSC) [Gabrilovich et al. 2007]. Il n'existe pas de marqueur spécifique des MDSC, qui constituent une population très hétérogène comprenant des macrophages immatures, des polynucléaires, des cellules dendritiques et d'autres cellules myéloïdes à des stades précoces de différenciation [Sica et al. 2007; Gabrilovich et al. 2009]. Chez la souris, elles sont identifiées par la co-expression de deux marqueurs myéloïdes : la sous-unité d'intégrine CD11b et Gr1 [Gabrilovich et al. 2007]. Les cellules exprimant le plus fortement Gr1 ont plutôt une morphologie de polynucléaires, tandis que les cellules qui l'expriment plus faiblement sont composées de monocytes et de progéniteurs myéloïdes. Les anticorps anti-Gr1 reconnaissent en fait deux molécules de la famille Ly6, Ly6G et Ly6C. A l'aide d'anticorps dirigés spécifiquement contre ces molécules, il est possible de séparer plus finement les MDSC de type granuleux CD11b⁺, Ly6G⁺, Ly6C^{low}, des MDSC de type monocytique CD11b⁺, Ly6G⁻, Ly6C^{hi}. Ces deux populations présentent des capacités inhibitrices des réponses T qui reposent sur des mécanismes différents

[Movahedi et al. 2008]. D'autres marqueurs de surface tels que CD80, CD115 (récepteur du Macrophage-Colony Stimulating Factor), CD16/32 (récepteurs du fragment Fc des IgG) ou CD124 (chaîne α du récepteur à l'IL-4, IL-4R α) ont été utilisés pour identifier des sous-populations de MDSC murines [Gallina et al. 2006; Huang et al. 2006; Yang et al. 2006].

Chez l'homme, le phénotype des MDSC est encore moins bien défini du fait de l'absence d'homologue de la molécule Gr1. Différentes définitions phénotypiques ont été proposées selon le type de cancer étudié [Gabilovich et al. 2009; Peranzoni et al. 2010]. Ainsi, dans les carcinomes rénaux et dans les cancers du poumon non à petite cellules, il semblerait que les MDSC expriment CD33, CD11b, et des niveaux hétérogènes de CD15, alors qu'elles n'expriment pas HLA-DR, ni le CD14 [Kusmartsev et al. 2008; Liu et al. 2009]. Dans le sang de patients atteints de cancer du colon et de mélanome, les MDSC sont définies par l'expression commune de CD124 et par l'expression de CD14 pour la sous-population monocytaire et de CD15 pour la sous-population granuleuse [Mandrizzato et al. 2009].

Chez les souris saines, les cellules CD11b⁺ et Gr1⁺ sont rares dans la rate et le sang et représentent une part relativement importante mais variable en fonction du fond génétique, des cellules de la moelle osseuse. Elles s'accumulent fortement dans ces trois compartiments après développement tumoral [Kusmartsev et al. 2005]. Le nombre de MDSC varie d'un modèle tumoral à l'autre. Chez la souris, la plus faible expansion des MDSC est induite par les sarcomes tandis que la plus forte expansion est détectée avec les carcinomes du sein, les thymomes et les carcinomes du colon. Chez l'homme, une corrélation significative entre le stade clinique de la tumeur, la capacité métastatique des tumeurs et le nombre de MDSC circulantes a été mis en évidence [Diaz-Montero et al. 2009].

Les MDSC sont produites en réponse à des facteurs sécrétés par les cellules tumorales, comme suggéré par leur diminution après exérèse de la tumeur ou l'observation d'une relation entre le nombre de MDSC et la dimension de la tumeur [Salvadori et al. 2000]. Plus précisément, le niveau d'expansion et d'activation des MDSC est déterminé par la nature des facteurs solubles produits [Youn et al. 2008], certains étant plus spécifiques d'un type de tumeur. Ces facteurs incluent l'IL-1 β [Song et al. 2005], l'IL-6 [Bunt et al. 2007], la prostaglandine E2 [Sinha et al. 2007], la cyclooxygénase 2 [Rodriguez et al. 2005; Talmadge et al. 2007], les protéines liant le calcium S100A8/A9 [Sinha et al. 2008], la molécule C5a du complément [Markiewski et al. 2008], le VEGF [Gabilovich et al. 1998; Melani et al. 2003], le « stem cell factor » (SCF) [Pan et al. 2008],

le GM-CSF [Serafini et al. 2004], et les ligands de CXCR2 [Sawanobori et al. 2008]. La plupart de ces facteurs agit en induisant une activation excessive et prolongée du facteur de transcription STAT3 au cours de la myélopoïèse [Gabrilovich et al. 2009]. D'autres facteurs tels que l'IFN γ l'IL-13, les ligands des TLR3 et 4 et le TGF β qui peuvent être produits par les cellules tumorales ou des cellules immunitaires sont nécessaires à l'activation des fonctions suppressives des MDSC. Une étude récente réalisée par Greifenberg et collaborateurs a montré chez la souris saine que le développement et l'activation des MDSC sont augmentés par l'injection simultanée de lipopolysaccharide et d'IFN γ . Ces deux molécules bloquent la différenciation en DC matures et activent la production de NO, molécule perturbant les fonctions cellulaires T [Greifenberg et al. 2009]. Ainsi, paradoxalement, des facteurs impliqués dans l'activation de réponses Th1 et T cytotoxiques jouent dans ces circonstances un rôle promoteur de l'échappement tumoral. (figure 13).

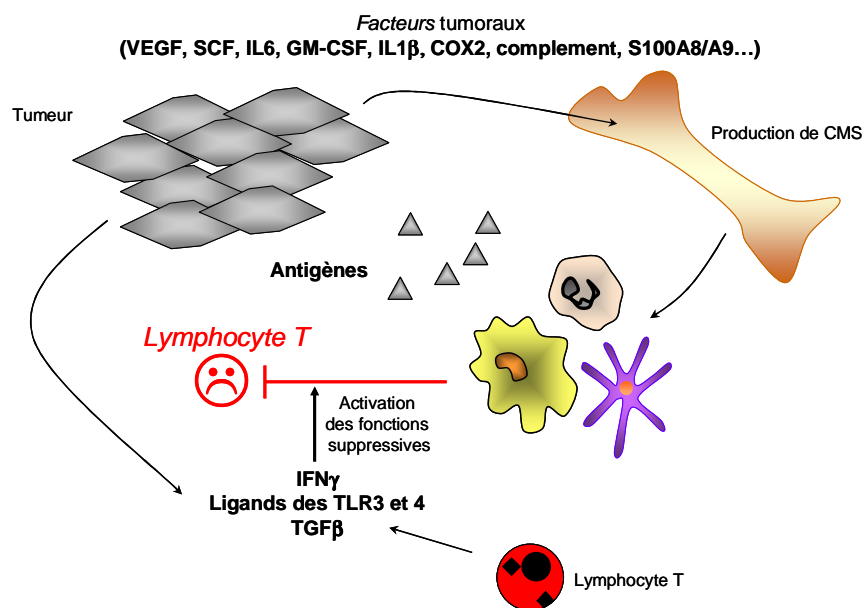


Figure 13: Recrutement et activation des MDSC dans le cancer.

Les MDSC représentent une population de cellules myéloïdes immatures produites dans la moelle osseuse en réponse à de nombreux facteurs sécrétés par la tumeur. Les capacités suppressives de ces cellules sont activées par l'IFN γ , des ligands des TLR3 et 4 ou encore le TGF β . Ces différents facteurs peuvent être produits par les cellules tumorales ou par les lymphocytes T.

La réduction du nombre de MDSC chez des souris atteintes de cancer par traitement avec un anticorps bloquant Gr1 [Terabe et al. 2003], ou la gemcitabine (drogue chimiothérapeutique) [Suzuki et al. 2005; Sinha et al. 2007] ou encore l'induction de la

différenciation des MDSC en cellules plus matures grâce à l'acide rétinoïque [Kusmartsev et al. 2003], augmente l'activation cellulaire T et retarde la progression tumorale. Le traitement par acide rétinoïque de patients atteints de cancer induit des résultats similaires [Mirza et al. 2006].

Les MDSC affectent à la fois les réponses anti-tumorales innée et adaptative (figure 14).

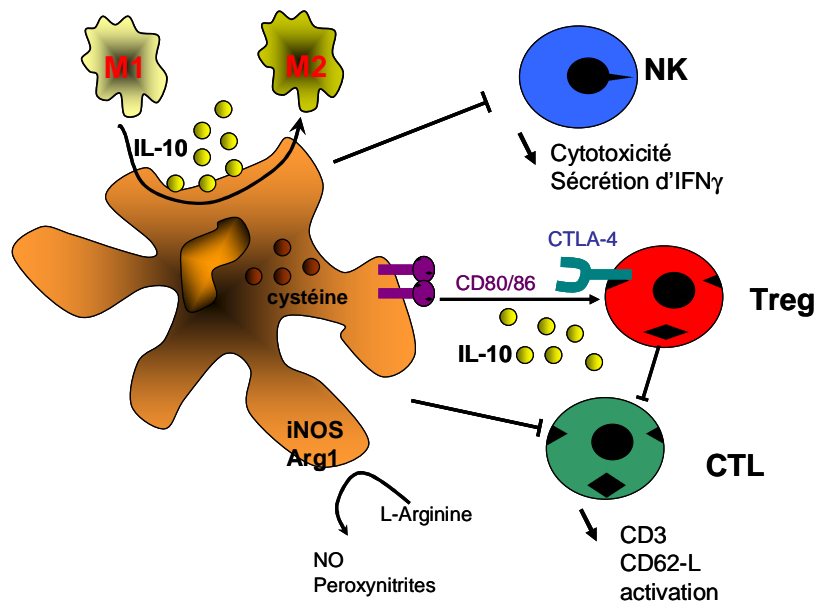


Figure 14: Mécanismes de suppression des MDSC.

Les MDSC peuvent moduler les réponses immunitaires innée et adaptative. Elles induisent la re-polarisation des macrophages anti-tumoraux M1 en macrophage pro-tumoraux M2 via la production d'IL-10. Elles inhibent la cytotoxicité et la sécrétion d'IFN γ par les cellules NK. Elles inhibent également les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) via la production d'enzymes immunosuppressives (la synthétase de l'oxyde nitrique (iNOS) et l'Arginase I (Arg I). Ces enzymes induisent l'appauvrissement du milieu en L-arginine et produisent des métabolites toxiques tels que l'oxyde nitrique (NO) et les peroxynitrites. Elles peuvent également séquestrer dans leur cytoplasme des nutriments essentiels au lymphocyte T activé tels que la cystéine. Les MDSC recrutent et d'activent les lymphocytes Treg via notamment la surexpression des molécules CD80/86.

En présence de MDSC, les macrophages classiquement activés de type M1 sont convertis en macrophages M2 qui accroissent la progression tumorale [Sinha et al. 2005]. Cette re-polarisation est le résultat de signaux échangés entre les MDSC et les macrophages qui stimulent la production d'IL-10 par les MDSC et inhibent la sécrétion d'IL-12 par les macrophages [Sinha et al. 2007]. Les MDSC inhibent également les fonctions des cellules NK et des lymphocytes T effecteurs et induisent le développement de lymphocytes Treg [Suzuki et al. 2005; Liu et al. 2007]. Les MDSC inhibent essentiellement les lymphocytes T CD8⁺ et peu ou pas les lymphocytes T CD4⁺, probablement du fait qu'elles expriment très peu les molécules de CMH de classe II. Cette

suppression nécessiterait des contacts cellules-cellules, ce qui suggère le rôle de récepteurs de surface ou de médiateurs solubles à courte durée de vie. Le rôle d'une reconnaissance des complexes CMH-peptide est controversé [*Sinha et al. 2005; Nagaraj et al. 2007*]

Les mécanismes d'inhibition des réponses cellulaires T par les MDSC reposent principalement sur le métabolisme d'acides aminés essentiels et la production de réactifs oxygénés. Historiquement, l'activité suppressive des MDSC décrite chez la souris a été associée à l'expression d'enzymes métabolisant la L-arginine : l'arginase I (Arg I) et la synthétase inductible de l'oxyde nitrique (iNOS). L'activité de ces enzymes appauvrit le milieu en L-arginine nécessaire à la prolifération des lymphocytes T activés et produit des métabolites toxiques tels que le NO ou ses dérivés hautement réactifs, les peroxy-nitrites [*Movahedi et al. 2008; Youn et al. 2008*]. Le rôle d'autres enzymes métabolisant les acides aminés a été évoqué. En particulier, Gallina et collaborateurs ont montré que l'enzyme IL4I1 est surexprimée après 24h de culture des MDSC de phénotype CD11b⁺ et IL-4R α ⁺ isolées de la rate de souris présentant des tumeurs [*Gallina et al. 2006*]. Les mécanismes d'action de ces enzymes seront décrits plus précisément dans le chapitre « enzymes immunosuppressives ». Selon un mécanisme proche, les MDSC peuvent bloquer l'activation des lymphocytes T en séquestrant des nutriments essentiels aux lymphocytes T activés, par exemple, la cystéine, habituellement apportée par les cellules présentatrices de l'antigène. Une étude récente a montré que les MDSC sont capables de stocker dans leur cytoplasme de fortes concentrations de cystéine empêchant ainsi la prolifération et la différenciation des lymphocytes T [*Srivastava et al. 2011*].

Il semblerait que les MDSC perturbent également l'activation T en induisant la différenciation de lymphocytes Treg par un mécanisme encore non élucidé. L'implication du TGF β dans ce phénomène est controversée [*Huang et al. 2006; Serafini et al. 2008*]. Les MDSC pourraient également activer les lymphocytes Treg déjà présents au site de la tumeur, car elles surexpriment la molécule membranaire CD80 qui peut se lier à la molécule CTLA-4 exprimée à la surface des lymphocytes Treg, activant leur fonctions immunosuppressives [*Yang et al. 2006*].

Les MDSC peuvent enfin bloquer la migration des lymphocytes vers la tumeur et les ganglions qui la drainent. La migration vers ces deux sites nécessite l'expression à la membrane des lymphocytes T de la L-sélectine (CD62L). [*Bradley et al. 1994; Tedder et al. 1995*]. Or, les MDSC expriment constitutivement la protéine ADAM17 qui clive CD62L et diminue ainsi son expression membranaire [*Hanson et al. 2009*]. Chez les souris et les

patients atteints de cancer, le niveau d'expression membranaire de CD62L est inversement corrélé avec le nombre de MDSC. De plus, la résection de la tumeur, en diminuant le nombre de MDSC, augmente l'expression de la L-sélectine à la surface des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ circulants [Hanson et al. 2009]. Des résultats similaires ont été observés chez des souris traitées à la gemcitabine qui réduit sélectivement l'accumulation de MDSC [Sinha et al. 2007].

- Les macrophages alternatifs de type M2.

Dans un parallèle avec la littérature décrivant les lymphocytes T auxiliaires, deux types de différenciation ont été définis pour les macrophages : le type M1 (ou activation classique) et le type M2 (ou activation alternative) [Gordon 2003]. Cependant, à la différence des lymphocytes Th1 et Th2, les macrophages présentent une remarquable plasticité qui leur permet de répondre efficacement aux signaux environnementaux par des changements profonds de leur phénotype et de leur physiologie, y compris leurs capacités de présentation antigénique et d'activation des cellules immunitaires, leurs propriétés phagocytaires et leurs propriétés dites « cicatrisantes » (angiogenèse et remodelage de la matrice extracellulaire). Ainsi, le type M2 correspond en fait à de nombreux types de macrophages ne présentant pas les caractéristiques d'une activation classique [Martinez et al. 2008].

Le macrophage M1, obtenu *in vitro* par stimulation avec l'IFN γ et le TNF α , est considéré comme responsable de l'activité tumoricide. Il est caractérisé par la sécrétion de cytokines et médiateurs proinflammatoires (IFN γ , IL-12, TNF α , médiateurs lipidiques) et de réactifs dérivés du NO et de l'oxygène et présente une forte activité phagocytaire.

In vitro, de nombreux stimuli ont été impliqués dans l'activation alternative des macrophages. Par exemple, l'IL-4 et l'IL-13 activent une population M2 incapable de présenter l'antigène aux lymphocytes T et produisant peu de cytokines pro-inflammatoires [Edwards et al. 2006]. D'autres macrophages M2 peuvent être obtenus après activation par des agonistes des TLR en présence de complexes immuns IgG, des prostaglandines, des glucocorticoïdes, des corps apoptotiques ou encore de l'IL-10 ou du TGF- β . Ces macrophages présentent à des degrés variables un phénotype immunosuppresseur avec augmentation de la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires [Strassmann et al. 1994; Gerber et al. 2001; Anderson et al. 2002] et sont susceptibles de faciliter l'angiogenèse, la

croissance tumorale et le développement de métastases [Mantovani et al. 2004]. Cette polarisation fait intervenir la voie de signalisation de NF- κ B. En effet, le phénotype M2 est caractérisé par la localisation intranucléaire de l'homodimère inhibiteur p50 [Saccani et al. 2006]. La présence intracellulaire de cet homodimère est associée à la progression tumorale [Li et al. 2009].

Le réseau de cytokines exprimé au sein de la tumeur a un rôle essentiel dans la polarisation des macrophages [Sica et al. 2006]. De nombreuses études ont montré que les macrophages du microenvironnement tumoral, appelés « Tumor-Associated Macrophages » (TAM), sont principalement de phénotype M2 [Mantovani et al. 2002; Biswas et al. 2006; Saccani et al. 2006]. Cependant, un nombre croissant de travaux suggère que le phénotype des TAM évolue au cours du temps d'un phénotype M1 « antitumoral » vers un phénotype anti-inflammatoire et « protumoral » [Biswas et al. 2008]. En accord avec cette hypothèse, les TAM de certaines tumeurs présentent simultanément des marqueurs de type M1 et de type M2, par exemple de forts niveaux d'iNOS (type M1) et d'Arg I (type M2) [Tsai et al. 2007].

Le rôle des macrophages au sein d'une tumeur reste cependant largement irrésolu. En accord à l'hypothèse d'un phénotype majoritairement M2, la densité de l'infiltrat macrophagique est associée à un mauvais pronostic de nombreuses tumeurs humaines [Lewis et al. 2006]. Cependant, dès les stades infracliniques, les macrophages de phénotype M1 pourraient faciliter le développement tumoral. Il est, en effet, désormais admis que l'inflammation joue un rôle puissamment promoteur de la transformation cellulaire et de la croissance tumorale [Grivennikov et al. 2010]. Dans un article récent [Feng et al. 2010], Feng et collaborateurs ont montré dans un modèle de tumeur induite par un oncogène chez le poisson zèbre, un rôle promoteur dans la croissance tumorale des macrophages et des polynucléaires neutrophiles recrutés dès l'apparition des premières cellules transformées.

Les macrophages issus des monocytes du sang sont recrutés au site de la tumeur *via* différents signaux produits par la tumeur elle-même, tels que le Colony Stimulating Factor-1 (CSF-1), la chimiokine CCL2, le VEGF et l'angiopoïétine-2 [Sica et al. 2007]. Dans un modèle transgénique de souris, la surexpression de CCL2 par des cellules de fibrosarcome induit une augmentation de l'infiltrat macrophagique associée à une progression de la croissance tumorale [Bottazzi et al. 1992].

Les cytokines immunosuppressives IL-10 et TGF- β sont produites à la fois par les cellules tumorales et les TAM [Mantovani et al. 2002]. L'IL-10 facilite la différenciation des

monocytes en macrophages protumoraux de type M2 et bloque leur différenciation en cellules dendritiques [Allavena et al. 2000]. Comme précédemment indiqué, elle induit également la différenciation *de novo* de lymphocytes Treg. Dans le cancer du poumon, les TAM favorisent la progression tumorale en contribuant au remodelage du stroma et à l'angiogenèse *via* la sécrétion de « Platelet Derived Growth Factor » (PDGF) qui agit en synergie avec le TGF- β 1 produit par les cellules tumorales [Mantovani et al. 2002].

Le TGF- β est également impliqué dans l'acquisition de propriétés protumorales par les polynucléaires neutrophiles. Le blocage *in vivo* de cette cytokine permet l'afflux dans la tumeur de polynucléaires neutrophiles activés, cytotoxiques pour les cellules tumorales, exprimant de hauts niveaux de cytokines inflammatoires et activant les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques [Fridlender et al. 2009]. Par analogie avec les macrophages M2 et M1, les auteurs ont proposé de nommer ces polynucléaires pro et antitumoraux, respectivement TAN2 et TAN1.

Comme les MDSC, les polynucléaires et les macrophages de type 2 murins expriment l'Arg I [Rodriguez et al. 2003]. Une partie des TAM et des TAN pourrait être différenciée à partir des MDSC de type monocyttaire et granuleux respectivement [Kusmartsev et al. 2005; Kusmartsev et al. 2005; Sica et al. 2007; Fridlender et al. 2009]. Une autre enzyme immunosuppressive, l'IDO, a également été détectée dans les TAM humains et murins [Munn et al. 1999]. L'acquisition de propriétés immunosuppressives par les populations myéloïdes dans le cancer, qu'il s'agisse de cellules dendritiques, macrophages, polynucléaires ou MDSC semble aujourd'hui largement associée à l'expression par ces différentes populations cellulaires d'enzymes régulant le métabolisme des acides aminés.

III-LES ENZYMES IMMUNOSUPPRESSIVES

Le catabolisme des acides aminés est essentiel au maintien de leurs concentrations physiologiques. Chaque voie de dégradation est caractérisée par une enzyme particulière, souvent impliquée dans l'étape limitante de cette dégradation.

Quatre enzymes intervenant dans le métabolisme d'acides aminés essentiels ou semi-essentiels ont été impliquées dans la modulation de la réponse immunitaire et dans l'échappement tumoral au système immunitaire : l'arginase I (Arg I), la synthétase inductible de l'oxyde nitrique (NOS), l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), et l'interleukine-4 induced gene 1 (IL4I1). Des enzymes catabolisant d'autres acides aminés comme la cystine/cystéine, la glutamine et la histidine pourraient également exercer un rôle immunosuppresseur.

A. Le métabolisme de l'arginine : arginases et synthétases de l'oxyde nitrique.

Dès les années 70, des études ont décrit un rôle de la L-arginine dans la régulation du système immunitaire. En effet, l'injection de L-arginine à des souris ayant subi une intervention chirurgicale lourde permettait d'augmenter le nombre de leurs lymphocytes T [Barbul et al. 1977] et une relation entre le catabolisme de cet acide aminé et les macrophages a été montrée [Albina et al. 1989]. Plus récemment une association entre la diminution rapide des niveaux de L-arginine dans le plasma et l'altération des fonctions cellulaires T (diminution de la prolifération et de la production de cytokines) après une transplantation du foie ou un traumatisme [Kirk et al. 1992; Ochoa et al. 2000; Ochoa et al. 2001] a été suggérée.

La L-Arginine constitue le substrat de 4 enzymes dont deux existent sous plusieurs isoformes: les synthétases de l'oxyde nitrique (NOS neuronale, NOS endothéliale, NOS mitochondriale et NOS inductible), les arginases (Arg I et II), l'arginine-glycine aminotransférase et la L-arginine decarboxylase. Seules les synthétases de l'oxyde nitrique (plus particulièrement iNOS) et les deux isoformes de l'arginase ont été démontrées jouer un rôle dans la réponse immunitaire et seront décrites ci-dessous.

1. Les arginases (Arg).

- Structure et profil d'expression des arginases

Les Arg sont des metalloenzymes qui hydrolysent la L-Arginine pour produire de la L-ornithine et de l'urée. La L-ornithine peut par la suite être métabolisée en polyamines, molécules essentielles à la prolifération cellulaire et participent au cycle de l'urée [Morris 2002] (figure 15).

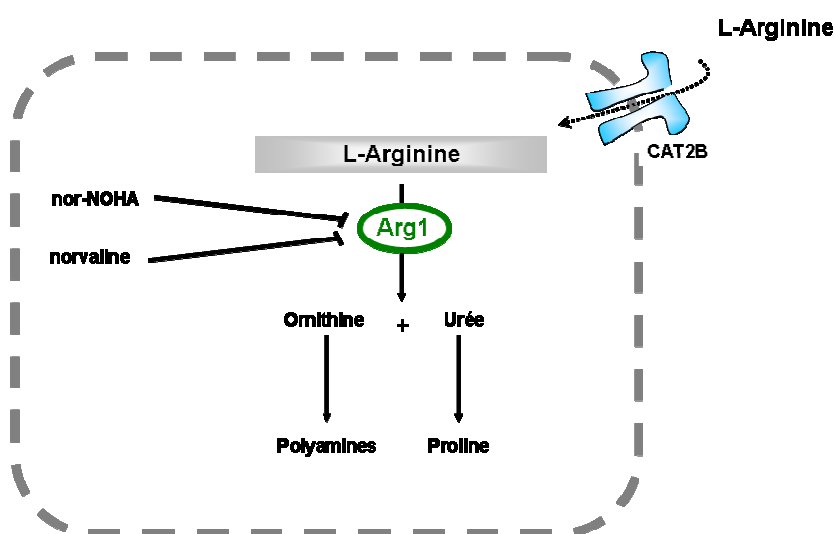


Figure 15: Représentation schématique du catabolisme de la L-arginine par l'Arg I

L'arginase 1 appauvrit le milieu en Arginine afin de produire de l'ornithine et de l'urée qui seront ensuite métabolisés respectivement en polyamines et proline. Le transport de la L-arginine dans la cellule nécessite la présence à la membrane du transporteur CAT2B dont l'expression dépend des cytokines Th2. Actuellement, il existe plusieurs inhibiteurs de l'Arg I incluant le n-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA) et la norvaline.

Les Arg sont très conservées entre les espèces. Chez les mammifères, il existe deux iso-enzymes, l'Arg I et l'Arg II, codées sur deux chromosomes distincts et qui présentent entre elles une homologie de 58%. Elles diffèrent au niveau de leur distribution tissulaire, de leur localisation subcellulaire et de leur régulation [Jenkinson *et al.* 1996].

L'Arg I (L-arginine ureahydrolase, EC 3.5.3.1) est l'isoforme la mieux caractérisée. C'est une protéine de 322 acides aminés chez l'homme dont le gène est situé sur le chromosome 6q23 [Sparkes *et al.* 1986]. Elle est exprimée dans le cytosol des cellules, essentiellement au niveau du foie mais également dans les cellules hématopoïétiques

[*Jenkinson et al. 1996*]. A la différence de l'Arg I murine, l'Arg I humaine n'est pas retrouvée dans les monocytes, macrophages et DC mais uniquement dans les polynucléaires neutrophiles [*Munder et al. 2005*]. La cristallisation de l'Arg I de rat montre une enzyme trimérique présentant, sur chaque sous-unité, deux noyaux de manganèse essentiels à son activité [*Kanyo et al. 1996*].

L'Arg II est une protéine de 354 acides aminés chez l'homme et présente un peptide signal putatif N-terminal pour une localisation dans la matrice mitochondriale. Son gène se situe sur le chromosome 14q24.1-24.3 [*Gotoh et al. 1997*]. Elle présente une large expression tissulaire, en particulier au niveau du rein, de la prostate, de l'intestin grêle et des glandes mammaires, mais n'est pas retrouvée au niveau du foie. [*Jenkinson et al. 1996*]. La cristallisation de l'Arg II humaine montre que ses sites actifs, notamment au niveau de la zone de liaison aux noyaux de manganèse, sont identiques à ceux de l'Arg I [*Colleluori et al. 2001*].

Certains types cellulaires, dont les macrophages murins et les cellules endothéliales aortiques du rat, expriment les deux isoformes. Des souris transgéniques surexprimant la protéine Arg I dans les enterocytes présentent de bas niveaux de L-arginine dans le sérum et une atrophie tymique [*de Jonge et al. 2002*]. Les souris inactivées pour le gène de l'Arg I décèdent entre le 10^{ème} et 14^{ème} jour post-natal en présentant les symptômes d'une hyperammonémie sévère. Ces souris présentent une augmentation significative de la concentration plasmatique de la L-arginine et une diminution des métabolites tels que la proline et l'ornithine ainsi qu'une augmentation compensatoire de l'Arg II. La forte concentration de L-arginine peut conduire à l'augmentation de la synthèse de NO et induire ainsi des dommages oxydatifs [*Iyer et al. 2002*]. Les souris inactivées pour le gène de l'Arg II ne présentent aucun phénotype particulier [*Shi et al. 2001*].

- Régulation de l'expression des arginases

L'Arg II est constitutivement exprimée [*Bronte et al. 2005*], en revanche l'Arg I fait l'objet d'une régulation complexe [*Jenkinson et al. 1996*]. Chez la souris, les régions bordant la séquence codante de l'Arg I contiennent des éléments qui contrôlent la transcription en réponse à l'IL-4, à l'IL-13, à l'AMP cyclique, au TGF- β , la dexaméthasone, et au LPS. Le principal facteur de transcription de l'Arg I murine est la molécule STAT6 située en aval de la transduction du signal par les récepteurs à l'IL-4 et à l'IL-13, tandis que, chez l'homme, l'expression de l'Arg I n'est pas modulée par ces cytokines Th2

[Munder et al. 2005]. Dans les cellules myéloïdes murines l'Arg I peut également être induite par l'IL-6, l'IL-10, le GM-CSF, les prostaglandines et les catécholamines.

Il existe de nombreux inhibiteurs de l'Arg, tels que le N-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA) qui est un intermédiaire dans la synthèse de NO et un puissant inhibiteur endogène des arginases [Boucher et al. 1994; Daghigh et al. 1994; Buga et al. 1996]. Cependant, sa toxicité intrinsèque limite son utilité. D'une façon générale, les inhibiteurs actuellement disponibles ont une faible efficacité et des effets secondaires importants car ils doivent être utilisés à très fortes doses. De nouveaux inhibiteurs de l'Arg I sont donc en cours de développement afin de palier à ces différents problèmes.

- Fonctions des arginases

L'Arg I n'est pas sécrétée, ainsi, son effet sur les concentrations de L-arginine extracellulaire dépend de l'expression à la membrane cellulaire d'un transporteur de l'arginine, notamment la protéine CAT2B [Mori et al. 2000]. Lorsque les macrophages murins sont activés par des cytokines Th2, la protéine CAT2B est surexprimée à la membrane selon une cinétique identique à celle de l'Arg I [Rodriguez et al. 2003].

Les macrophages réduisent rapidement la concentration extracellulaire de L-arginine ce qui entraîne une diminution de l'expression de la chaîne CD3 ζ du TCR des lymphocytes T activés. A l'inverse, l'expression de l'Arg II modifie très peu la concentration extracellulaire de L-arginine et ainsi n'induit pas de changement dans l'expression de la chaîne CD3 ζ du TCR [Rodriguez et al. 2003]. Des lymphocytes T de la lignée Jurkat cultivés en milieu dépourvu de L-arginine perdent l'expression de la chaîne CD3 ζ ce qui entraîne une diminution de la prolifération cellulaire [Rodriguez et al. 2002]. De même, les lymphocytes T activés cultivés en milieu carencé en L-arginine sont incapables de proliférer et de sécréter de l'IFN γ . Chez la souris, les lymphocytes T CD8⁺ sont plus sensibles à la carence en L-arginine que les lymphocytes T CD4⁺. De fortes doses de L-arginine sont en effet nécessaires à l'expression du CD3 et du CD8 et à l'utilisation optimale de l'IL-2 par les lymphocytes T CD8⁺, ainsi qu'au développement de la population mémoire T CD8⁺ [Ochoa et al. 2001]. Récemment, il a également été montré que l'Arg I produite par les granulocytes humains est capable d'inhiber la prolifération des cellules NK mais également leur sécrétion d'IFN γ induite par l'IL-12 et l'IL-18 [Oberlies et al. 2009] (**figure 16**).

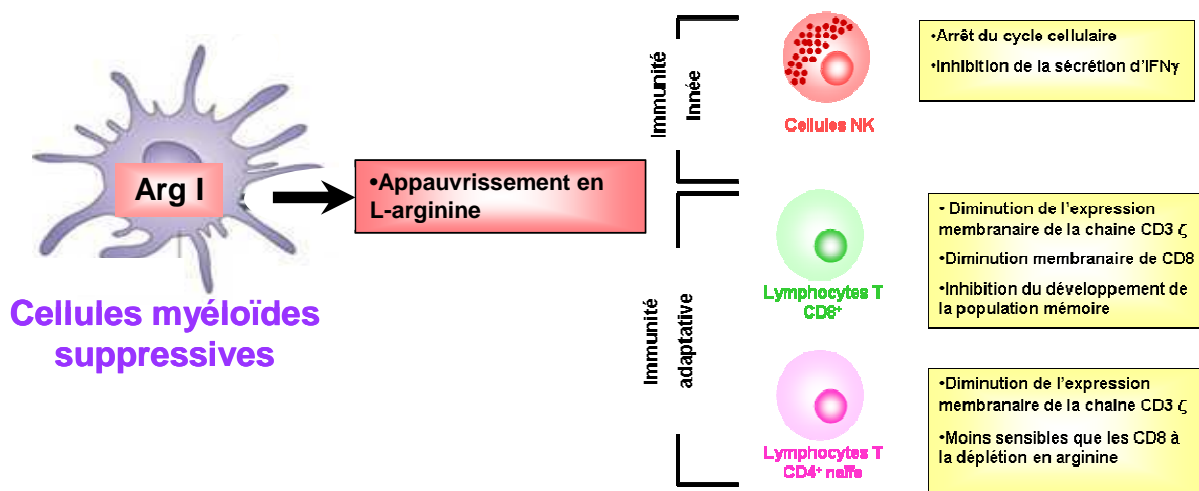


Figure 16 : Fonctions immunosuppressives de la protéine Arg I

La déplétion de l'acide aminé arginine par Arg I produite par les cellules myéloïdes modifie la réponse immunitaire innée et adaptative.

La perte d'expression de la chaîne CD3 ζ à la surface des lymphocytes T du sang périphérique a été décrite chez des patients présentant une activation de l'Arg I dans le cadre de cancers, d'infections massives, de transplantations hépatiques ou de traumatismes [Kießling et al. 1999; Rodriguez et al. 2002].

- Expression des arginases en situations pathologiques

Ces dernières années, les Arg ont été impliquées dans de nombreuses pathologies tels que les maladies vasculaires, les maladies infectieuses (ex VIH), les dysfonctions des cellules immunitaires ou le cancer.

Une forte activité Arg I a été retrouvée dans les cellules myéloïdes infiltrant la tumeur chez des patients atteints de différents types de cancer incluant les cancers de l'estomac, du colon, du sein et des poumons [Rodriguez et al. 2004]. Dans le cas de patients atteints de carcinome rénal, l'expression d'Arg I par une population de granulocytes CD15⁺ modifie l'expression de la chaîne du TCR CD3 ζ ainsi que la prolifération des lymphocytes T périphériques [Zea et al. 2005]. L'expression de l'Arg I dans des lignées de carcinome permet la production de polyamines essentielles au maintien de la prolifération des

cellules tumorales. L'inhibition de l'Arg I abolit la croissance de ces lignées et augmente l'apoptose de façon dépendante de la dose [Singh et al. 2000; Cederbaum et al. 2004]. L'Arg II est significativement augmentée dans plusieurs types de tumeur et dans des lignées tumorales de carcinome de la thyroïde [Polat et al. 2003; Porembaska et al. 2003; Mumenthaler et al. 2008; Rotondo et al. 2008; Tate et al. 2008; de Sousa et al. 2010]. Rotondo et collaborateurs ont montré que l'Arg II est exprimée par les cellules tumorales des patients présentant un cancer des poumons à petites cellules. Cependant, cette expression n'est associée ni à la survie, ni à la taille, ni au stade de la tumeur. En outre, lorsque ces cellules sont isolées et mises en culture en présence de lymphocytes T autologues, aucune inhibition de prolifération des lymphocytes T n'est observée indiquant que la protéine Arg II seule n'induit ni l'échappement tumoral au système immunitaire, ni la progression de la maladie [Rotondo et al. 2008]. L'expression de l'Arg I a été montrée dans d'autres pathologies. Par exemple, Cloke et collaborateurs, ont très récemment montré une corrélation significative entre une forte activité Arg, un faible taux de lymphocytes T CD4⁺ circulants et une forte charge virale chez des patients non-traités séropositifs pour le VIH [Cloke et al. 2010].

2. Les synthétases de l'oxyde nitrique (NOS)

- Structure et expression des NOS

La L-Arginine est également un substrat pour la famille des NOS (EC 1.14.13.39). Les NOS dégradent la L-arginine en NO et en L-citrulline. Les différentes isoformes de NOS requièrent la présence de calmoduline et des cofacteurs nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH₄), protoporphyrine X (hème), flavine-adenine dinucléotide (FAD) et flavine mononucléotide (FMN) pour être complètement actives [Alderton et al. 2001].

Quatre isoformes ont été décrites comme produits de quatre gènes différents : l'isoforme nNOS ou NOS1 prévalente dans les cellules nerveuses, l'isoforme NOS2 ou iNOS qui est inductible dans de nombreux types cellulaires incluant les cellules du système immunitaire, l'isoforme NOS3 ou eNOS retrouvée dans les cellules endothéliales, et l'isoforme mtNOS présente au niveau de la membrane interne de la mitochondrie et intervenant dans les fonctions respiratoires [Finocchietto et al. 2009]. Ces isoformes partagent environ 55% d'identité avec une très forte conservation de séquences dans les

régions impliquées dans leur activité catalytique [Michel et al. 1997]. Cependant, elles diffèrent dans leur localisation intracellulaire, leur régulation, leurs propriétés catalytiques et leur sensibilité aux différents inhibiteurs.

L'isoforme inductible, iNOS, a été largement explorée durant les dernières années pour son rôle immunosuppresseur dans le cancer et fera seule l'objet d'une description approfondie. Le gène qui code iNOS est localisé sur le chromosome 17 chez l'homme et sur le chromosome 11 chez la souris. iNOS est une protéine de 1153 acides aminés chez l'homme. Elle est exprimée dans de multiples tissus et types cellulaires humains et murins. L'expression d'iNOS et la production de NO ont été décrites chez la souris au niveau des macrophages, des neutrophiles, des éosinophiles, des cellules dendritiques et des cellules NK [Bogdan 2001].

- Régulation de l'expression d'iNOS

L'induction d'iNOS est contrôlée par l'IFN γ , ainsi que par d'autres stimuli pro-inflammatoires tels que le LPS et les cytokines IL-1, TNF α et IFN de type I, par l'intermédiaire des facteurs de transcriptions NF κ B, « activator protein 1 » (AP1), « IFN-regulatory factor 1 » (IRF-1) et STAT1 [Bronte et al. 2005]. Certains de ces composants, par exemple l'IFN γ et le LPS, peuvent agir en synergie pour induire l'expression d'iNOS [Lorsbach et al. 1993]. L'activité de l'enzyme iNOS peut être maintenue durant de longue période de temps allant jusqu'à plusieurs jours *in vivo* dans les hépatocytes de rat durant une inflammation chronique [Billiar et al. 1990] produisant des quantités 1000 fois supérieures de NO que les autres NOS [Bogdan 2011].

De nombreux inhibiteurs des NOS ont été décrits, dont le NG-monométhyl-L-arginine (L-NMMA), la pro-drogue NG-nitro-L-arginine-méthyl-ester (L-NAME) et l'aminoguanidine, qui sont les plus utilisés dans les modèles animaux. Ces inhibiteurs diffèrent dans leur spécificité d'isoforme et dans leur mécanisme d'inhibition. Le L-NAME est un puissant inhibiteur de l'activité de toutes les isoformes de NOS. En revanche, le L-NMMA et l'aminoguanidine seraient plus spécifiques de l'iNOS [Gross et al. 1990; Corbett et al. 1992].

- Fonction de la protéine iNOS

De façon similaire à l'Arg, l'action d'iNOS dépend de la concentration intracellulaire de l'arginine et donc de l'expression à la membrane du transporteur de l'arginine CAT2B. La dimérisation d'iNOS, fondamentale pour l'activité enzymatique, dépend également de la présence intracellulaire d'arginine [Baek et al. 1993]. Deux grandes fonctions associées au système immunitaire ont été décrites pour le NO : il représente une puissante molécule de signalisation de la réponse immune mais aussi une molécule immunosuppressive lorsqu'il est produit par l'iNOS des cellules myéloïdes [Ibiza et al. 2006]. Ainsi, selon sa concentration et la source de sa production, le NO peut favoriser ou au contraire bloquer la prolifération T.

Le rôle immunomodulateur du NO produit par iNOS a été montré *in vitro* et *in vivo* en utilisant le L-NMMA ou des souris invalidées pour le gène NOS2. Les MDSC des souris NOS2^{-/-} présentent une activité stimulante des lymphocytes T supérieure à celle de leurs homologues normales [Mazzoni et al. 2002]. Contrairement à l'effet de l'Arg I, l'effet inhibiteur d'iNOS sur les lymphocytes T n'est pas associé à des événements précoces en aval du TCR, mais plutôt à une diminution du signal déclenché par la liaison de l'IL-2 à son récepteur (diminution de la phosphorylation de JAK1 et JAK3, STAT5, ERK et AKT) [Bingisser et al. 1998; Mazzoni et al. 2002]. Des études réalisées sur des cellules T humaines ont montré que le NO affecte également la stabilité des ARNm codant pour l'IL-2 et la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes activés. [Macphail et al. 2003]. Par ailleurs, un effet pro-apoptotique direct a été observé dans des cellules T exposées à de fortes doses de NO. Le NO est enfin connu pour réguler négativement les protéines de signalisation intracellulaire, directement par S-nitrosylation de résidus cystéine cruciaux ou indirectement par activation de la guanylate cyclase soluble et des protéines kinases dépendantes du GMP cyclique [Wu et al. 1998; Lim et al. 2008]. Le NO peut ainsi inactiver des caspases par S-nitrosylation de leurs résidus cystéines [Rossig et al. 1999; Torok et al. 2002] (Figure 17).

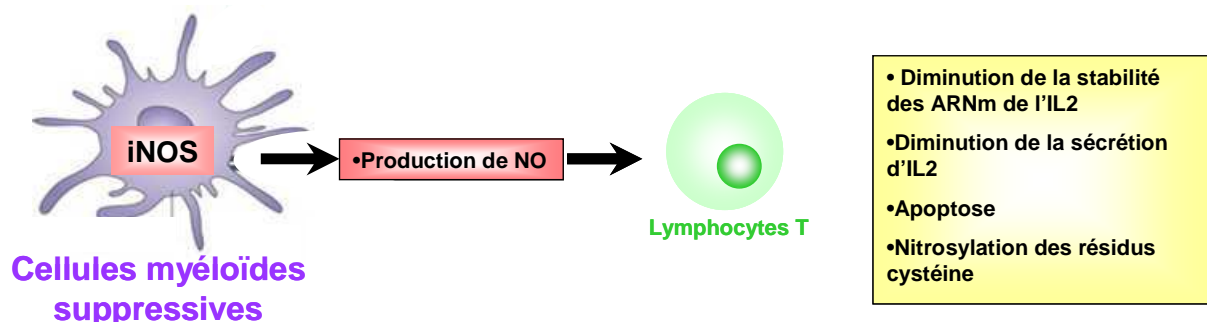


Figure 17 : Fonctions immunosuppressives de la protéine iNOS

La dégradation de la L-Arginine par la protéine iNOS produit un dérivé toxique le NO. Le NO est capable de moduler l'activation des lymphocytes T.

- Expression d'iNOS en situation pathologique

L'expression d'iNOS et la production de NO ont été détectées dans plusieurs tumeurs humaines, au niveau des cellules tumorales ou des cellules d'origine myéloïde [Fukumura et al. 2006; Lahdenranta et al. 2009]. Les niveaux d'expression et d'activité iNOS sont augmentées dans les tumeurs, par exemple dans les carcinomes prostatiques en comparaison aux hyperplasies prostatiques bénignes [Klotz et al. 1998]. Le taux d'iNOS et son activité sont corrélés avec le degré de malignité de la tumeur et sa capacité métastatique, dans les tumeurs humaines et murines [Cobbs et al. 1995; Thomsen et al. 1995; Edwards et al. 1996; Duenas-Gonzalez et al. 1997; Ibiza et al. 2006; Johansson et al. 2009; Johansson et al. 2009].

L'action du NO dans les tumeurs pourrait s'exercer à des niveaux différents. L'exposition de cellules tumorales à de fortes doses de NO induit l'augmentation de la grande sous-unité catalytique des protéines kinases dépendant de l'ADN (DNA-PKcs) requises pour réparer les cassures de l'ADN double brin. Ainsi, l'augmentation des DNA-PKcs pourrait protéger les cellules tumorales, non seulement des effets toxiques du NO, mais également des dommages de l'ADN induits par les chimiothérapies [Xu et al. 2000]. Le NO pourrait aussi favoriser la néoangiogénèse, notamment en induisant la surexpression du VEGF [Bogdan 2001; Mocellin et al. 2007]. Enfin, le NO pourrait contribuer au développement tumoral en inhibant les lymphocytes T antitumoraux. Par exemple, chez des souris présentant un carcinome mammaire, la libération continue de NO par les MDSC a été associée à la perte d'expression des facteurs de transcription STAT5a/b dans les cellules B et T, pouvant expliquer ainsi un défaut des réponses anti-tumorales cellulaire et humorale dans ce modèle [Pericle et al. 1997]

3. Coopération de l'Arg I et de iNOS dans l'immunosuppression

Les activités enzymatiques de l'Arg I et de l'iNOS peuvent s'inhiber réciproquement. En effet, iNOS génère des taux significatifs d'hydroxy L-arginine, un composé intermédiaire dans la génération de NO, qui constitue le plus puissant des inhibiteurs naturels de l'activité de l'Arg I [Colleluori et al. 2001]. A l'inverse, les polyamines générées par l'Arg I peuvent inhiber la production de NO. Enfin, comme précédemment souligné, la

carence en arginine due à l'activité Arg I gène la formation d'un dimère d'iNOS actif [Baek et al. 1993; Sonoki et al. 1997; Mossner et al. 2001].

D'autre part, l'expression des enzymes Arg I et iNOS est théoriquement exclusive, car elle est induite respectivement par les cytokines de type Th2, et de type Th1 [Munder et al. 1998; Mills et al. 2000]. Il a été montré chez la souris que les voies de signalisation permettant la production d'iNOS et de l'Arg I sont activées respectivement dans des macrophages de type M1 et M2 [Mantovani et al. 2002]. Cependant, des études ont montré que les deux enzymes peuvent être induites simultanément dans les macrophages de souris et de rat après traitement par le LPS [Sonoki et al. 1997; Salimuddin et al. 1999]. En outre, des MDSC issues de souris ayant une tumeur et stimulées *in vivo* à la fois par IFN γ et IL-13, peuvent co-exprimer iNOS et Arg I. La coopération des activités de ces deux enzymes exprimées dans la même cellule permet la production de réactifs fortement immunomodulateurs, les peroxy-nitrites, nécessaires au blocage des réponses lymphocytaires T chez ces souris. [Bronte et al. 2003; Gallina et al. 2006; Peranzoni et al. 2007]. En effet, dans un milieu appauvri en arginine par l'Arg I, le domaine réductase d'iNOS produit le superoxyde (O_2^-) qui forme les peroxy-nitrites ($ONOO^-$) avec le NO [Xia et al. 1997; Xia et al. 1998].

Les peroxy-nitrites sont des composés hautement réactifs capables de nitrater les résidus tyrosine des protéines [Alvarez et al. 2003]. La nitration des tyrosines des protéines impliquées dans la signalisation des lymphocytes T empêche leur phosphorylation et bloque le cycle cellulaire [Brito et al. 1999]. De faibles concentrations de peroxy-nitrites peuvent également induire l'apoptose en effectuant la nitration des canaux dépendant du voltage [Brito et al. 1999; Aulak et al. 2001]. De fortes concentrations de peroxy-nitrites inactivent la cascade dépendante des caspases et induisent la nécrose par nitration des résidus tyrosine du cytochrome C [Nakagawa et al. 2007]. Les peroxy-nitrites produits par les MDSC coexprimant iNOS et Arg I provoquent la nitration du TCR et de la molécule CD8 [Nagaraj et al. 2007]. Cette nitration est dépendante de l'antigène et nécessite une interaction directe entre les cellules T et les MDSC [Nagaraj et al. 2010]. Les peroxy-nitrites produits par les MDSC induisent également une nitration de la chimiokine CCL2 qui altère sa reconnaissance par les lymphocytes T. La diminution consécutive des lymphocytes T intratumoraux se fait au profit du recrutement des MDSC (Bronte V, présentation orale 4^{ème} journée scientifique Myltenyi Biotec, *From inflammation to immunomodulation in cancer*, juin 2010) (**figure 18**).



D'après Löb et al. *Nature Reviews Cancer*.2009

Figure 18 : Co-opération de l'Arg I et de l'iNOS dans l'immunosuppression

Lorsque l'Arg I et l'iNOS sont produites par la même cellule, il y a production d'ions superoxydes ensemble avec du NO avec la formation de peroxy-nitrites. Ces différents métabolites inhibent les lymphocytes T en induisant un arrêt du cycle, une mort cellulaire, un défaut de signalisation du TCR et empêchent le recrutement via la chimiokine CCL2.

Dans les adénocarcinomes prostatiques humains, de forts taux de nitrotyrosine sont retrouvés dans les lymphocytes T infiltrant la tumeur. Ces taux sont corrélés avec une production locale de peroxy-nitrites et des fonctions cellulaires T défectueuses. La culture *in vitro* de prélèvements tumoraux en présence d'inhibiteurs des enzymes Arg I et iNOS réduit le nombre de nitrotyrosines intratumorales et augmente la réactivité des cellules T à la tumeur [Bronte et al. 2005].

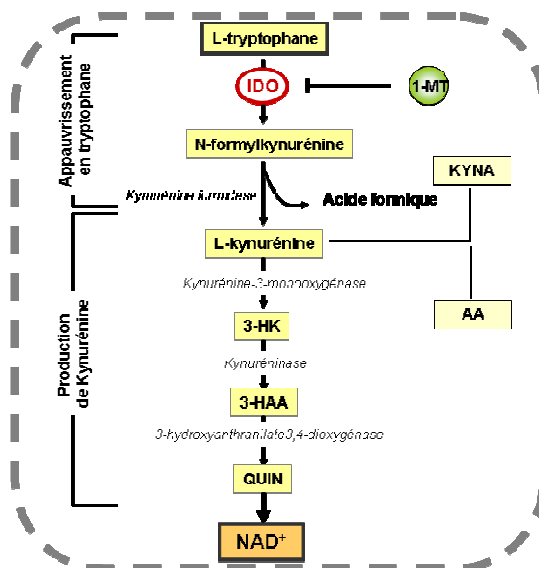
B. Métabolisme du tryptophane : l'Indoléamine 2,3-Dioxygénase (IDO)

Le tryptophane est le moins abondant de tous les acides aminés essentiels. Chez les mammifères trois gènes codent pour trois enzymes catalysant la dégradation oxydative du tryptophane : la tryptophane 2,3 dioxygénase (TDO) hépatique, l'indoléamine 2,3 dioxygénase 1 (IDO 1) et l'IDO 2. La voie catalytique majeure du L-tryptophane est la voie de la kynurénine qui conduit à la biosynthèse de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). L'étape initiale et limitante de la voie de la kynurénine est l'oxydation du tryptophane en N-formyl-L-kynurenine. Cette étape peut être catalysée par la TDO hépatique (EC 1.13.11.11) ou par l'enzyme ubiquitaire extra-hépatique IDO 1 (EC 1.13.11.17). Récemment, une troisième enzyme, IDO 2, impliquée dans le métabolisme du tryptophane a été décrite. Bien que les deux enzymes IDO 1 et 2 présentent des activités similaires, leur profil d'expression est différent. De plus, à l'inverse d'IDO 1, la protéine IDO 2 ne semble pas inductible par l'IFN γ . En effet, son niveau d'expression est maintenu dans les souris IFN γ /-. L'ensemble des résultats disponibles actuellement sur la protéine IDO 2

suggère un faible rôle de cette protéine dans le métabolisme du tryptophane. Cependant, ses fonctions *in vivo* restent spéculatives [Ball et al. 2007].

1. Structure de la protéine IDO.

IDO 1 communément appelée IDO est codée par le gène *Ido1* (ou *indo* chez la souris). Ce gène de 10 exons s'étend sur 15 Kb dans une région synténique du chromosome 8 chez l'homme et la souris (respectivement au locus 8p12-p11 et 8 A2) [Mellor et al. 2004]. La protéine IDO mature est monomérique et contient un groupe prosthétique de l'hème. Son poids moléculaire est d'environ 45 kDa pour 403 acides aminés chez l'homme. Les séquences primaires des protéines humaine et murine présentent 57% d'homologie. La protéine humaine a été cristallographiée aux rayons X en 2006 [Sugimoto et al. 2006]. Elle présente un petit et un grand domaine en hélice alpha, entre lesquels se positionne le groupe prosthétique de l'hème. L'hème est liée au site actif de l'IDO par le noyau imidazole de l'histidine 346. [Littlejohn et al. 2003]. L'holoenzyme IDO catalyse le clivage oxydatif de l'anneau pyrrole du L-tryptophane afin de générer la N-formyl-kynurénine qui sera ensuite métabolisée en acide formique puis en un produit stable : la kynurénine (**figure 19**).



D'après Grohmann & Bronte. Immunological Review.2010

Figure 19: Représentation schématique du catabolisme du tryptophane dans la voie des kynurénines

L'IDO induit l'appauvrissement en tryptophane du milieu et la production de kynurénine.

3-HK, 3-hydroxykynurénine; KYNA, acide kynurénique; AA, acide anthranilique; 3HAA, acide 3-hydroxyanthranilique; QUIN, acide quinolinique. Le 1-méthyltryptophane (1-MT) est un inhibiteur d'IDO.

IDO présente une forte affinité pour le L-tryptophane et le métabolise très rapidement. L'enzyme est synthétisée sous forme inactive avec un hème contenant du fer ferrique. L'oxydation du fer ferrique en fer ferreux par les anions superoxydes facilite la

liaison du L-tryptophane et de l'O₂ au site actif [Thomas et al. 1999]. Les inhibiteurs de la biosynthèse de l'hème inhibent l'activité enzymatique d'IDO sans modifier son niveau d'expression. De même, les antioxydants et le potentiel redox cellulaire sont capables de moduler son activité enzymatique [Thomas et al. 2001] (figure 20).

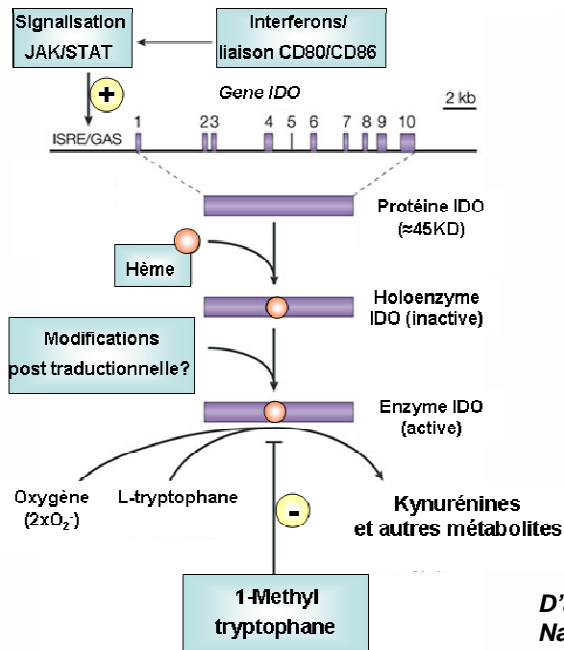


Figure 20: Représentation schématique du gène *ido* et la protéine IDO.

Les interférons et les molécules CD80 et CD86 peuvent induire la transcription du gène *ido*. La protéine est produite sous forme inactive, se complexe à l'hème et s'active après oxydation du fer contenu dans ce cofacteur. Des modifications post-traductionnelles sont nécessaires à l'activation d'IDO mais n'ont pas encore été identifiées.

D'après Mellor et Munn. Nature Reviews Imm.2004

2. Régulation de l'expression d'IDO.

IDO est une protéine strictement intracellulaire. De façon physiologique, IDO est fortement exprimée au niveau du placenta à l'interface materno-fœtale sous l'influence de la gonadotropine chorionique humaine (HCG) et des oestrogènes [Ueno et al. 2007; Zhu et al. 2007]. En dehors du placenta, l'expression d'une protéine IDO fonctionnelle a été rapportée chez la souris dans l'épididyme, au niveau de l'iléon distal et du colon, dans les poumons, dans les ganglions, la rate et le thymus [Fallarino et al. 2002].

L'activité d'IDO dans ces différents tissus est fortement augmentée après un traitement *in vivo* au LPS [Mellor et al. 2004]. Divers types cellulaires expriment IDO après une exposition à l'IFN γ , par exemple, certaines cellules myéloïdes telles que les macrophages dérivés de monocytes, les DC (plus particulièrement les cellules dendritiques plasmacytoïdes), les éosinophiles mais également les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales [Taylor et al. 1991; Munn et al. 1999; Hwu et al. 2000].

Chez l'homme et la souris, la séquence du promoteur de l'IDO contient de multiples motifs qui lui confèrent une capacité à répondre aux facteurs de transcriptions activés par l'IFN γ et de façon moins importante par les IFN de type I [Dai et al. 1990; Hassanain et al. 1993]. Les ligands du TLR9 comme les oligodeoxynucleotides microbiens riches en CpG et le peptide synthétique thymosine α peuvent induire IDO. Le LPS, l'IL-1 et le TNF α peuvent fortement induire IDO en synergie avec l'IFN γ *in vitro*. Cette synergie dépend de NF κ B [Babcock et al. 2000; Fujigaki et al. 2001; Robinson et al. 2003; Robinson et al. 2006].

La protéine de fusion CTLA4-Ig peut également induire l'expression de l'IDO à travers sa liaison aux molécules de surface CD80/CD86. Le rôle important de CD80/CD86 dans l'induction de l'IDO a été confirmé chez l'homme et la souris [Grohmann et al. 2002; Fallarino et al. 2003; Munn et al. 2004].

L'induction de l'IDO par les IFN implique le site activé par l'IFN γ (GAS) et deux éléments de réponse stimulés par l'IFN (ISRE) répondant respectivement à STAT1 et au facteur régulateur 1 de l'IFN (IRF1). Ces deux éléments coopèrent pour permettre l'induction de l'IDO par l'IFN γ [Chon et al. 1996]. Un nouveau mode d'induction de l'IDO impliquant la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt et la voie non-canonique de NF κ B a été récemment décrite dans les DC en réponse au TGF β [Belladonna et al. 2008].

L'expression de la protéine IDO n'est pas toujours corrélée avec son activité. Bien que les DC CD8 α^+ et CD8 α^- de la rate de souris expriment des quantités équivalentes d'IDO, seules les premières peuvent cataboliser le tryptophane après une exposition à l'IFN γ [Fallarino et al. 2002; Munn et al. 2004]. De façon similaire chez l'homme, certaines DC activées par l'IFN γ ou à travers la liaison de leurs molécules CD80/CD86 expriment une protéine IDO incapable de métaboliser le tryptophane [Munn et al. 2004]. La régulation post-transcriptionnelle responsable de cet effet n'a pas encore été identifiée.

Les ARNm des protéines IDO1 et IDO2 sont exprimés dans les carcinomes gastriques, rénaux et du colon. Dans les lignées tumorales dérivés de ces tumeurs, la stimulation par l'IFN γ induit l'expression des protéines IDO 1 et 2. Cependant, l'activité IDO mesurée ne dépend que de la protéine IDO1 [Lob et al. 2009].

2. Fonctions de la protéine IDO.

Historiquement, les premières études publiées sur la protéine IDO ont montré son implication dans les mécanismes de défenses de l'hôte contre les pathogènes. L'augmentation de l'expression de l'IDO *in vivo* en réponse à divers agents infectieux suggérait qu'elle participe aux mécanismes de défenses anti-infectieux. En effet, même si la plupart des pathogènes sont capables de synthétiser leur propre tryptophane, certains dépendent d'un apport exogène (organismes auxotrophes pour le tryptophane) et sont sensibles à la carence induite par l'activité de l'IDO. Parmi ces organismes, on retrouve *Toxoplasma gondii* et des bactéries telles que *Chlamydia pneumoniae*, les streptocoques du groupe B et les mycobactéries [Pfefferkorn *et al.* 1986; Gupta *et al.* 1994; MacKenzie *et al.* 1998; Hayashi *et al.* 2001]. *In vitro*, IDO inhibe la réplication de ces pathogènes mais également du cytomégalovirus ou encore du virus herpès simplex [Bodaghi *et al.* 1999; Adams *et al.* 2004].

Une très forte association existe entre IDO et l'inflammation. Plusieurs études ont montré que l'IDO est retrouvée essentiellement au niveau des sites de l'inflammation où elle jouerait un rôle anti-inflammatoire en empêchant notamment les dommages tissulaires. Par exemple, la dégradation du tryptophane par IDO inhibe l'expression des métalloprotéases par les fibroblastes synoviaux, empêchant ainsi les dommages articulaires [Varga *et al.* 1996].

La protéine IDO est aussi capable d'agir de multiples façons dans la régulation de la réponse immunitaire. Munn et collaborateurs ont démontré qu'IDO participe *in vivo*, au maintien de la tolérance maternelle vis-à-vis du fœtus. L'administration de 1-méthyl tryptophane (1-MT, le principal inhibiteur de l'activité enzymatique IDO) à des souris gestantes conduit à un rejet complet des fœtus allogéniques. A l'inverse, les fœtus syngéniques ne sont pas rejetés et se développent normalement lors d'un traitement au 1-MT [Munn *et al.* 1998]. Cette tolérance est due à une inhibition rapide de la prolifération des cellules T maternelles *via* la carence en tryptophane induite par IDO [Munn *et al.* 1998; Mellor *et al.* 2001]. De façon intéressante, chez la femme, les concentrations sériques de tryptophane déclinent progressivement du 1^{er} au 3^{ème} trimestre de la grossesse, coïncidant avec le développement et la croissance du placenta [Zamanakou *et al.* 2007]. L'expression d'IDO dans des sites de privilège immunitaire, comme le placenta, suggère un rôle d'IDO dans la tolérance immunitaire.

De nombreuses études se sont focalisées sur la capacité de l'IDO à réguler la réponse cellulaire T. Une première étude publiée en 1999 par l'équipe de DH Munn a montré que l'IDO produite par les macrophages est capable de bloquer la prolifération *in*

in vitro des lymphocytes T *via* le catabolisme du tryptophane. Les lymphocytes T purifiés cultivés en condition de carence de tryptophane restent bloqués au milieu de la phase G1. Cette inhibition est levée seulement si une deuxième stimulation du TCR est effectuée en présence de tryptophane dans le milieu de culture [Munn *et al.* 1999]. Une inhibition des lymphocytes T par un mécanisme similaire est observé lorsque les DC expriment IDO suite à l'interaction de CD80 et CD86 avec CTLA-4 à la surface du lymphocyte T [Hwu *et al.* 2000; Munn *et al.* 2004].

En consommant le tryptophane, l'IDO produit également des métabolites toxiques qui diminuent la prolifération des lymphocytes T [Weber *et al.* 2006] et la cytotoxicité des NK [Frumento *et al.* 2002; Della Chiesa *et al.* 2006]. Après une stimulation antigénique, ces métabolites, notamment l'acide 3-hydroxyanthranilique, le kynurenate et le quinolinate, augmentent fortement dans le sang et sont responsable d'une diminution des réponses immunitaires qui a été observée dans plusieurs modèles. Par exemple, des rats traités avec un mélange de métabolites du tryptophane ont une survie prolongée après greffe de peau [Bauer *et al.* 2005] et l'acide N-[3'-4'-dimethoxycinnamoyl]-anthranilique, un dérivé synthétique d'un métabolite du tryptophane diminue l'inflammation et la paralysie de souris ayant une EAE [Platten *et al.* 2005; Yan *et al.*]. Les mécanismes moléculaires par lesquels ces composés exercent leurs effets immunosuppresseurs sont encore inconnus. Cependant, un article publié en 2006 suggère l'existence d'un récepteur à un métabolite du tryptophane (l'acide kynurénique). La fonction biologique de ce récepteur orphelin couplé à une protéine G, GPR35, est encore inconnue mais il permettrait la production intracellulaire d'inositol phosphate. Son expression est plus forte dans l'intestin et les cellules du système immunitaire où IDO est fortement exprimée, en particulier les monocytes, les DC, les neutrophiles et les lymphocytes T [Wang *et al.* 2006].

Plus récemment, il a été montré qu'IDO peut exercer son effet immunosuppresseur par le biais de l'expansion et de l'activation des lymphocytes Treg. Fallarino et collaborateurs ont montré que les effets combinés de l'appauvrissement en tryptophane et de l'enrichissement en métabolites toxiques de l'IDO convertit des lymphocytes T CD4⁺ naïfs conventionnels en Treg qui inhibent la prolifération de lymphocytes T effecteurs *via* CTLA-4 et l'IL-10. Ce processus dépend de l'activation de la voie intégrée de réponse au stress passant par la kinase « General Control Nonrepressed 2 » (GCN2) [Fallarino *et al.* 2006]. IDO peut également activer directement des lymphocytes Treg matures *via* une boucle d'auto-amplification. Sharma et collaborateurs proposent que l'interaction restreinte par le CMH de lymphocytes Treg avec des DC plasmacytoïdes exprimant IDO déclenche

leur activation par l'intermédiaire de la voie de la kinase GCN2. Les lymphocytes Treg ainsi activés amplifient l'expression d'IDO par les DC plasmacytoïdes *via* l'interaction CTLA-4-CD80/CD86. De plus, ces Treg augmentent l'expression des ligands de PD1 à la surface des DC myéloïdes, ce qui rend ces cellules tolérogènes [Sharma *et al.* 2007] (figure 21).

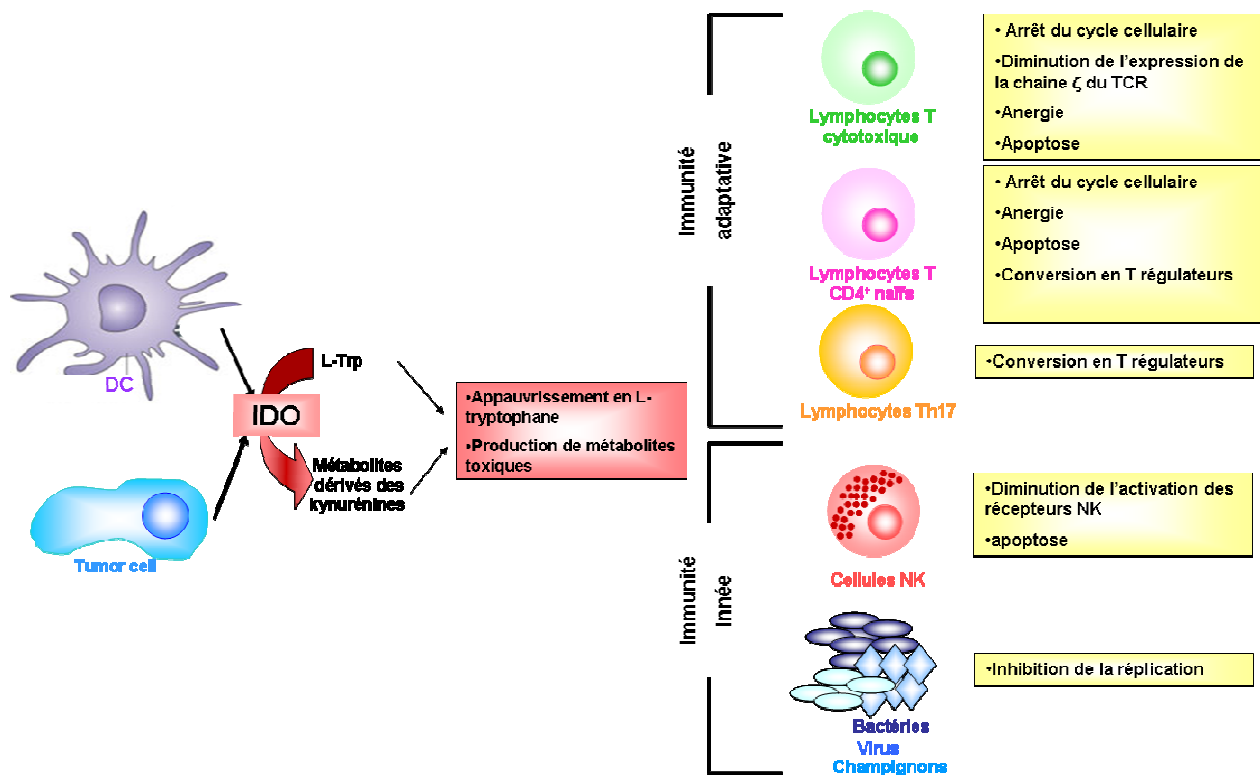


Figure 21: Fonctions de la protéine Indoléamine-2,3-dioxygénase

IDO déplete le milieu en tryptophane produisant des dérivés métaboliques toxiques tels que la kynurénine. Via ces deux mécanismes, IDO d'intervient lors de la réponse immunitaire innée et adaptative en inhibant les différentes cellules immunitaires. A contrario, IDO est capable d'aider le système immunitaire à se débarrasser des champignons, bactéries et virus. Elle inhibe leur prolifération en les privant de tryptophane.

Dans le modèle murin d'EAE, les souris inactivées pour le gène *Indo* développent une maladie exacerbée accompagnée de très fortes réponses Th1, Th17 et d'une réponse Treg réduite. L'administration du métabolite du tryptophane 3-HAA augmente le pourcentage de lymphocyte Treg, inhibe les réponses Th1 et Th17 et améliore l'EAE. Le 3-HAA induit également la production de TGFβ par les DC. Ainsi, la diminution de la production d'IL-6 par les pDC et l'augmentation de la production de TGFβ par les DC reprogramment la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻ vers un phénotype régulateur plutôt que Th17 [Yan *et al.* 2010]. Le blocage d'IDO par son inhibiteur 1-MT restaure la production d'IL-6, facilitant la différenciation des lymphocytes en Th17 [Baban *et al.* 2009].

3. Rôle d'IDO dans le cancer.

L'expression d'IDO a été détectée dans les cellules tumorales mais également les DC infiltrant la tumeur, le stroma péri-tumoral et les ganglions drainants [Friberg *et al.* 2002; Astigiano *et al.* 2005]. IDO est exprimée à des niveaux variables dans de nombreux types de cancer [Uyttenhove *et al.* 2003] (tableau 1).

Tumor type	IDO-positive tumor samples ^a (no. positive per no. tested)	Proportion of IDO-positive tumor cells ^b		
		>50%	10-50%	<10%
Prostatic carcinomas	11/11	7	3	1
Colorectal carcinomas	10/10	5	3	2
Pancreatic carcinomas	10/10	8	2	0
Cervical carcinomas	10/10	0	4	6
Endometrial carcinomas	5/5	0	3	2
Gastric carcinomas	9/10	4	3	2
Glioblastomas	9/10	6	3	0
Non-small-cell lung carcinomas	9/11	1	1	7
Bladder carcinomas	8/10	3	1	4
Ovarian carcinomas	8/10	0	3	5
Head and neck carcinomas	7/11	0	3	4
Esophageal carcinomas	7/10	1	2	4
Mesotheliomas	6/10	2	1	3
Renal cell carcinomas	5/10	0	1	4
Melanomas	11/25	0	0	11
Breast carcinomas	3/10	2	0	1
Thyroid carcinomas	2/10	0	0	2
Lymphomas	4/18	0	0	4
Small-cell lung carcinomas	2/10	0	0	2
Sarcomas	2/10	0	1	1
Hepatocarcinomas	2/5	0	0	2
Adrenal carcinomas	2/5	1	0	1
Choriocarcinomas	1/5	0	0	1
Cutaneous basocellular carcinomas	1/5	0	0	1
Testicular seminomas	0/10	0	0	0

^aExpression of IDO protein was detected by immunohistochemistry using purified IDO-specific rabbit antibodies. Specificity of staining was controlled by blocking with a synthetic peptide corresponding to the C terminus of IDO (Fig. 2). ^bNumber of tumor samples with the indicated proportion of IDO-positive tumor cells is given in each column. The proportion of positive tumor cells was estimated visually.

Uyttenhove et al. Nature Medecine.2003

Tableau 1 : Expression de la protéine IDO dans différents cancers humains

Une étude menée par Uyttenhove et collaborateurs [Uyttenhove *et al.* 2003] a montré l'expression d'une protéine IDO active dans 100% des carcinomes colorectaux, pancréatiques et cervicaux et dans 60% des cas de mésothéliomes étudiés. De plus, il a été observé chez des patients atteints de cancer du poumon, mais également du colon, de l'ovaire et du sein que l'expression de l'IDO dans les tissus cancéreux est toujours plus forte que dans le tissu adjacent non affecté [Travers *et al.* 2004; Okamoto *et al.* 2005; Brandacher *et al.* 2006; Karanikas *et al.* 2007]. L'expression d'IDO par les cellules tumorales dans ces différents types de cancers est corrélée avec un mauvais pronostic clinique [Okamoto *et al.* 2005; Brandacher *et al.* 2006; Yoshida *et al.* 2008; Inaba *et al.*]. Chez des patients atteints de cancer du poumon non à petite cellules présentant une forte

accélération de la progression de la maladie, il existe un important infiltrat inflammatoire avec un nombre élevé de polynucléaires éosinophiles exprimant IDO, suggérant que ces cellules pourraient constituer un marqueur pronostic dans ce type de pathologie [Astigiano et al. 2005]. En accord avec ces observations cliniques, l'expression d'IDO par dans un modèle murin de cancer prévient le rejet des cellules tumorales par la réponse immunitaire spécifique préalablement induite par une vaccination. Cet effet est accompagné d'une diminution du recrutement des lymphocytes T antitumoraux au site de la tumeur et est partiellement inhibé par un traitement systémique au 1-MT [Uyttenhove et al. 2003]. Plus récemment le rôle des Treg a été évoqué dans le rôle protumoral d'IDO. Chez l'homme, l'examen de 25 cas de mélanomes métastatiques a révélé une forte corrélation entre une diminution de la survie, un niveau élevé d'expression d'IDO et le nombre de Treg [Brody et al. 2009]. De telles corrélations ont également été retrouvées dans les adénocarcinomes pancréatiques [Witkiewicz et al. 2008], les carcinomes de l'utérus [Nakamura et al. 2007] et les leucémies myéloïdes [Chen et al. 2008]. La coculture de lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻ avec des cellules leucémiques les convertit en lymphocytes Treg. Chez la souris, l'injection de cellules de lymphome A20 induit une expansion des cellules Treg par conversion des cellules T CD4⁺ CD25⁻ [Curti et al. 2007]. Dans les deux cas, cette conversion est abolie par le 1-MT et dépend donc de l'activité d'IDO [Curti et al. 2007; Chen et al. 2008]. Dans des modèles animaux de croissance tumorale, l'utilisation d'inhibiteurs d'IDO afin d'augmenter l'efficacité de vaccins anti-tumoraux corrèle avec la perte de l'activité suppressive des lymphocytes Treg et la conversion dépendante de l'IL-6 de ces lymphocytes en Th17 dans les ganglions drainant la tumeur [Sharma et al. 2009]. Actuellement plusieurs essais cliniques de phase I utilisant le 1-MT en association avec des traitements conventionnels sont en cours aux Etats-Unis, voir www.clinicaltrials.gov.

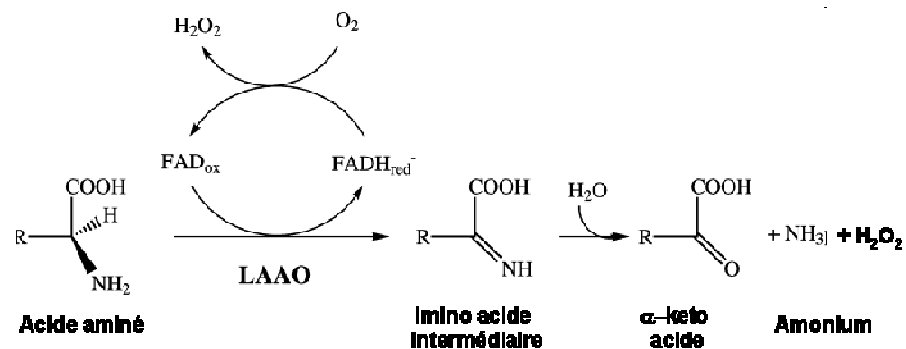
B. Métabolisme de la phénylalanine : Interleukine 4-induced gene 1

Nous avons décrit au laboratoire l'IL4I1 (anciennement Fig1) qui appartient à la famille des oxydases des L-acides aminés (L-amino acide oxydases, LAAO).

1. Les oxydases des L-acides aminés.

Les LAAO (EC1.4.3.2) ont été classées dans la famille des réductases liées au cofacteur Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) en raison de la présence de deux motifs extrêmement conservés permettant la liaison à des dinucléotides.

Elles ont été décrites pour la première fois en 1944 par Zeller et Maritz [Zeller *et al.* 1944]. Les LAAO catalysent la déamination oxydative stéréospécifique d'un acide aminé L en présence d'oxygène pour produire l' α -keto acide correspondant, de l'ammoniac et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) *via* un intermédiaire imino acide (**figure 22**).



D'après Pawelek et al. EMBO. 2000

Figure 22: Représentation schématique du mécanisme d'action des L-amino acid oxydase (LAAO)

Les LAAO dégradent des acides aminés en un intermédiaire imino acide qui sera ensuite métabolisé en l' α -keto acide correspondant et ammonium libérant de l' H_2O_2 .

Ces enzymes présentent une préférence marquée pour les acides aminés aromatiques et hydrophobes incluant la phénylalanine, le tryptophane, la tyrosine et la leucine. Ces protéines sont des flavoprotéines homodimériques glycosylées. Chaque sous-unité présente trois domaines: (i) un domaine de liaison au cofacteur, (ii) un domaine de liaison au substrat et (iii) un domaine hélicoïdal. Elles possèdent une masse moléculaire allant de 50 à 70 kDa en conditions dénaturantes [Du *et al.* 2002] et de 110 à 150 kDa à l'état dimérique natif. De plus, les LAAO contiennent jusqu'à 3.7 kDa de sucres par protomère [Geyer *et al.* 2001].

Les LAAO sont retrouvées largement distribuées depuis les bactéries, les champignons, les algues jusqu'aux mammifères. On les retrouve en particulier dans les venins d'insectes et de serpent dont elles représentent parfois le composant majeur du venin (jusqu'à 30% des protéines totales dans le venin de la vipère *C.Rhodostoma*. [Ponnudurai *et al.* 1994]).

Les LAAO de sources diverses présentent de nombreuses différences au niveau de leur séquence, spécificité de substrat, stabilité, glycosylation, régulation et activités biologiques. Alors que les LAAO de bactéries, de champignons, et de plantes apparaissent impliquées dans la production d'azote *via* l'ammoniac, leur rôle physiologique dans le venin de serpent est encore mal connu. Les effets plaquettaires rapportés des différentes LAAO sont encore très controversés. Les LAAO de l'*Echis Colorata* et du *Naja naja kaouthi* inhibent l'agrégation plaquettaire humaine induite respectivement par l'ADP ou le stress mécanique [Nathan et al. 1982; Sakurai et al. 2001]. A contrario, les LAAO d'autres serpents tel que l'*Eristocophis macmahoni* induisent l'agrégation des plaquettes chez l'homme [Ali et al. 2000]. D'autres effets ont également été décrits. En effet, les LAAO de certains venins sont capables d'induire l'apoptose de cellules endothéliales et vasculaires humaines mais également de diverses lignées tumorales humaines ou murines telles que les cellules humaines de leucémie promyélocytaire de la lignée HL-60 [Torii et al. 1997], ou encore les cellules murines de leucémie lymphocytaire de la lignée L1210 [Suhr et al. 1999]. L'effet toxique des LAAO serait essentiellement lié à la production d' H_2O_2 . L'ajout de catalase qui dégrade l' H_2O_2 , permet de bloquer cet effet.

Des protéines présentant une activité LAAO ont également été décrites chez les poissons. Ainsi, les extraits viscéraux du poisson *Chub mackerel* sont capables d'induire l'apoptose de cellules tumorales humaines. Le gène codant pour la protéine responsable de cette activité a été cloné. Cette protéine appelée Apoptosis-Inducing Protein (AIP) présente une activité LAAO dirigée contre la L-lysine. AIP est induite seulement après l'infection du poisson par le nématode *Anisakis simplex* et se localise au niveau de la capsule entourant le nématode afin d'empêcher sa migration dans les tissus environnants de l'hôte [Jung et al. 2000] et joue donc un rôle dans le contrôle de la prolifération d'un pathogène. La protéine AIP peut induire l'apoptose des cellules tumorales humaines par deux mécanismes distincts. Un premier mécanisme implique la production de H_2O_2 par l'activité LAAO. Le second mécanisme est induit par l'appauvrissement du milieu en L-lysine (principal substrat de AIP) qui active la voie de l'apoptose caspase-9/cytochrome c [Murakawa et al. 2001].

Plus récemment, une LAAO a été mise en évidence dans le lait de la souris à partir du 18^{ème} jour de gestation et jusqu'à la fin de la lactation. Cette LAAO présente environ 53% d'homologie avec l'apoxine I (LAAO du venin du *Western Diamondback Rattlesnake*) [Sun et al. 2002]. Une étude biochimique a montré un important rôle antibactérien de cette

LAAO, en particulier dans la prévention de l'infection de la glande mammaire [Nagaoka et al. 2009].

Au cours des dix dernières années, de nombreuses LAAO de serpent ont été purifiées et caractérisées d'un point de vue biochimique. En 2000, l'équipe de A Vrieling publia pour la première fois, une cristallographie aux rayons X à haute résolution de la structure de la LAAO de la vipère *Callollesma rhodostoma* (*C. Rhodostoma*), liée au citrate et à l'aminobenzoate, prouvant la structure dimérique de la protéine et indiquant les acides aminés essentiels impliqués dans la liaison au cofacteur FAD (trois résidus : acide glutamique 457, arginine 71, acide glutamique 63) [Pawelek et al. 2000]. Six ans plus tard, un second article de la même équipe montrait une structure cristallographique de la protéine liée à son substrat, la phénylalanine. Cette cristallographie a permis de déterminer que l'acide aminé His223 est impliqué dans l'ouverture du canal H₂O₂ et la liaison au substrat et que les acides aminés arginine 90, glycine 464 et tyrosine 372 sont impliqués uniquement dans la liaison au substrat [Moustafa et al. 2006]. Ces études ont mis en évidence deux sites de N-glycosylation, l'asparagine 172 situé dans le domaine hélicoïdal et l'asparagine 361 localisé dans le domaine de liaison au substrat [Pawelek et al. 2000]. Le glycanne de ces deux N-glycosylations a été en suite identifié comme étant un dodesaccharide fucosylé, bis-sialylé et biantennaire [Geyer et al. 2001]

Une étude de la structure primaire de l'apoxine I parue en 1998 [Raibekas et al. 1998], a observé 37% d'identité de séquence entre l'apoxine I et une protéine nouvellement décrite : l'Interleukine 4-induced gene 1 (IL4I1) de souris. IL4I1 présente elle-même une homologie de 51% avec la LAAO décrite dans le lait de souris. Cependant, l'étude phylogénétique des séquences protéiques des L-amino-acid oxydases montre une plus forte homologie de séquences entre la protéine IL4I1 des mammifères et les LAAO des poissons dont le poisson zèbre [Hughes 2010].

2. L'enzyme Interleukin 4-induced gene 1 (IL4I1.)

- Structure et profil d'expression de la protéine IL4I1

Le gène *Il4i1* (EC1.4.3.2) a été initialement décrit comme l'un des gènes induits de façon précoce par l'IL-4 dans les lymphocytes B murins. Par la suite, il fut mis en évidence chez l'homme [Chu et al. 1997; Chavan et al. 2002]. Ce gène de 8 exons, dont le codon d'initiation de la traduction se situe au niveau du deuxième exon [Chavan et al. 2002], est

localisé sur le chromosome 19 chez l'homme (locus 19q13.-q13.4) et sur le chromosome 7 chez la souris (locus H46) dans une zone de susceptibilité au lupus érythémateux systémique [Chu et al. 1997; Chavan et al. 2002]. Un épissage alternatif codant pour deux isoformes : une isoforme courte (isoforme 1) et une isoforme plus longue (isoforme 2) a été décrit. Ces deux isoformes se distinguent par leur région N-terminale, de composition différente et plus courte dans l'isoforme 1 [Wiemann et al. 2005]. Chez l'homme, les isoformes 1 et 2 mesurent respectivement 567 et 589 acides aminés. L'isoforme 2 utilise le promoteur du gène NUP62 (qui code pour une protéine faisant partie de la famille des nucléoporines) et contient les deux premiers exons de ce gène [Wiemann et al. 2005]. L'expression de la première isoforme de l'IL4I1 est principalement retrouvée dans les organes lymphoïdes : rate et thymus, ainsi que dans le placenta et les poumons. L'expression de l'isoforme 2 est restreinte aux cellules de Sertoli dans les testicules, aux cellules de Purkinje et aux cellules de l'hippocampe dans le cerveau et aux cellules mitrales dans le bulbe olfactif [Chavan et al. 2002; Wiemann et al. 2005]. L'isoforme 2 est également exprimée au niveau de la tête des spermatozoïdes et pourrait être impliquée dans l'interaction spermatozoïde/ovocyte. Cependant, les souris KO IL4I1 ne présentent pas de trouble particulier de leur fertilité [Stein et al. 2006].

L'isoforme 1 est la seule isoforme biochimiquement caractérisée, aussi, dans la suite de ma thèse, je la désignerai sous le nom d'IL4I1.

IL4I1 est constituée d'un peptide signal N-terminal (acides aminés 1 à 21) lui permettant d'être sécrétée, d'un large domaine central fortement homologue à un domaine L-amino-acid oxydase et d'une partie C-terminale [Chu et al. 1997; Chavan et al. 2002; Boulland et al. 2007]. Elle présente entre 37 et 43% d'identité et 58 à 63% de similarité (acides aminés de même type) avec les LAAO retrouvées dans le *S.Japonicus*, le *A. Blomhoffi*, le *C.atrox*, le *C.adamanteus* et le *C.Rhodostoma* [Chavan et al. 2002]. Par ailleurs, hIL4I1 et mL4I1 présentent de faibles similarités avec d'autres enzymes utilisant le FAD comme cofacteur telles que les monoamines oxydases (MOA). La séquence du domaine LAAO de l'IL4I1 contient les acides aminés clés impliqués dans la catalyse et la liaison au FAD. Ces acides aminés sont très conservés entre les espèces [Chavan et al. 2002]. D'autre part, trois domaines connus pour être conservés et impliqués dans la liaison au FAD dans les MOA sont retrouvés dans la séquence de la protéine IL4I1. Aussi, dès l'analyse de sa séquence nucléotidique, la protéine IL4I1 a été considérée comme une LAAO [Chavan et al. 2002].

La protéine IL4I1 humaine (hIL4I1) est significativement plus courte (567 acides aminés, 63 kD) que la protéine murine (mIL4I1, 630 acides aminés, 70 kD).

Bien qu'elles présentent 79% d'identité dans leur partie N-terminale, ces deux protéines diffèrent fortement au niveau de la région C-terminale avec seulement 11% d'homologie. Par ailleurs, leurs propriétés biochimiques sont légèrement différentes. Chez la souris, l'extrémité C-terminale de 127 acides aminés est acide et chargée négativement, alors que chez l'homme l'extrémité C-terminale de 62 acides aminés est plus basique et moins négative [Chavan *et al.* 2002]. L'ensemble de ces divergences, ne semble cependant pas entraîner de différence majeure d'activité enzymatique entre les protéines humaine et murine [Chu *et al.* 1997; Chavan *et al.* 2002; Boulland *et al.* 2007] (**figure 23**).

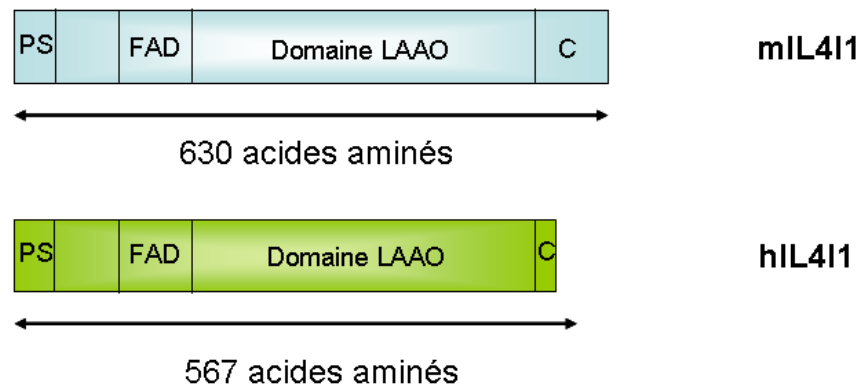


Figure 23: Représentation schématique des protéines IL4I1 murine et humaine.

Elles présentent un peptide signal [PS], un domaine L-amino-acid oxydase, un domaine de liaison à la Flavine Adénine Dinucléotide [FAD] et un domaine C-terminal [C].

Il existe 80% d'homologie entre les protéines humaine et murine. Le domaine C-terminal présente une faible similarité entre la protéine humaine et murine (<11%).

La protéine IL4I1 présente 4 sites potentiels de N-glycosylation. Le traitement par la tunicamycine (inhibiteur de N-glycosylation) de cellules HEK 293 transfectées avec l'ADNc codant IL4I1 induit la production d'une protéine de taille réduite et très faiblement sécrétée [Boulland *et al.* 2007].

La protéine IL4I1 présente une activité LAAO dirigée contre les acides aminés aromatiques, principalement contre l'acide aminé essentiel phénylalanine. Son activité déamine la phénylalanine en phénylpyruvate et produit de l'ammonium et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) [Mason *et al.* 2004; Boulland *et al.* 2007]. Cette catalyse utilise le cofacteur FAD (**figure 24**).



Figure 24: Représentation schématique du catabolisme de la L-phénylalanine par l'enzyme Interleukine-4 induced gene 1 (IL4I1)

La structure tertiaire d'IL4I1 est actuellement inconnue. Cependant, la mutagenèse dirigée de l'acide aminé E481A chez l'homme confirme le rôle de cet acide aminé dans l'activité IL4I1. La protéine obtenue est plus faiblement sécrétée mais présente surtout une très faible activité enzymatique [Boulland *et al.* 2007].

- Fonction de la protéine IL4I1

Actuellement, très peu d'études sont publiées sur la protéine IL4I1. Ces études se sont concentrées sur la caractérisation fonctionnelle *in vitro* de l'IL4I1.

L'enzyme IL4I1 a été décrite initialement comme un produit des lymphocytes B [Chu *et al.* 1997; Chavan *et al.* 2002; Mason *et al.* 2004]. IL4I1 en dégradant la phénylalanine, prive le milieu de phénylalanine et produit des dérivés toxiques : le phénylpyruvate, l'ammoniaque et l'H₂O₂ [Boulland *et al.* 2007].

Dans le laboratoire, nous avons observé une forte expression de l'ARN messager codant pour IL4I1 par des cellules d'une variété particulière de lymphome B à grandes cellules, le lymphome primitif du médiastin. Notre hypothèse initiale de travail a été qu'IL4I1 pouvait permettre à ces cellules de moduler l'activité des lymphocytes T. L'utilisation de cellules HEK 293 transfectées pour exprimer IL4I1 constitutivement nous a permis de montrer qu'IL4I1 est capable d'inhiber la prolifération des lymphocytes T humains *in vitro* même lorsque les cellules productrices d'IL4I1 sont isolées des lymphocytes T par un transwell. De plus, le mutant enzymatiquement inactif IL4I1-E481A ne présente pas d'activité inhibitrice. Ces résultats indiquent que la prolifération des lymphocytes T est sensible à l'activité enzymatique d'IL4I1. Les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ présentent une sensibilité identique à cette activité, tandis que les lymphocytes T mémoires CD45RO⁺ sont plus fortement inhibés que les lymphocytes T naïfs CD45RA⁺ [Boulland *et al.* 2007]. Cette inhibition de prolifération n'est pas liée à une modification de l'apoptose mais est associée à une diminution transitoire de l'expression à la membrane de la chaîne CD3 ζ du TCR. [Boulland *et al.* 2007].

Il est connu de la littérature que l'H₂O₂ exerce des effets toxiques sur les fonctions cellulaires T. [Kono *et al.* 1996; Otsuji *et al.* 1996; Schmielau *et al.* 2001; Takahashi *et al.*

2005]. Ces effets dépendent de la concentration et de la durée de l'exposition. Une courte exposition à l'H₂O₂ ne modifie pas la viabilité des lymphocytes T mais peut diminuer fortement le signal induit par le TCR en réduisant l'expression de la chaîne ζ [Kono et al. 1996; Otsuji et al. 1996; Schmielau et al. 2001]. Après de longues expositions (6 à 8h), l'apoptose des lymphocytes T et plus particulièrement des cellules T CD8⁺ mémoires peut être obtenue [Takahashi et al. 2005]. Nous avons observé que les lymphocytes T sont plus sensibles à l'H₂O₂ qu'au phénylpyruvate. L'inhibition de la prolifération des lymphocytes T peut être observée à des doses d'H₂O₂ de l'ordre du micromolaire alors qu'il faut des millimolaires de phénylpyruvate pour un même effet [Boulland et al. 2007]. Cependant, l'effet du phénylpyruvate et de la déplétion de la phénylalanine ne peuvent être exclu totalement. En effet, l'appauvrissement de l'environnement en acide aminé essentiel a été impliqué dans l'induction de nombreux mécanismes immunosuppresseurs incluant l'arrêt de prolifération des lymphocytes T et l'induction de lymphocytes T régulateurs [Cobbold et al. 2009]. La réponse cellulaire à la privation en acide aminé peut entraîner l'augmentation intracellulaire de tRNAs non chargé qui peuvent se fixer à la protéine kinase GCN2 et ainsi l'activer. L'activation de GCN2 induit l'arrêt du cycle cellulaire [Hao et al. 2005; Maurin et al. 2005]. De plus, Cobbold et collaborateurs ont mis en évidence le rôle de la consommation d'acide aminé essentiel dans l'expansion de cellules suppressives. La disparition de certains acides aminés essentiels du milieu (dont la phénylalanine) entraîne une inhibition de la voie mTOR. Cette inhibition induit, dans les cellules T effectrices, l'expression du facteur de transcription spécifique des lymphocytes T régulateurs : Foxp3 [Cobbold et al. 2009].

- Expression de la protéine IL4I1 en situations pathologiques

En 2003, l'ARNm de l'*IL4I1* a été retrouvé fortement exprimé dans les lymphomes B primitifs du médiastin dépendant de la signalisation via la voie STAT6. A contrario, la plupart des lymphomes diffus à grandes cellules B non médiastinaux et tous les lymphomes B de bas grade présente un faible taux d'ARNm de l'*IL4I1* [Copie-Bergman et al. 2003; Guiter et al. 2004]. Par la suite, l'étude du profil d'expression de l'enzyme IL4I1 dans un panel de 315 tumeurs lymphoïdes et non lymphoïdes a montré une expression de la protéine IL4I1 dans de nombreux types de cancer [Carbonnelle-Puscian et al. 2009]. Dans la majorité des tumeurs présentant un fort infiltrat inflammatoire, l'expression de l'IL4I1 a été retrouvée au niveau de la population macrophagique. Un abondant infiltrat de

TAM exprimant IL4I1 est typiquement observé dans les mésothéliomes, les adénocarcinomes du poumon, les carcinomes du colon et la plupart des lymphomes B [Carbonnelle-Puscian et al. 2009]. IL4I1 peut également être exprimée par les cellules tumorales dans de rares cas de tumeurs solides (mésothéliome, poumons, colon) et dans de nombreux lymphomes B comprenant les lymphomes folliculaires, les lymphomes de Hodgkin et les lymphomes B primitifs du médiastin confirmant les premières observations réalisées en 2003 [Copie-Bergman et al. 2003; Carbonnelle-Puscian et al. 2009]. De façon intéressante, deux profils d'expression d'IL4I1 sont retrouvés dans les lymphomes de Hodgkin. En effet, lorsque la protéine IL4I1 est retrouvée fortement exprimée dans plus de 50% des cellules tumorales, l'infiltrat inflammatoire n'exprime pas IL4I1. A l'inverse, lorsque les cellules tumorales sont négatives pour l'expression de l'IL4I1, presque tous les TAM expriment IL4I1. L'étude de l'activité enzymatique dans différents lymphomes folliculaire montrent que la protéine IL4I1 exprimée est également fortement active. De plus, dans ces lymphomes, de forts niveaux d'expression d'IL4I1 semblent associés avec une absence d'implication de la moelle osseuse et un meilleur pronostic dans les 23 cas étudiés. En effet, dans le cas particulier du lymphome folliculaire, les cellules B tumorales dépendent de l'interaction avec les cellules T follicular helper (T_{FH}) pour leur survie, ainsi l'effet délétère de l'expression de l'IL4I1 sur les LT pourrait être dirigé contre cette population T particulière [Carbonnelle-Puscian et al. 2009]. A contrario, dans les tumeurs solides, l'expression d'IL4I1 dans le micro-environnement tumoral est retrouvée associée à un mauvais pronostic. Une première étude publiée par l'équipe de Finak et collaborateurs a identifié, au sein de l'expression par les cellules stromales du micro-environnement tumoral de 163 gènes associés à un mauvais pronostic dans le cancer du sein, l'ARNm de l'IL4I1 [Finak et al. 2008]. Chez la souris, l'étude de l'expression différentielle au sein du microenvironnement tumoral de protéines impliquées dans le rejet ou la tolérance tumorale dans les tumeurs mammaire implique IL4I1 dans l'échappement tumoral. Pour cela, les auteurs utilisent une lignée de tumeur mammaire exprimant l'antigène Neu. Lorsque ces cellules sont injectées aux souris FVB, les tumeurs sont rejetées entre 15 et 21 jours après développement tumoral. Cependant, après une centaine de jours, certaines souris rechutent et développent une tumeur, dans ce cas d'échappement tumoral une perte de l'antigène Neu est observée. En parallèle, cette même tumeur injectée chez des souris transgéniques exprimant de fort niveau de Her2/Neu présente un modèle de tolérance tumorale. Par la suite, les auteurs comparent les différents ARNm exprimés dans les trois modèles tumoraux développés dans cette étude (un modèle de rejet, un

modèle d'échappement et un modèle de tolérance de la tumeur). IL4I1 est retrouvé exprimé dans les trois cas avec une très forte surexpression dans le modèle d'échappement tumoral. Il est intéressant de noter que l'ARNm de l'IL4I1 est deux fois plus exprimé dans le modèle de tolérance tumorale que dans le modèle de rejet. Ainsi ces résultats tentent à montrer le rôle immunosuppresseur de l'enzyme IL4I1 in vivo [Worschech et al. 2008].

In vitro, différentes lignées de lymphomes expriment une protéine IL4I1 fortement active dont les lignées de lymphome de Hodgkin L428 et L1236 [Carbannelle-Puscian et al. 2009].

D. Autres acides aminés impliqués dans l'immunosuppression : L-cystéine, L-glutamine et L-histidine

Les Arg I et II, iNOS, IDO et IL4I1 ne sont pas les seules enzymes métabolisant les acides aminés capables d'exercer des fonctions suppressives sur les lymphocytes T. Le métabolisme de trois autres acides aminés essentiels ou semi-essentiels a été impliqué dans cette régulation : la L-cystéine, la L-glutamine et la L-histidine.

La cystéine du milieu environnant est nécessaire à la prolifération des lymphocytes T. En effet, les lymphocytes T n'expriment pas la cystathionase qui convertit la méthionine en cystéine et sont incapables d'importer la cystine et de la réduire en cystéine. La cystéine fournie par les cellules présentatrices de l'antigène est importée dans le lymphocyte T par le transporteur des acides aminés neutres ASC. Les DC sont capables d'absorber la cystine du milieu et de sécréter la cystéine et la thioredoxine, générant ainsi un environnement réducteur qui facilite les réponses immunes [Angelini et al. 2002]. Les MDSC, qui n'expriment pas le transporteur ASC, inhibent la prolifération T en séquestrant la cystéine dans leur cytoplasme [Srivastava et al. 2011].

La glutamine est utilisée en grande quantité par les cellules se divisant rapidement, telles que les leucocytes, afin de fournir de l'énergie et du matériel pour la biosynthèse des nucléotides. Sa déamination en L-glutamate et en ammonium est catalysée par les glutamases. Chez les mammifères, les glutamases sont fortement exprimées dans les lymphocytes et les macrophages et cette expression est augmentée en réponse à un stimulus inflammatoire [Newsholme et al. 1997]. Le rôle

fondamental de la glutamine dans l'activation des lymphocytes T a été récemment montré par Carr et collaborateurs. Suite à la stimulation CD28, les lymphocytes augmentent l'absorption de cet acide aminé et des enzymes nécessaires à l'utilisation de la glutamine dans le cycle de Krebs [Carr et al. 2010]. Bien que connu comme un neuromédiateur, le glutamate a été récemment montré avoir un effet sur la réponse immunitaire. Le « metabotropic receptor » 4 du glutamate (mGluR4) exprimé par les DC augmente après activation et inhibe la production intracellulaire d'AMP cyclique. Les souris déficientes pour le gène codant mGluR4 deviennent vulnérables à l'EAE et développent majoritairement des réponses Th17. Le traitement des souris contrôle avec des composés stimulant la voie du mGluR4 augmente la résistance à l'EAE, grâce à une réponse protectrice des lymphocytes Treg orchestrée par les DC via la production d'IL-6 et d'IL-23 [Fallarino et al. 2010].

L'acide aminé semi-essentiel histidine peut être transformé par l'histidine décarboxylase en histamine, un médiateur vasoactif pro-inflammatoire, ou par des histidases en acide trans-urocanique (trans-UCA). Des études impliquent le catabolisme de l'histidine dans la régulation de la réponse immune. Dans la peau, le trans-UCA agit comme photorécepteur des UVB qui le transforment en cis-UCA puissante molécule immunosuppressive [Noonan et al. 1992].

IV-OBJECTIFS DE TRAVAIL

Durant ma thèse, mon travail s'est focalisé sur la caractérisation structurelle et fonctionnelle de la protéine IL4I1 en situation physiologique et pathologique. Mes objectifs de travail se sont divisés en trois parties :

- identifier les types cellulaires capables de produire une enzyme IL4I1 active *in vitro* ainsi que les stimuli et voies de signalisations impliqués dans cette expression.

- valider chez la souris l'hypothèse d'un rôle d'IL4I1 dans l'échappement tumoral au système immunitaire.

- définir, par homologie avec les LAAO connues, les acides aminés impliqués dans l'activité et/ou la sécrétion de l'enzyme.

La protéine IL4I1 doit son nom à son induction précoce par l'IL-4 *in vitro* dans les lymphocytes B murins et humains stimulés. En accord avec ces observations, nous avons mis en évidence au sein du laboratoire la surexpression de l'ARNm et de la protéine IL4I1 dans des lignées et des tumeurs primaires de plusieurs types de lymphome B : les lymphomes B primitifs du médiastin, mais également de lymphome folliculaire et de lymphome de Hodgkin. Cependant, nous avons observé *in vivo* sur des coupes d'organes lymphoïdes et de tumeurs de diverses origines que la protéine IL4I1 est essentiellement exprimée par des cellules d'origine myéloïde. La quantification des ARNm d'IL4I1 dans diverses populations de cellules immunitaires montrait également une expression prépondérante du gène dans les cellules dendritiques matures et les macrophages par rapport aux lymphocytes B [Boulland *et al.* 2007]. L'ensemble de ces résultats suggérait qu'IL4I1 pouvait appartenir à l'arsenal des enzymes immunosuppressives utilisées communément par les cellules d'origine myéloïde pour inhiber les réponses lymphocytaires T. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons étudié l'expression d'IL4I1 *ex vivo* dans des lésions inflammatoires chroniques et *in vitro* dans des populations cellulaires diversement stimulées. La lignée monocyttaire THP1 nous a servi de modèle pour analyser le rôle inhibiteur d'IL4I1 vis-à-vis des lymphocytes T.

Depuis une vingtaine d'années, un nombre croissant de publications fait état du rôle immunosuppresseur d'enzymes telles que l'Arg I, l'iNOS et l'IDO qui dégradent des acides essentiels et produisent des dérivés toxiques pour les lymphocytes T. L'inhibition de la

réponse immunitaire spécifique par ces enzymes exprimées par les cellules tumorales et/ou des cellules myéloïdes infiltrant les tumeurs, a été impliquée dans l'échappement tumoral. IL4I1, qui dégrade la phénylalanine et produit de l' H_2O_2 , du phénylpyruvate et de l'ammoniac, présente donc plusieurs points communs avec ces enzymes immunosuppressives. C'est pourquoi, nous avons mis en place un modèle murin de cancer permettant d'étudier l'influence de l'expression d'IL4I1 sur la réponse immunitaire anti-tumorale et la croissance des tumeurs. A la recherche d'un mutant d'IL4I1 inactif utilisable dans cette étude, nous avons commencé à nous intéresser à la relation structure/fonction de la protéine IL4I1 murine.

RESULTATS

I-DICHOTOMIE D'EXPRESSION ET D'ACTIVATION DE LA PROTEINE IL4I1

Article 1 : Dichotomie entre les facteurs induisant l'enzyme immunosuppressive IL4I1 dans les lymphocytes B et les cellules phagocytaires mononuclées.

Dichotomy between factors inducing the immunosuppressive enzyme IL4-induced gene 1 (IL4I1) in B lymphocytes and mononuclear phagocytes.

Jeanine MARQUET, Fanette LASOUDRIS, Céline COUSIN, Marie-Line PUIFFE, Nadine MARTIN-GARCIA, Véronique BAUD, Fanny CHEREAU, Jean-Pierre FARCET, Valérie MOLINIER-FRENKEL and Flavia CASTELLANO.

European Journal of Immunology. Septembre 2010 40 :2557-2568

Interleukine-4 induced gene 1 (IL4I1) a été initialement décrite par Chu et al comme un gène précocement activé par l'IL-4 dans les lymphocytes B de la souris [Chu et al. 1997]. Des analyses du transcriptome de lymphomes B réalisées au sein du laboratoire ont montré que l'ARNm d'IL4I1 est fortement exprimé dans les lymphomes B primitifs du médiastin en comparaison aux autres types de lymphomes B [Copie-Bergman et al. 2003]. Plus récemment, une étude par immunohistochimie a confirmé ces données et montré l'expression d'IL4I1 dans d'autres types de lymphomes B tels que les lymphomes folliculaires et les lymphomes de Hodgkin. Cependant, dans les tissus lymphoïdes non tumoraux et les tumeurs non lymphoïdes, l'expression d'IL4I1 était majoritairement détectée dans des cellules d'origine myéloïde [Carbonnelle-Puscian et al. 2009]. D'autre part, nos travaux initiaux avaient montré que l'enzyme purifiée inhibe la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, avec une inhibition préférentielle des lymphocytes T CD45RO⁺ [Boulland et al. 2007].

Nous avons donc formulé l'hypothèse que l'IL4I1 produite par les cellules présentatrices d'antigène d'origine myéloïde permettrait de contrôler l'activation des

lymphocytes T dans des lésions inflammatoires, participant ainsi au contrôle physiologique de l'inflammation.

C'est pourquoi, nous avons mis en place une lignée monocyttaire THP1 exprimant constitutivement la protéine IL4I1 à des niveaux proches de ceux d'un macrophage humain. Cette lignée est capable *in vitro* d'inhiber la prolifération T et la sécrétion de certaines cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, notamment l'IFN γ .

Nous avons caractérisé les populations myéloïdes exprimant IL4I1 dans des lésions inflammatoires chroniques (granulomes) de sujet atteints de pathologies associées à une expansion des populations Th1 (sarcoïdose, tuberculose) et Th2 (schistosomiase). De façon inattendue l'expression d'IL4I1 est très faible dans les lésions Th2 tandis que de très forts niveaux sont détectés dans les macrophages et les cellules dendritiques présents dans les lésions Th1.

En accord avec ces observations, l'analyse des conditions d'expression d'IL4I1 *in vitro* par les différentes populations humaines de cellules myéloïdes et les lymphocytes B a montré que les macrophages et les cellules dendritiques sont les populations qui expriment les plus fortes activités IL4I1. Ces populations répondent à des stimuli pro-inflammatoires activant les voies de signalisation NF κ B et STAT1 (ligands de TLR, IFN de type I et IFN γ), tandis que les lymphocytes B produisent de plus faibles niveaux d'IL4I1 en réponse à l'activation de la voie STAT6 par l'IL-4 ou de la voie NF κ B par le CD40L. Ainsi, paradoxalement, deux voies STAT distinctes activent l'expression d'IL4I1 dans les populations lymphoïdes B et myéloïdes. Nous n'avons pas à l'heure actuelle d'explication pour cette dichotomie.

L'inhibition de la production d'IFN γ par des cellules myéloïdes exprimant IL4I1 suggère un rôle de rétro-contrôle de l'inflammation Th1 par ces cellules. IL4I1 pourrait être produit par les cellules d'origine myéloïde sur le site inflammatoire où dans les organes lymphoïdes drainant la lésion, en réponse à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN γ et ainsi freiner l'exacerbation locale de la réponse inflammatoire. De plus, cette enzyme pourrait exercer un effet bactéricide direct (données non publiées du laboratoire), comme cela a été montré pour l'IDO.

II-ROLE IMMUNOMODULATEUR DE LA PROTEINE IL4I1 DANS LE DEVELOPPEMENT TUMORAL

A. Mise en place d'un modèle d'étude de l'expression d'IL4I1 par la tumeur

Article 2 : L'expression de l'enzyme IL4I1 est associée à une inhibition de la réponse cellulaire T anti-tumorale et à l'échappement tumoral chez la souris.

Inhibition of antitumor T-cell response and immune escape in mice associated with Interleukin 4-induced gene 1 expression.

Fanette LASOUDRIS, Céline COUSIN, Armelle PREVOST-BLONDEL, Nadine MARTIN-GARCIA, Issam ABD-ALSAMAD, Nicolas ORTONNE, Jean-Pierre FARCET, Flavia CASTELLANO and Valérie MOLINIER-FRENKEL

European Journal of Immunology (accepté).

De nombreux travaux ont montré une participation des enzymes Arg I, iNOS et IDO à l'échappement tumoral au système immunitaire. Ces trois enzymes peuvent être produites par des cellules myéloïdes présentes dans les organes lymphoïdes et dans le microenvironnement tumoral et/ou par les cellules tumorales elles-mêmes, en réponse, notamment, à des cytokines de la famille Th1/Th2. Ces enzymes catalysent des acides aminés essentiels, induisant l'appauvrissement local de ces acides aminés et la production de métabolites toxiques pour les cellules T effectrices anti-tumorales. IL4I1, qui présente une activité oxydase des L-acides aminés conduisant à la dégradation de la L-phénylalanine en phénylpyruvate, H₂O₂ et ammoniac, et inhibe la prolifération des lymphocytes T, présente donc de fortes similarités avec cette famille d'enzymes. De plus, IL4I1 est exprimée *in vivo* par les macrophages et les cellules dendritiques présents dans les organes lymphoïdes secondaires et dans l'infiltrat inflammatoire d'un grand nombre de tumeurs, ainsi que dans les cellules tumorales de certaines tumeurs humaines, en particulier des lymphomes B (lymphome B primitif du médiastin, lymphome de Hodgkin, lymphome folliculaire, leucémie lymphoïde chronique) et les mésothéliomes [*Carbonnelle-*

Puscian et al. 2009]. Toutes ces observations suggèrent qu'IL4I1 pourrait jouer un rôle dans l'échappement des tumeurs au système immunitaire.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons développé à partir de la lignée murine B16-gp33, qui présente un épitope immunodominant d'origine virale en association à la molécule H2-D^b (épitope CD8⁺ de la glycoprotéine du virus LCMV, aa 33-41), un modèle de mélanome exprimant *in vivo* IL4I1 à deux niveaux différents d'activité enzymatique (B16-gp33-IL4I1). Dans ce modèle, on observe après vaccination contre l'antigène gp33, que les tumeurs B16-gp33-IL4I1 se développent avec une incidence nettement accrue en comparaison aux tumeurs contrôles n'exprimant pas IL4I1. Cette incidence est corrélée au niveau de production d'IL4I1 par les cellules tumorales et au pourcentage de cellules exprimant IL4I1 au sein de la tumeur. Un échappement significatif peut être observé après l'injection de seulement 20% de cellules exprimant IL4I1 mélangées à des cellules tumorales contrôle, ce qui représente l'équivalent de l'infiltrat macrophagique d'une tumeur humaine. De plus, l'activité IL4I1 mesurée dans ces tumeurs est proche de celle détectée dans des biopsies de mélanome (expression d'IL4I1 dans les macrophages) et nettement inférieure à celle mesurée dans des biopsies de mésothéliome (expression d'IL4I1 dans les macrophages et les cellules tumorales), ce qui prouve la pertinence clinique du modèle. Enfin, l'activité IL4I1 est mesurable dans le sérum des souris ayant reçu des cellules B16-gp33-IL4I1 avant le développement clinique de la tumeur.

L'échappement tumoral observé dans ce modèle murin est associé à l'inhibition de la prolifération, de la sécrétion d'IFN γ et de la cytotoxicité des lymphocytes T dirigés contre gp33, détectable dans les ganglions drainant la tumeur, mais également dans le sang et la rate des animaux. Une inhibition similaire est détectée vis-à-vis d'un antigène naturel du mélanome (épitope TRP2 de la tyrosinase), suggérant qu'IL4I1 induit une dépression généralisée de la réponse antitumorale.

Ce travail établit pour la première fois le rôle *in vivo* d'IL4I1 dans l'échappement tumoral à la réponse lymphocytaire T cytotoxique. Une faible expression d'IL4I1, équivalente à celle observée dans des tumeurs humaines exprimant IL4I1 exclusivement dans les TAM, suffit à favoriser le développement des tumeurs et pourrait donc contribuer au mauvais pronostic de cancers chez l'homme, tel que cela a été observé dans le cancer du sein par Finak et ses collaborateurs [*Finak et al. 2008*].

Inhibition of antitumor T-cell response and immune escape in mice associated with Interleukin 4-induced gene 1 expression

Fanette Lasoudris^{1,2}, Céline Cousin^{1,2}, Armelle Prevost-Blondel^{4,5}, Nadine Martin-Garcia^{1,2}, Issam Abd-Alsamad⁶, Nicolas Ortonne^{1,2,3}, Jean-Pierre Farcet^{1,2,3}, Flavia Castellano^{1,2,3,*} and Valérie Molinier-Frenkel^{1,2,3,*}

¹ INSERM, U955, Créteil, F-94000, France ;

² Université Paris-Est, Faculté de Médecine, UMR-S 955, Créteil, F-94000, France ;

³ AP-HP, Groupe Henri Mondor-Albert Chenevier, Service d'Immunologie Biologique, Créteil, F-94000, France;

⁴ Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS (UMR 8104), Paris, France;

⁵ INSERM U1016, Paris, France;

⁶ Centre Hospitalier Intercommunal, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologique, Créteil, F-94000, France;

*The last two authors equally contributed to this work

Running title: IL4I1 and tumor immunoresistance

Key words: IL4I1, tumor escape, mice, immunoediting, phenylalanine oxidase

Correspondence: Flavia Castellano and Valérie Molinier-Frenkel, INSERM U955, IMRB team 09, Hôpital Henri Mondor, 51 av du Maréchal de Lattre de Tassigny, F-94010 Créteil cedex, France ; flavia.castellano@inserm.fr, valerie.frenkel@inserm.fr, tel 0033 1 49 813765, fax 0033 1 49813566

ABSTRACT

The L-phenylalanine oxidase IL411 inhibits T-cell proliferation *in vitro* through H₂O₂ production, and is highly expressed in tumor-associated macrophages. IL411 is also detected by immunohistochemistry in neoplastic cells from several B-cell lymphomas and some non-lymphoid tumors.

To evaluate IL411 effect on tumor growth, we developed a mouse melanoma model constitutively coexpressing IL411 and the GP33 epitope. After GP33 vaccination, tumors developed more frequently in mice injected with IL411-expressing cells in comparison to mice receiving control cells. Tumor escape was preceded by a rapid diminution of IFN- γ producing cytotoxic antitumor CD8⁺ T cells. Moreover, tumor incidence was already increased when only 20% of the injected cells expressed IL411. The minimal IL411 activities leading to tumor escape were close to those detected in human melanoma and mesothelioma.

Thus, we demonstrate the immunosuppressive functions of IL411 *in vivo* and suggest that IL411 facilitates human tumor growth by inhibiting the CD8⁺ antitumor T-cell response.

INTRODUCTION

Neoplastic cells adopt multiple strategies to survive and grow despite tumor surveillance by the immune system. Sabotage strategies often exploit regulating cell populations, which naturally prevent autoimmunity and chronic inflammation in healthy individuals, such as regulatory T cells, myeloid-derived suppressor cells, tolerogenic dendritic cells and alternatively activated macrophages (reviewed in [1-5]). In the last decade, a family of enzymes has been described participating in the immunosuppressive capacity of the tumor-activated myeloid cell populations. The activity and functions of indoleamine-2,3-dioxygenase [6], arginase 1 [7] and inducible nitric oxide synthase [8] have been extensively explored. These enzymes share several properties [9]. First, they are produced by myeloids cells in lymphoid organs and in the tumor bed and/or by the tumor cells themselves [10-12]. Secondly, their expression involves cytokines from the Th1/Th2 family. Third, their immunosuppressive properties are based on their amino-acid catabolizing activity which leads to the depletion of essential amino-acids and to the production of metabolites which are toxic for anti-tumor effector T cells [13-15]. Several reports have established the role of these enzymes in tumor escape from immunosurveillance [10-12, 16].

Interleukin-4 Induced Gene 1 (*IL4I1*) was identified as an IL-4 inducible gene in B lymphocytes [17]. The human and mouse *IL4I1* mRNA share a strong sequence homology and encode a secreted protein [18, 19]. We have shown that this protein is an L-amino-acid oxidase which primarily deaminates the essential amino-acid phenylalanine to produce H₂O₂. *IL4I1* inhibits human CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte proliferation *in vitro* via H₂O₂ production, with a preference towards memory T lymphocytes [18]. Monocyte-derived dendritic cells and macrophages – but not B cells, as would have been expected

from the literature [17, 19] – represent the major IL4I1 producers after stimulation involving NF κ B and/or STAT1 activation [20].

Tumors are often accompanied by an important myeloid infiltrate. Indeed, in a study of 315 cancers, we observed IL4I1 expression in the tumor-associated macrophage (TAM) population of most cases, independently of the tumor type. Moreover, IL4I1 was also detected in the tumor cells of several B lymphoma subtypes, comprising follicular lymphoma, Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma, and in some cases of non-lymphoid tumors, such as mesothelioma [21].

Thus, IL4I1 meets the criteria of an immunosuppressive enzyme [3, 9], suggesting that it may participate in tumor immune escape. To evaluate this hypothesis, we developed a mouse tumor model constitutively expressing IL4I1. In this work, we show for the first time that IL4I1 expression facilitates tumor growth by inhibiting the CD8⁺ antitumor T cell response.

RESULTS

Overexpression of IL4I1 in a murine tumor model

To assess *in vivo* whether IL4I1 expression in tumors favors escape from the immune response, we developed a new tumor model based on the use of the melanoma B16GP33 cell line, which expresses the GP33 CD8⁺ T cell epitope as a tumor antigen [22], but does not display basal IL4I1 enzymatic activity (Table I). B16GP33 cells were transfected with the mouse IL4I1 cDNA and two clones stably expressing the IL4I1 protein (B8 and B11) were selected. The A1 clone, transfected with the empty vector, was selected as a control. Production of the myc-tagged IL4I1 protein by the B8 and B11 clones was demonstrated by Western blot and immunofluorescence (Figure 1A). IL4I1 was secreted and functional in both clones with an activity on average 1.4 fold higher in B11 cells and 1.7 fold higher in B11 medium in comparison to the B8 clone (Table I). Neither IL4I1 protein, nor enzymatic activity was detected in the A1 cells. The IL4I1 enzymatic activity of B8 and B11 clones was close to those measured in human cell populations. The B11 activity (322 ± 49 pmoles H₂O₂/h/10⁵ cells) was nearly equivalent to the activity of the L428 Hodgkin lymphoma cell line (354 ± 140 pmoles H₂O₂/h/10⁵ cells; mean \pm SD from 13 independent tests). It also displayed a 25% and 60% lower IL4I1 activity compared to that of unstimulated and IFN γ -stimulated monocyte-derived human macrophages respectively (432 ± 101 and 804 ± 129 pmoles H₂O₂/h/10⁵ cells) [20].

No significant difference in proliferation kinetics between A1, B8 and B11 was observed *in vitro* (Supplementary figure 1). Finally, the three clones displayed similar capacities to present GP33 to specific CD8⁺ T cells (Figure 1B).

T cell inhibiting IL4I1 properties *in vitro*

We previously showed that the human IL4I1 inhibits T cell proliferation *in vitro*. The murine form shares 80% homology with the human form in the putative enzymatic and FAD-binding domain. In agreement with this, murine IL4I1-expressing clones inhibited significantly the *in vitro* GP33-specific proliferation of TCR transgenic splenocytes from P14 mice (Supplementary figure 2). Moreover, the number of IFN γ -producing anti-GP33 T cells was markedly decreased when splenocytes were cultured in the 3-day conditioned medium of B11 cells (Figure 1C). In these conditions, in contrast to the experiment in Figure 1B, where a few irradiated tumor cells were used as targets, the splenocytes were immediately exposed to a high IL4I1 activity. These results, thus, indicate that IFN γ production was directly affected by IL4I1.

Resistance to immune rejection of IL4I1-expressing tumors

B16 melanoma behaves as an aggressive poorly immunogenic tumor cell line when injected in naïve C57BL/6 mice. However, expression of GP33 by B16GP33 cells leads to tumor rejection in mice adoptively transferred with anti-LCMV cytotoxic T cells [22, 23]. We first tested whether IL4I1 expression by B16GP33 cells would modify their *in vivo* tumor growth after s.c. injection into naïve mice. The first tumors appeared between day 11 and 18 and developed with a similar kinetic, independently of their IL4I1 expression level (Figure 2A and 2B). Thus, B16GP33 tumors are not naturally controlled by the immune system, in accordance with the literature [22].

In order to induce a strong GP33-specific T cell response, C57BL/6 mice were immunized with GP33 in IFA seven days before tumor challenge. As expected, mice were fully protected towards clone A1 (Figure 2C). In contrast, more than 50% of the mice transplanted with the IL4I1-expressing clones developed tumors ($p= 0.012$ B8 versus A1, $p= 0.004$ B11 versus A1).

We have previously demonstrated that the IL4I1 effect on human T cell proliferation is predominantly on CD45RO⁺ T cells [18]. To determine the impact of IL4I1 on tumor development during the memory phase of the immune response, we injected B8 and B11 tumor cells 28 days after immunization (Figure 2D). Under these conditions, 77% of A1 challenged mice controlled tumors at day 80, whereas more than 70% B8 and B11 challenged mice developed a melanoma ($p= 0.049$). After sacrifice of the tumor-bearing animals, melanoma biopsies were preserved for IL4I1 analysis. Expression and activity of the enzyme were detected in both B8 and B11 tumors (Figure 2E and Table 1) with B11 still displaying the strongest activity. Surprisingly, these activities were highly variable and on average two to three fold higher than those measured from the transfected cells in culture. The increase of IL4I1 activity in tumors could not be ascribed to the TAM infiltrate, which was very poor in both IL4I1-expressing and control tumors. As observed in human tumors, most of these rare TAM expressed IL4I1 (supplementary figure 3).

Thus, our data demonstrate that IL4I1 facilitates *in vivo* immune escape of the tumor cells.

Quantitative and functional defects of antitumor CD8⁺ T cells in mice challenged with IL4I1-expressing tumors

In order to establish whether escape of IL4I1-expressing tumors was associated with an alteration of the anti-tumor T cell response *in vivo*, we further analyzed GP33-specific CD8⁺ T cells after tumor challenge (Figure 3A). To increase the number of GP33-specific T cell precursors before vaccination, we adoptively transferred naïve splenocytes from P14 transgenic mice. We also increased the number of injected tumor cells to overcome the immune response in A1 challenged mice and allow simultaneous tumor appearance in all groups. Blood was regularly taken until tumor development 11 to 14

days after challenge to measure the number of circulating tumor-specific CD8⁺ T cells. Mice were then sacrificed and GP33-specific splenocytes were tested for (i) IFN γ production, (ii) acquisition of an effector/memory phenotype and (iii) cytotoxic function.

The kinetics of GP33 specific responses were monitored from blood. At the peak of the immune response (day 7 post-immunization), the circulating GP33-specific population reached 1 to 5 % of the circulating CD8⁺ T lymphocytes and diminished to 0.4 to 3 % two days before tumor challenge with A1, B8 or B11 cell. A few days post-tumor challenge with A1 cells, a considerable increase of the circulating GP33-specific T cells was observed that reached 12 fold over the pre-challenge value, indicating a boost effect of the tumor. In contrast, challenges with B8 and B11 were associated respectively with a small (increase of 3 fold) or absent recall response to the tumor epitope (Figure 3B and 3C). Similar results were obtained on splenic CD8⁺ T cells with a mean of 6.2% versus 3.1% and 2.6% tetramer-positive cells, for A1, B8, and B11 challenged mice respectively (Figure 3D). These results suggest that IL411 expression *in vivo* inhibits T lymphocyte proliferation as observed *in vitro*.

Splenocytes were further analyzed for functionality. Mice challenged with IL411-expressing tumor cells presented a significantly lower anti-GP33 IFN γ response than mice challenged with A1 cells (Figure 3E). The response inhibition was correlated to the level of IL411 production by the tumors (respective decrease of 53% and 84% in splenocytes from B8 and B11 challenged mice). Moreover, the IFN γ response to the melanoma TRP2₁₈₀ epitope was also affected, with a 30 to 50% decrease in B8 and B11 challenged mice in comparison to A1 challenged mice (Figure 3E). Interestingly, in the groups challenged with IL411-expressing tumors, when calculating the percentage of IFN γ -secreting cells amongst the GP33 tetramer labeled cells, we observed that the decrease in the IFN γ -producing anti-GP33 effectors was more profound than the decrease in the total anti-GP33 T cell

population (Figure 3D, left panel). Since the total GP33-specific cells diminished, in animals challenged with IL4I1-expressing tumors, both anti-GP33 cytotoxic T cells (CD107a⁺) and effector/memory T cells (CD44⁺) also decreased in their spleens. However, the percentage of these two cell populations amongst the anti-GP33 effectors remained stable under the influence of IL4I1 (Figure 3D, middle and right panels). Altogether, our results suggest that IL4I1 not only diminishes the number of anti-tumor specific T cells, but also affects their capacity to produce IFN γ .

In vivo impairment of cytotoxic capacities in mice challenged with IL4I1-expressing tumors

We next evaluated the *in vivo* impact of the decrease of anti-GP33 cytotoxic T cells induced by IL4I1. For this purpose, we monitored the elimination of CFSE-labeled GP33-loaded cells by specific CD8⁺ T cells *in vivo* (Figure 4A). Mice were vaccinated with GP33 and challenged seven days later with A1 or B11 cells. Ten days later, splenocytes pulsed either with an irrelevant peptide or GP33 were adoptively transferred in recipient mice. Lysis of GP33-pulsed target cells was observed from day 1 in the blood of all mice (Figure 4B). After day 2, this specific lysis was less important in mice challenged with B11 tumors in comparison to control animals. This difference was stable (15% on average) and significant from day 3 to day 8. A similar difference was observed in the spleen and lymph nodes (Figure 4C and 4D), indicating a slight defect of cytotoxic activity in mice challenged with IL4I1-expressing tumors. We also confirmed the impairment of the IFN γ response to GP33 and TRP2₁₈₀ in the spleen and draining lymph nodes of the B11 challenged mice (data not shown).

In conclusion, IL4I1 modulates *in vivo* the number of anti-tumor cytotoxic T cells and affects their IFN γ -secreting capacity.

Threshold of IL4I1 immune escape effect

In human tumors, the IL4I1-expressing cells are generally diluted in IL4I1 negative populations, even when tumor cells express the enzyme [21]. B11 cells display an IL4I1 activity close to the activity measured in Hodgkin cells and 60% lower than that of activated macrophages. To mimic a partial expression in the tumor, we diluted graded numbers of B11 cells in A1 cells before challenge, to obtain mixes of 0, 20, 50, 80 and 100 percent B11/A1.

Only 4% of the mice developed a tumor in the control group receiving 100% A1 cells, whereas tumors occurred in 68% of mice challenged with B11 tumors (Figure 5A). Most interestingly, mice challenged with tumors containing at least 20% B11 cells still developed tumors with a significantly higher frequency (25%) than the A1 control mice. The incidence of tumor development increased with the proportion of IL4I1-expressing cells. Enzymatic activities of the tumors developed in these experiments ranged from 34 ± 16 (20% B11) to 660 ± 178 (100% B11) pmoles $H_2O_2/h/100\mu g$ proteins and remained proportional to the amount of IL4I1-expressing cells injected (Figure 5B). Of importance, we also detected IL4I1 activity before tumor development in the sera of animals from all groups who had received IL4I1-expressing cells. These activities seemed to increase with the number of B11 cells injected (Figure 5C). Thus, IL4I1 expression in a small proportion of tumor cells is sufficient to drive tumor escape from the T cell response.

IL4I1 activity in human tumors

IL4I1 expression in the TAM infiltrate seems to be a constant of human tumors. In some cancers, IL4I1 is also often expressed in tumor cells, suggesting that depending on the tumor type, variable levels of IL4I1 activity may be present in the tumor bed. We

decided to analyze IL4I1 activity of human tumor types that either express IL4I1 exclusively in the TAM compartment – melanomas – or both in TAM and tumor cells – mesotheliomas – [21]. Four melanoma biopsies, with corresponding normal skin and seven mesotheliomas were evaluated (Figure 5D). In all melanoma cases, we measured an IL4I1 activity ranging from 15 to 29 pmoles of $H_2O_2/h/100\mu g$ of proteins, which significantly differed from the negligible activity detected in the normal skin. As expected, high IL4I1 activities were measured in all but one cases of mesothelioma (mean, 98; range, 16 to 261 pmoles $H_2O_2/h/100\mu g$ proteins). Activities of both melanomas and mesotheliomas were in the range of, or even higher than, those measured in murine tumors developed after injection of 20% B11 cells mixed in A1 cells.

DISCUSSION

We have previously shown that the IL4I1 enzyme, which presents immunosuppressive properties *in vitro*, is expressed in most tumors, by the TAM and/or the neoplastic cells [18, 21]. Here, we establish the role of IL4I1 expression in tumor escape from the immune system and demonstrate that IL4I1 induces a decrease of IFN γ -producing and cytotoxic anti-tumor CD8⁺ T cells *in vivo*. Moreover, partial IL4I1 expression in the tumor, at equivalent levels of those detected in human tumors, is sufficient to drive escape from the T cell response.

Despite expression of the highly antigenic GP33 epitope, B16GP33 tumors are very aggressive *in vivo*. In line with this, no tumor growth difference was observed in naïve mice between the IL4I1-expressing and IL4I1-negative clones. This indicates that the IL4I1-expressing clones do not intrinsically display increased proliferative potential. It also suggests that IL4I1 does not play a major inhibitory role on naïve T cells, in accordance with our previous results [18]. On the contrary, data obtained in mice vaccinated with GP33 prior to challenge, whether at the peak or at the memory phase of the response, implicate a major effect of IL4I1 on effector/memory antitumor T cells. Indeed, in mice challenged with IL4I1-expressing cells, the incidence of tumor appearance was significantly higher than in mice challenged with control cells. This resistance to immune rejection was not due to a loss of antigen presentation.

The IL4I1-expressing clones inhibited mouse T cell proliferation and IFN γ production *in vitro*, confirming results obtained in a human system [18, 20]. In line with this, we observed in mice receiving IL4I1-expressing cells, that (i) GP33-specific CD8⁺ T cells were dramatically less frequent, suggesting that their proliferation was affected *in vivo*; (ii) the ratio of IFN γ -producing over GP33-specific CD8⁺ T cells diminished, indicating that, as observed *in vitro*, the IFN γ -secreting capacity of antitumor T cells was independently

affected; (iii) the *in vivo* anti-GP33 cytotoxicity was impaired; (iv) the IFN γ response to both GP33 and the melanoma epitope TRP2₁₈₀ were diminished, implying that the antitumor T cell response may be globally depressed. In accordance with a global immune suppression, the allogeneic response of splenocytes from mice challenged with IL4I1-expressing tumors *in vivo* was diminished in comparison to splenocytes from control mice (supplementary figure 4A). Moreover, as previously observed with human lymphocytes, mouse splenocytes exposed to IL4I1 *in vivo* down-regulated the expression of the TCR CD3 ζ chain (supplementary figure 4B). This could explain their functional defects in proliferation and IFN γ production.

In a recent analysis of 315 biopsies from human malignancies, we detected frequent expression of IL4I1 *in situ* [21]. Indeed, IL4I1 was expressed in TAM from most of the tumors, particularly inflammatory tumors, and in neoplastic cells from several B cell lymphoma. IL4I1-positive tumor cells were also detected in some subtypes of non-lymphoid cancers, including mesothelioma. In follicular lymphoma, a high level of IL4I1 expression seemed associated with a better outcome, in the 23 cases studied. These results are in contradiction with data obtained in our mouse model. However, in the case of follicular lymphoma, tumor B cells depend on interactions with follicular T helper cells for survival [24], and the impact of IL4I1 expression might be directed to this T-cell population. In contrast, in non-lymphoid tumors, our data indicate that cytotoxic T cells are a major target population of IL4I1 activity. In support of this, Finak et al. identified IL4I1 mRNA expression in breast cancer as a poor outcome factor among a signature comprising 163 prognosis-predictive genes expressed in stromal cells [25]. Thus, depending on the tumor type, IL4I1 may affect different infiltrating lymphocyte populations with opposing consequences on tumor evolution.

The adoptive tumor model used here more closely reproduces IL4I1 expression in a non-lymphoid tumor. In our experimental settings, the minimal level of IL4I1 activity detected in tumors escaping immune control was in the range of activities detected in human melanomas, and on average 5 fold weaker than those measured in mesotheliomas, suggesting that the immunosuppressive effect of IL4I1 may be operative in human cancers. Melanomas express IL4I1 exclusively in the TAM compartment, while 50% of the mesotheliomas express IL4I1 both in the TAM and in the tumor cells [21], potentially due to the upregulation of the IL4I1-inducing STAT-1 and NF- κ B signalling pathways [20, 26, 27]

In this work, we thus show that IL4I1 is a *bona fide* immunosuppressive enzyme participating in the escape of malignancies *in vivo*. In contrast to the enzymes described so far, IL4I1 is secreted and can be detected in the serum of the animals before tumor appearance, explaining its systemic effect. By modulating the number and IFN γ -secreting potential of cytotoxic T cells, IL4I1 severely compromises anti-tumor functions of the host immune system and may contribute to progression of human tumors. These findings provide a scientific rationale to evaluate IL4I1 inhibitors as a way to improve the efficacy of antitumor immunotherapies.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines

B16GP33 cells expressing the immunodominant H2-D^b-restricted epitope GP33 of the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) glycoprotein were derived from parental B16.F10 murine melanoma cells as previously described [22]. B16GP33 were transfected with pcDNA4-TO-mIL4I1-mycHis or the same empty vector using Transfast (Promega) and were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 10 µg/ml streptomycin, non essential amino-acids, 200 µg/ml neomycin and 300 µg/ml zeocine at 37°C in 5% CO₂. All the reagents used were from Invitrogen.

Plasmids

Mouse IL4I1 cDNA was generated as previously described [18] and cloned into the EcoRI and NotI sites of pcDNA4-TO-mycHis plasmid (Invitrogen).

Peptides

GP33 (KAVYNFATM) and the control influenza virus nucleoprotein H2-D^b-restricted peptide NP50 (SDYEGRLI) were from Polypeptide group. The tyrosinase peptide TRP2₁₈₀ (SVYDFFVWL) was a gift from EMC microcollections.

Immunologic detection of IL4I1

Cells lysis and Western blot were realized as described by Boulland et al. [18]. The tagged mIL4I1 protein was revealed with an anti-myc antibody (clone 9E10, Sigma-Aldrich). The actin protein was detected using a mouse anti-actin mAb (clone C4, Millipore).

Immunohistochemistry was performed as described in [21]. For immunofluorescence, after seeding onto poly-L-lysine coated coverslips, cells were fixed with 3% paraformaldehyde and stained with a polyclonal anti-myc antibody (Cell Signaling). Revelation was performed using an Alexa fluor 488-coupled anti-rabbit IgG (Invitrogen). Photograph acquisition was performed with a Hamamatsu C8484 digital camera and Fluovision IMSTAR software.

IL4I1 enzymatic activity assay

Cell line lysates and mIL4I1 purification from the culture medium on nickel beads were performed as previously described by [18]. Tumors were collected in PBS containing Complete mini® protease inhibitors (Roche, France) and frozen at -80°C until use. After thawing, 100 mg of tumor resuspended in 500 µl PBS containing Complete mini® were homogenized by shaking with stainless steel beads in a Qiagen TissueLyser (Qiagen, Courtaboeuf, France) for 2 cycles of 2 min at 20 Hz. Lysates were centrifuged 10 min at 10000g and whole cell supernatants collected. All samples were tested for phenylalanine oxidative activity according to [21]. Activities are expressed as pMoles H₂O₂ produced per hour by 10⁵ cells, 100 µg proteins, 40 µl bead suspension or 100 µl mouse serum as stated in the figure legends. Permission to use human samples was given by CPP Ile de France IX.

Mice

P14 transgenic mice (line 318) were purchased from TAAM (France). Fifty to 60% of P14 CD8⁺ T cells express a Vα2/Vβ8 TCR specific for the LCMV-derived GP33 peptide in association with the H-2D^b molecule [28]. Naïve C57BL/6 mice (6 to 10 weeks old, Charles River) were injected s.c. with 10³ tumor cells or vaccinated s.c. with 50 µg of GP33 in Incomplete Freund's Adjuvant (IFA, Sigma-Aldrich) then challenged s.c. 7 or 28

days later into the controlateral flank with 10^5 tumor cells. Tumor size was evaluated twice a week with a caliper and calculated as the product of bisecting tumor diameters. Mice bearing a tumor with a diameter >15 mm were sacrificed according to animal care regulations.

In the adoptive transfer protocols, 2×10^6 splenocytes from P14 mice were injected i.v. *via* the retro-orbital sinus. Two days later, C57BL/6 mice were immunized as above, then challenged s.c. 14 days later with 10^7 tumor cells.

For CFSE assays, 10^7 tumor cells were injected s.c. seven days after GP33 vaccination. Ten days after tumor challenge, mice received an intravenous injection of a half-mix of $3 \cdot 10^7$ splenocytes loaded with GP33 and with NP50 and labeled respectively with 1 μM and 0.1 μM of the fluorescent dye 5-6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE, Molecular Probes). CFSE⁺ donor cells in blood, spleen and lymph nodes were determined by flow cytometry. GP33-specific donor cell rejection was calculated using the formula: $100 - [(\% \text{ of CFSE}^{\text{high}} \text{ cells} / \% \text{ of CFSE}^{\text{low}} \text{ cells}) \times 100]$.

All experiments were performed in compliance with the French Ministry of Agriculture regulations for animal experimentation (laboratory accreditation C 94-028-31, authorization 94-308 for VMF).

Flow cytometry

For blood T-cells analysis, GP33-specific CD8⁺ lymphocytes were labelled with H2-D^b-GP33 tetramers coupled to phycoerythrin, an anti-CD8 antibody (clone KT15, fluorescein-coupled) and an anti-CD44 antibody (clone KM201, APC-coupled). All reagents were from Beckman-Coulter. After red blood cell lysis using iTAg MHC tetramer lysis reagent, the cells were fixed with 1% paraformaldehyde before flow cytometry analysis. For surface CD107a labelling, heparinised blood was incubated with GP33 tetramers and an anti-

CD107a antibody (clone 1D4B, APC-coupled) before a 5-hour culture at 37°C. Two μM monensin was added one hour after beginning the stimulation. CD8 labelling, red blood cell lysis and cell fixation were then performed as above. At least 50,000 events were acquired on a Cyan flow cytometer (Beckman-Coulter) and data were analyzed using the Summit 4 software (DAKO-Cytomation).

ELISpot-IFN γ

The ELISpot-IFN γ assay was performed according to Mabtech's instructions except for the revelation. Spots were revealed by adding, successively, alkaline-phosphatase-labeled ExtrAvidin and BCPI/NBT substrate (Sigma-Aldrich) and counted with a transmitted-light stereomicroscope using image-analyzing software connected to a camera (KS ELISPOT system; Carl Zeiss Vision).

In Fig. 1C, culture medium was replaced by 3-days conditioned medium obtained from 10^6 tumor cells/ml. Results are expressed as the number of spots per 5×10^5 cells after subtraction of the background obtained with the irrelevant peptide. The percentage of IFN γ -secreting T cells among total GP33-specific T cells was calculated as follows: % IFN γ^+ CD8 $^+$ / % H2-D b -GP33 tetramer $^+$ CD8 $^+$ T-cells.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Hanspeter Pircher for the B16GP33 cell line and for relevant comments on the work. We thank William Hempel for critical reading of the manuscript.

Grants support: ARC subvention fixe 4883 (FC) and the French association for therapeutic, genetic and immunologic research on lymphoma (ARTGIL) granted by Roche and Amgen (CC). We thank Chrystelle Guiter, Sophia Balustre, Mathieu Surénaud, Franck Delafond and the cytometry platform for help in this work.

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

REFERENCES

- 1 **Gabrilovich, D. I. and Nagaraj, S.,** Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009. **9**: 162-174.
- 2 **Gordon, S. and Martinez, F. O.,** Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 2010. **32**: 593-604.
- 3 **Marigo, I., Dolcetti, L., Serafini, P., Zanovello, P. and Bronte, V.,** Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunol Rev* 2008. **222**: 162-179.
- 4 **Nishikawa, H. and Sakaguchi, S.,** Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer* 2010. **127**: 759-767.
- 5 **Youn, J. I. and Gabrilovich, D. I.,** The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur J Immunol* 2010. **40**: 2969-2975.
- 6 **Munn, D. H. and Mellor, A. L.,** Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest* 2007. **117**: 1147-1154.
- 7 **Munder, M.,** Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol* 2009. **158**: 638-651.
- 8 **Bogdan, C.,** Regulation of lymphocytes by nitric oxide. *Methods Mol Biol* 2011. **677**: 375-393.
- 9 **Grohmann, U. and Bronte, V.,** Control of immune response by amino acid metabolism. *Immunol Rev* 2010. **236**: 243-264.
- 10 **Johansson, C. C., Egyhazi, S., Masucci, G., Harlin, H., Mougiakakos, D., Poschke, I., Nilsson, B., Garberg, L., Tuominen, R., Linden, D., Stolt, M. F., Hansson, J. and Kiessling, R.,** Prognostic significance of tumor iNOS and COX-2 in stage III malignant cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2009. **58**: 1085-1094.
- 11 **Johansson, C. C., Mougiakakos, D., Trocme, E., All-Ericsson, C., Economou, M. A., Larsson, O., Seregard, S. and Kiessling, R.,** Expression and prognostic significance of iNOS in uveal melanoma. *Int J Cancer* 2010. **126**:2682-2689.
- 12 **Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T. and Van den Eynde, B. J.,** Evidence for a tumoral immune resistance

- mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 2003. **9**: 1269-1274.
- 13 **Munn, D. H., Shafizadeh, E., Attwood, J. T., Bondarev, I., Pashine, A. and Mellor, A. L.**, Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* 1999. **189**: 1363-1372.
 - 14 **Rodriguez, P. C., Zea, A. H., DeSalvo, J., Culotta, K. S., Zabaleta, J., Quiceno, D. G., Ochoa, J. B. and Ochoa, A. C.**, L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. *J Immunol* 2003. **171**: 1232-1239.
 - 15 **Taheri, F., Ochoa, J. B., Faghiri, Z., Culotta, K., Park, H. J., Lan, M. S., Zea, A. H. and Ochoa, A. C.**, L-Arginine regulates the expression of the T-cell receptor zeta chain (CD3zeta) in Jurkat cells. *Clin Cancer Res* 2001. **7**: 958s-965s.
 - 16 **Friberg, M., Jennings, R., Alsarraj, M., Dessureault, S., Cantor, A., Extermann, M., Mellor, A. L., Munn, D. H. and Antonia, S. J.**, Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *Int J Cancer* 2002. **101**: 151-155.
 - 17 **Chu, C. C. and Paul, W. E.**, Fig1, an interleukin 4-induced mouse B cell gene isolated by cDNA representational difference analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997. **94**: 2507-2512.
 - 18 **Boulland, M. L., Marquet, J., Molinier-Frenkel, V., Moller, P., Guiter, C., Lasoudris, F., Copie-Bergman, C., Baia, M., Gaulard, P., Leroy, K. and Castellano, F.**, Human IL411 is a secreted L-phenylalanine oxidase expressed by mature dendritic cells that inhibits T-lymphocyte proliferation. *Blood* 2007. **110**: 220-227.
 - 19 **Chavan, S. S., Tian, W., Hsueh, K., Jawaheer, D., Gregersen, P. K. and Chu, C. C.**, Characterization of the human homolog of the IL-4 induced gene-1 (Fig1). *Biochim Biophys Acta* 2002. **1576**: 70-80.
 - 20 **Marquet, J., Lasoudris, F., Cousin, C., Puiffe, M., Martin-Garcia, N., Baud, V., Chéreau, F., Farcet, J., Molinier-Frenkel, V. and Castellano, F.**, Dichotomy between factors inducing the immunosuppressive enzyme IL411 in B lymphocytes and mononuclear phagocytes. *European Journal of Immunology* 2010. **40**:2557-2568.
 - 21 **Carbonnelle-Puscian, A., Copie-Bergman, C., Baia, M., Martin-Garcia, N., Allory, Y., Haioun, C., Cremades, A., Abd-Alsamad, I., Farcet, J. P., Gaulard,**

- P., Castellano, F. and Molinier-Frenkel, V.,** The novel immunosuppressive enzyme IL411 is expressed by neoplastic cells of several B-cell lymphomas and by tumor-associated macrophages. *Leukemia* 2009. **23**: 952-960.
- 22 Prevost-Blondel, A., Zimmermann, C., Stemmer, C., Kulmburg, P., Rosenthal, F. M. and Pircher, H.,** Tumor-infiltrating lymphocytes exhibiting high ex vivo cytolytic activity fail to prevent murine melanoma tumor growth in vivo. *J Immunol* 1998. **161**: 2187-2194.
- 23 Zimmermann, C., Prevost-Blondel, A., Blaser, C. and Pircher, H.,** Kinetics of the response of naive and memory CD8 T cells to antigen: similarities and differences. *Eur J Immunol* 1999. **29**: 284-290.
- 24 Roulland, S., Suarez, F., Hermine, O. and Nadel, B.,** Pathophysiological aspects of memory B-cell development. *Trends Immunol* 2008. **29**: 25-33.
- 25 Finak, G., Bertos, N., Pepin, F., Sadekova, S., Souleimanova, M., Zhao, H., Chen, H., Omeroglu, G., Meterissian, S., Omeroglu, A., Hallett, M. and Park, M.,** Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* 2008. **14**: 518-527.
- 26 Janssen, Y. M., Barchowsky, A., Treadwell, M., Driscoll, K. E. and Mossman, B. T.,** Asbestos induces nuclear factor kappa B (NF-kappa B) DNA-binding activity and NF-kappa B-dependent gene expression in tracheal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995. **92**: 8458-8462.
- 27 Kothmaier, H., Quehenberger, F., Halbwedl, I., Morbini, P., Demirag, F., Zeren, H., Comin, C. E., Murer, B., Cagle, P. T., Attanoos, R., Gibbs, A. R., Galateau-Salle, F. and Popper, H. H.,** EGFR and PDGFR differentially promote growth in malignant epithelioid mesothelioma of short and long term survivors. *Thorax* 2008. **63**: 345-351.
- 28 Pircher, H., Burki, K., Lang, R., Hengartner, H. and Zinkernagel, R. M.,** Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature* 1989. **342**: 559-561.

FIGURE LEGENDS

Figure 1- Characterization of IL4I1-expressing B16GP33 clones

(A) Culture medium and whole cell lysate proteins from B16GP33 cells either transfected with an empty vector (A1) or with a vector coding for the myc-tagged murine IL4I1 protein (B8 and B11) were analyzed by Western blot (**upper panel**). IL4I1 was revealed by immunofluorescence (**lower panel**). Magnification x400, scale bar = 100 μm . (B) ELISpot-IFN γ of anti-GP33 effectors against B16-derived cells. Splenocytes from GP33-vaccinated mice were cultured 24h with tumor cells, then the number of IFN- γ -producing cells was measured (mean from three experiments \pm SD). (C) *Ex-vivo* ELISpot-IFN γ in tumor cell conditioned medium. Three-day conditioned media from 10^6 cells/ml tumor clones were used as culture medium for freshly isolated splenocytes from GP33-vaccinated mice. The number of IFN- γ -producing cells was measured after a 24h-incubation with GP33 (mean from six experiments \pm SD; A1 vs B11, $*p=0.020$ p value of Mann-Whitney test).

Figure 2- Resistance to immune rejection of IL4I1-expressing tumors.

(A and B) 10^3 tumor cells were injected s.c. into the left flank of naïve C57BL/6 mice ($n = 10$ mice/group, representative experiment out of 2). (A) The survival without tumor and (B) tumor growth were evaluated twice a week during forty days after challenge. (C and D) Mice were vaccinated s.c. with GP33. (C) Seven or (D) 28 days later, 10^5 tumor cells were injected s.c. into the controlateral flank. (C) Representative experiment out of 5 with $n = 10$ mice/group and (D) representative experiment out of 3 with $n = 14$ mice/group. Curve comparison was performed using the Log-Rank test, A1 \bullet ; B8 \triangle ; B11 \square . (C); B8 vs B11, NS. $*p=0.012$; $**p=0.004$ (D) A1 vs B8 or vs B11, $*p = 0.049$. (E) IL4I1 immunostaining on tumor sections. Slices from formalin-fixed paraffin-embedded A1, B8

and B11 tumors were stained with an anti-IL4I1 antibody. Magnification x400, scale bar = 100 μm ; inset magnification x630, scale bar = 50 μm .

Figure 3- Mechanisms of IL4I1-induced immune escape

(A) Schematic representation of the experimental protocol. Naïve mice (2 to 5 mice per group) were immunized against GP33 s.c. on day 0, two days after adoptive transfer of P14 splenocytes. At day 14, mice were challenged with tumor cells and blood was taken three times a week for anti-GP33 immunomonitoring. Mice were sacrificed between day 25 and 28 for anti-tumor T-cells analyses in the spleen. (B and C) The percentage of circulating GP33-specific T-cells was measured using H2-D^b-GP33 tetramers. A representative experiment out of 4 is shown with dot plots from one mouse per group (A1 ●, B8 Δ , B11 \square ; $p= 0.038$ A1 vs B8, $p= 0.029$ A1 vs B11, Mann-Whitney test. (D) Percentage of IFN γ -secreting (left panel histogram), cytotoxic (CD107a⁺ after *in vitro* stimulation, central panel histogram) and effector/memory (CD44⁺, right panel histogram) T-cells among the GP33-specific splenic CD8⁺ T-cells (\square), mean \pm SD of two experiments, * $p = 0.033$, Mann-Whitney test. (E) *Ex-vivo* ELISpot anti-IFN γ response of the same mice 11 or 14 days after challenge. Freshly isolated spleen cells of GP33-vaccinated and A1, B8 or B11 challenged mice were cultured with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GP33 (left panel) or 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TRP2₁₈₀ (right panel). Results were expressed as IFN γ -producing cells/ 5×10^5 splenocytes (mean from four experiments \pm SD, * $p < 0.030$, Mann-Whitney test).

Figure 4- Cytotoxicity inhibition of GP33 specific T cells in IL4I1-challenged mice.

(A) Schematic representation of the experimental protocol. Naïve mice were immunized against GP33 s.c. and challenged 7 days later with A1 (●) or B11 (\square) tumor cells. Ten

days later (day 0), splenocytes from syngeneic naive mice were loaded with GP33 or irrelevant peptide NP50 and labeled with a high and low dose of CFSE, respectively. A mix of 1:1 GP33- and NP50-loaded splenocytes was then adoptively transferred. Blood was taken from day 0 to day 4 and at day 8 after transfer. Mice were sacrificed at day 8 for analysis in the spleen and draining lymph nodes. **(B, C and D)** The percentage of residual GP33- and NP50-loaded cells was measured by FACS. The rejection level is expressed as the percentage of specific lysis of GP33-loaded target cells in **(B)** the blood, **(C)** spleen and **(D)** lymph nodes. $*p < 0.03$, Mann-Whitney test.

Figure 5- Threshold of immune escape effect.

(A) Mice were vaccinated s.c. with GP33. Seven days later, graded doses of 0 (●), 20 (□), 50 (▲), 80 (▼) and 100 (■) percent of clone B11 admixed to clone A1 were injected s.c. into the controlateral flank. Cumulative results from three experiments with 5 to 8 mice per group are shown ($*p < 0.05$; $***p < 5 \times 10^{-4}$, Mann-Whitney test). **(B)** IL411 activity of the tumors developed in A. Results are expressed as pmoles $\text{H}_2\text{O}_2/\text{h}/100\mu\text{g}$ proteins. Statistics compare activities of each group to A1 100% ($**p < 0.006$; $***p = 10^{-4}$, unpaired t-test). **(C)** IL411 activity of sera obtained before tumor development (between day 30 and 55). Results are expressed as pmoles $\text{H}_2\text{O}_2/\text{h}/100\mu\text{l}$ serum. **(D)** IL411 activity on frozen tumor samples from 4 melanomas with corresponding normal skin and 7 mesotheliomas. Results are expressed as pmoles $\text{H}_2\text{O}_2/\text{h}/100\mu\text{g}$ proteins ($*p < 0.05$; $**p < 0.007$, Mann-Whitney test).

Table I: IL4I1 enzymatic activity in B16GP33-derived cell clones and tumor biopsies

Sample	Sample name	ADNc	IL4I1 activity (pmoles H ₂ O ₂ /h)		
			Cells		Medium
			per 10 ⁵ cells	per 100µg proteins	per 40µl beads
Cell clones	B16GP33	-	0 (0) ^a	0 (0)	ND ^b
	A1	mock	0 (2.5)	0 (8)	3 (0.3)
	B8	IL4I1	234 (60)	317 (75)	295 (11)
	B11	IL4I1	322 (49)	330 (86)	489 (18)
Tumor biopsies	A1	mock	NA ^c	5 (1)	NA
	B8	IL4I1	NA	722 (533)	NA
	B11	IL4I1	NA	913 (515)	NA

^a mean from 4 to 5 measurements (SD)

^b Not Done

^c Not Available

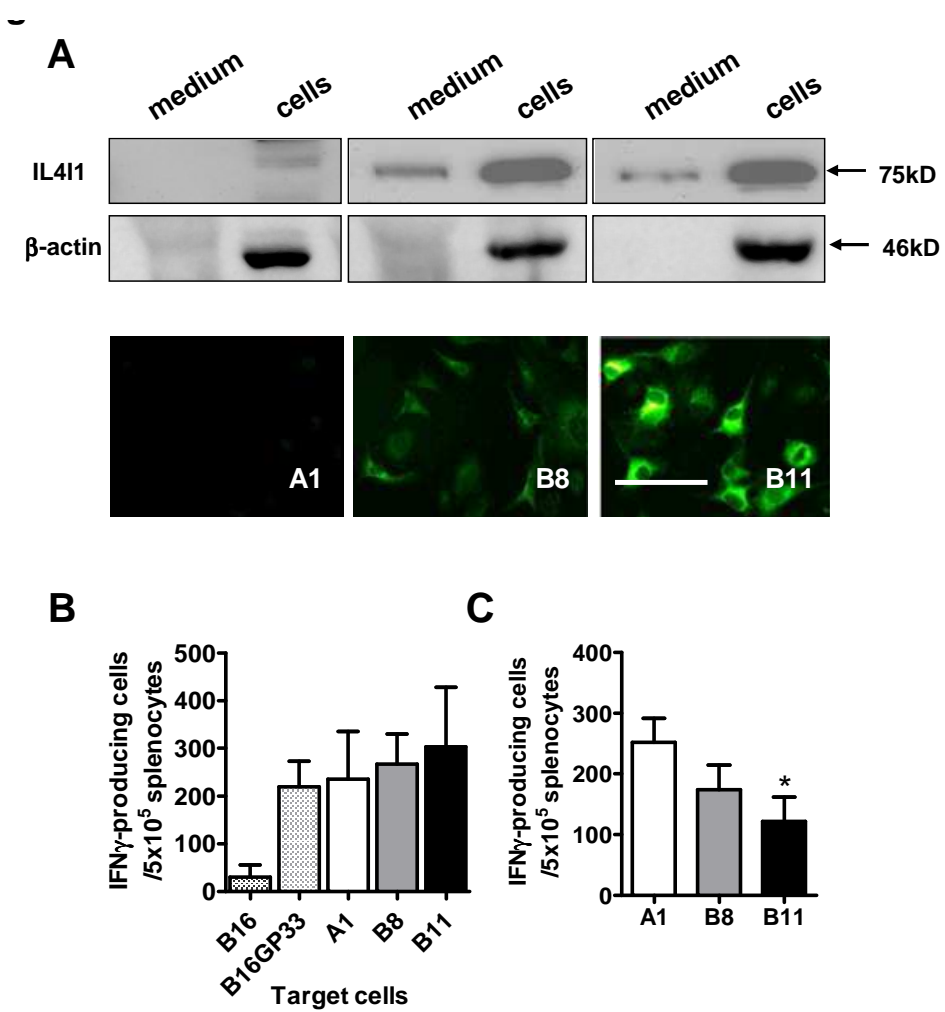


Figure 1

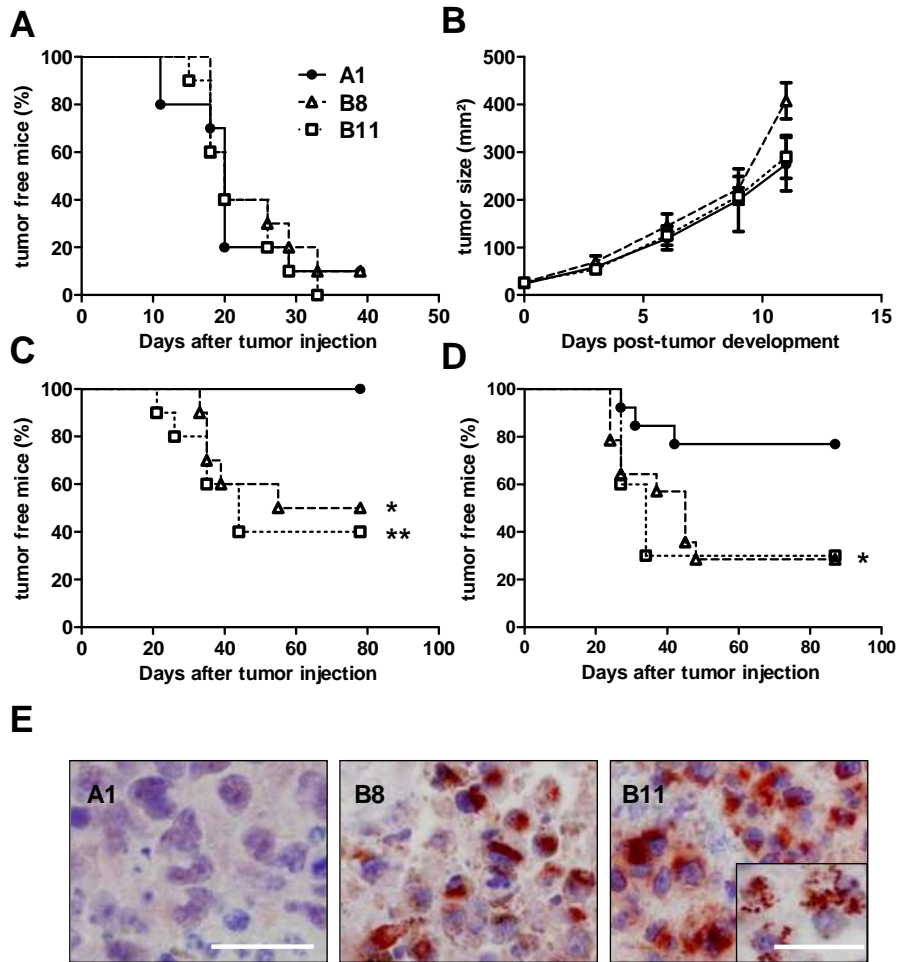


Figure 2

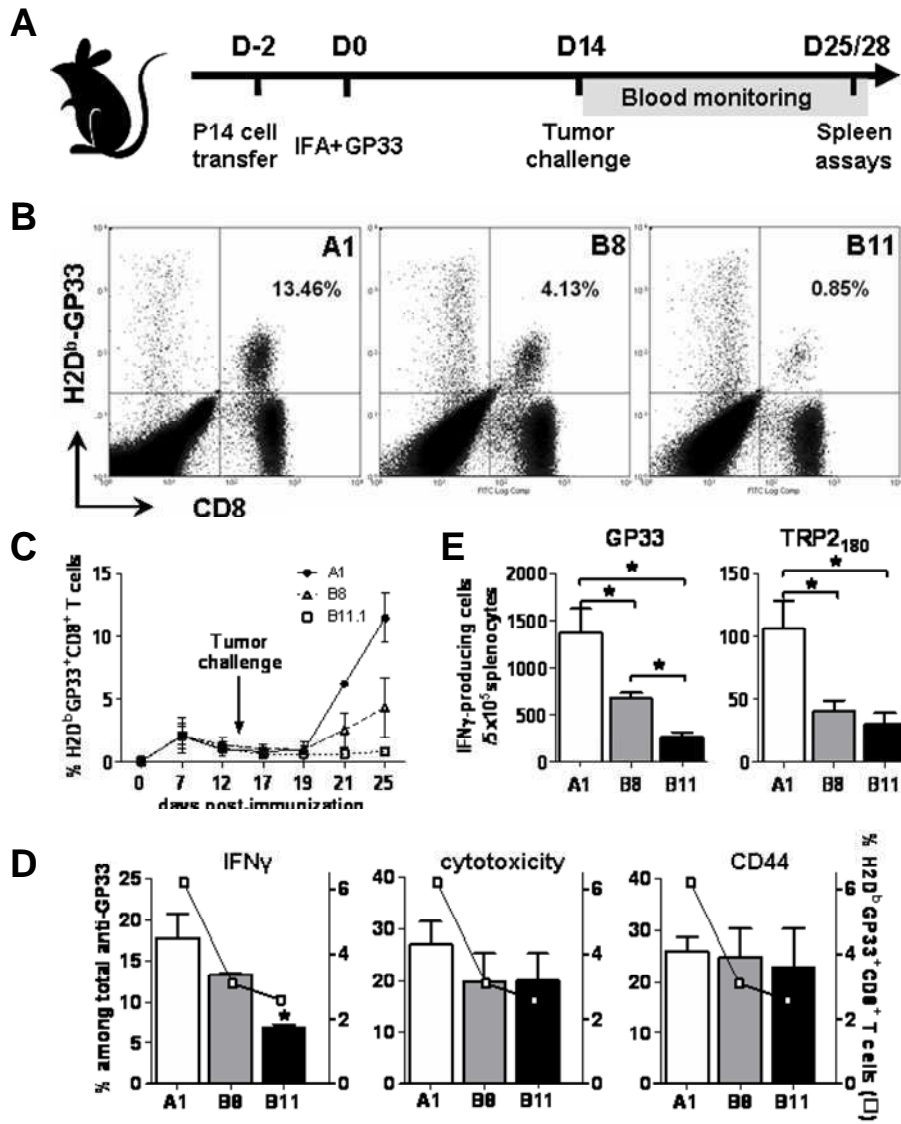


Figure 3

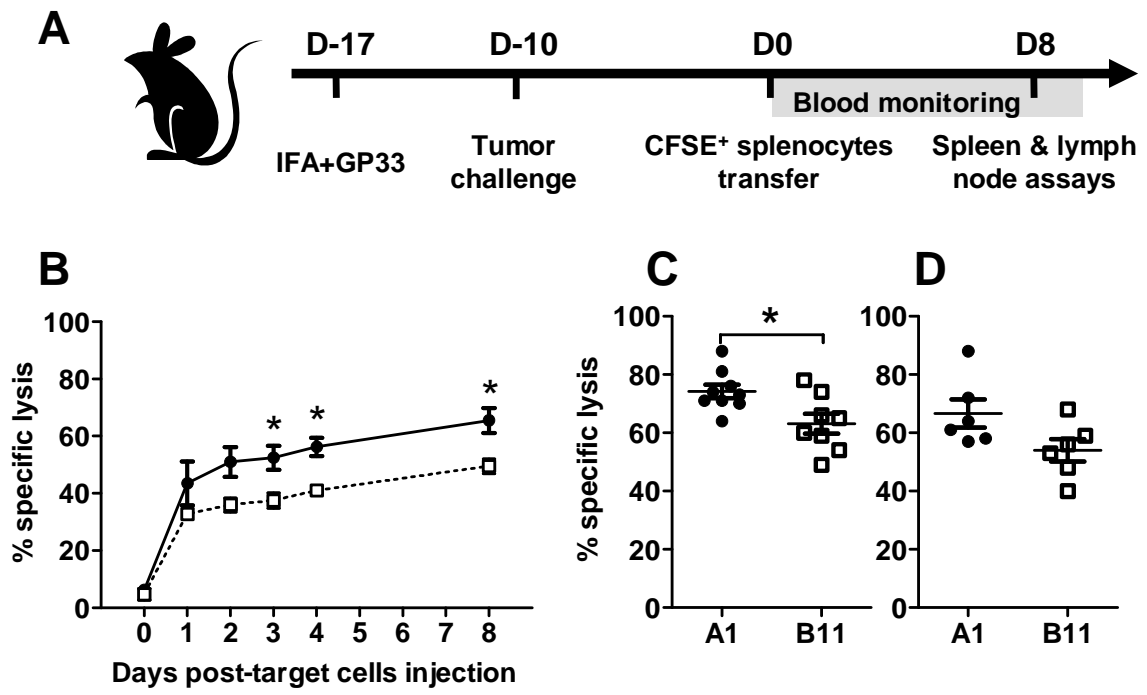


Figure 4

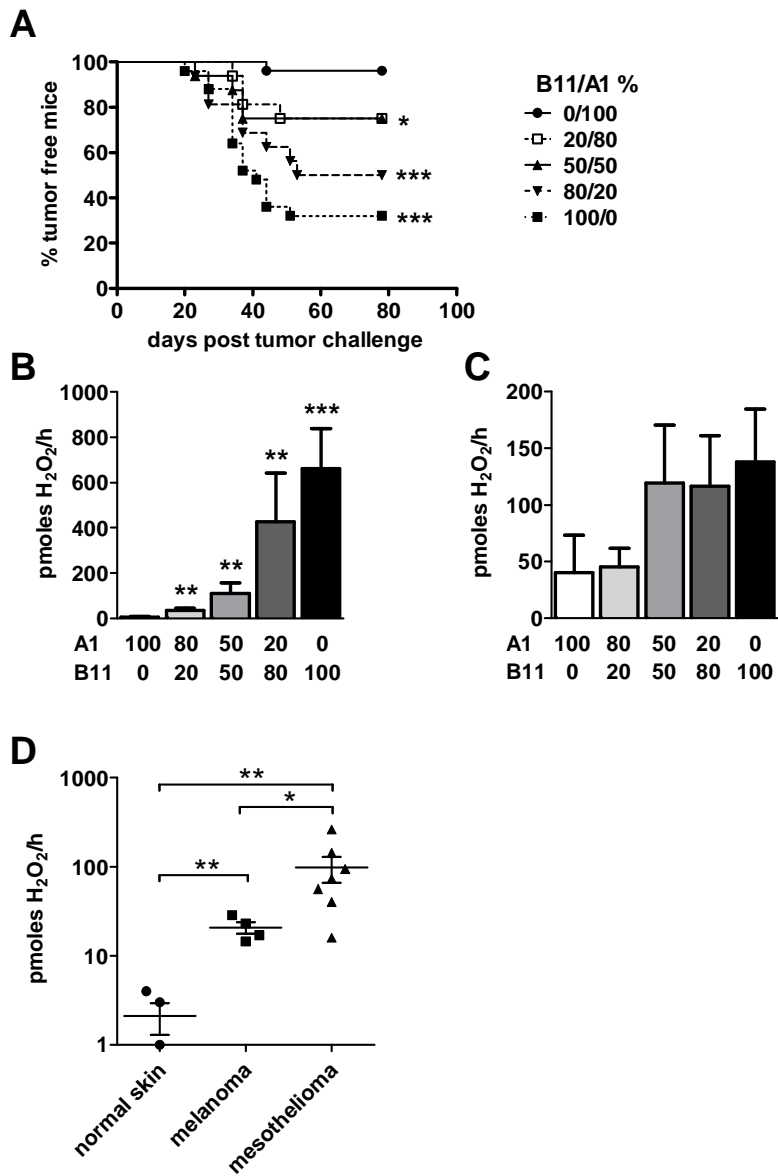


Figure 5

B. Valeur pronostique d'IL4I1

Brevet 1 : Dépôt de Brevet pour l'utilisation d'IL4I1 dans le traitement ou le pronostic du cancer

Methods for the treatment and the prognosis of cancer.

Valérie MOLINIER-FRENKEL , Fanette LASOUDRIS et Flavia CASTELLANO

Brevet International publié le 17 juin 2010 sous le n° WO 2010/066858 (cf annexe)

L'ensemble des résultats obtenus durant ma thèse ainsi que d'autres résultats du laboratoire ont fait l'objet d'un dépôt de brevet ayant pour objet l'utilisation d'IL4I1 comme marqueur de pronostic et de ses inhibiteurs à des fins de traitement chez les patients atteints de cancer.

Le brevet reprend les principaux résultats du laboratoire. Dans une étude menée sur 315 biopsies représentatives de plus de trente types de tumeurs humaines, l'expression d'IL4I1 a été détectée dans la plupart des cas observés. Dans les tumeurs non lymphoïdes, IL4I1 était exprimée par la cellule tumorale dans moins de 10% des cas analysés, incluant essentiellement des mésothéliomes et quelques cas d'adénocarcinomes du poumon et de carcinomes du colon. Dans les mésothéliomes, plus de 50% des cellules tumorales exprimaient IL4I1. Dans tous les types de tumeurs, IL4I1 était généralement retrouvée au niveau des cellules du microenvironnement tumoral, plus particulièrement dans les TAM.

L'expression d'IL4I1 était également détectée dans les cellules tumorales et/ou dans le microenvironnement de nombreux types de lymphome B, incluant le lymphome folliculaire, le lymphome de Hodgkin classique et à prédominance lymphocytaire, les centres prolifératifs de leucémie lymphoïde chronique et le lymphome B primitif du médiastin.

Une étude préliminaire de 23 patients atteints de lymphome folliculaire a permis de mettre en évidence un rôle potentiellement pronostique d'IL4I1 dans ce type de lymphome. Chez les patients avec une forte expression intratumorale d'IL4I1 au diagnostic, l'envahissement médullaire était plus rare et le taux de rechute plus faible, suggérant un

meilleur pronostic. Ces résultats sont en contradiction avec le modèle murin (article 2) dans lequel l'expression intratumorale d'IL4I1 avait un impact défavorable sur la réponse antitumorale et l'incidence des tumeurs après vaccination. Or, dans le cas du lymphome folliculaire, la cellule tumorale B dépend de façon critique pour sa croissance, des interactions avec les lymphocytes T folliculaires auxiliaires (T_{FH}). [Roulland et al. 2008] L'expression d'IL4I1 pourrait donc, paradoxalement, priver la cellule tumorale d'un élément essentiel à sa survie, en limitant la prolifération et l'activation de la population des T_{FH} . Au contraire, dans les tumeurs non lymphoïdes, la population cible de l'activité d'IL4I1 semble représentée par les lymphocytes T cytotoxiques antitumoraux, dont la perte favorise la croissance tumorale.

Il ressort de ces résultats, dans les deux cas, qu'IL4I1 pourrait constituer un marqueur biologique de stratification pronostique des patients atteints de cancer. De plus, l'inhibition de l'activité IL4I1 pourrait constituer une voie prometteuse comme traitement adjuvant à des thérapies conventionnelles de cancers exprimant IL4I1, à l'exception des lymphomes folliculaires. Dans ce brevet, nous montrons l'activité de différents inhibiteurs de l'activité enzymatique d'IL4I1 : l'esther éthylique de la L-phénylalanine, la N-acétyl-phénylalanine et la 2'-aza-phénylalanine. Le brevet couvre également toute autre modification de la phénylalanine ainsi que différentes autres stratégies inhibitrices (anticorps neutralisant l'enzyme, ARN inhibiteurs). Par exemple, nous avons testé l'inhibition de l'activité IL4I1 produite naturellement par la lignée de lymphome de Hodgkin L428 avec un ARN de synthèse (siRNA) spécifique d'IL4I1.



Europäisches
Patentamt
European
Patent Office
Office européen
des brevets

European Patent Office
80298 MUNICH
GERMANY
Tel. +49 (0)89 2399 - 0
Fax +49 (0)89 2399 - 4465



Lasoudris, Fanette
U955 INSERM
Hôpital Henri Mondor
51 av du Marechal de Lattre de Tassigny
94010 Creteil
FRANCE

For any questions about
this communication:
Tel. +31 (0)70 340 45 00

Date
22.12.09

Reference	Application No./Patent No. 06305006.9 - 2123
Applicant/Proprietor INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale)	

Designation as inventor - communication under Rule 19(3) EPC

You have been designated as inventor in the above-mentioned European patent application. Below you will find the data contained in the designation of inventor and further data mentioned in Rule 143(1) EPC:

DATE OF FILING : 10.12.08
 PRIORITY : //
 TITLE : Methods for the treatment and the prognosis of cancer
 DESIGNATED STATES : AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR

INVENTOR (PUBLISHED = 1, NOT PUBLISHED = 0):

1/Molinier-Frenkel, Valérie/U955 INSERM Hôpital Henri Mondor 51 av du Marechal de Lattre de Tassigny/94010 Creteil/FR
 1/Lasoudris, Fanette/U955 INSERM Hôpital Henri Mondor 51 av du Marechal de Lattre de Tassigny/94010 Creteil/FR
 1/Castellano, Flavia/U955 INSERM Hôpital Henri Mondor 51 av du Marechal de Lattre de Tassigny/94010 Creteil/FR

DECLARATION UNDER ARTICLE 81 EPC:

The applicant(s) has (have) acquired the right to the European patent as employer(s).

Receiving Section



III-ETUDE STRUCTURE/FONCTION DE LA PROTEINE IL4I1

A. Introduction

La protéine IL4I1 murine est constituée d'un peptide signal N-terminal (acides aminés 1 à 21) lui permettant d'être sécrétée, d'un large domaine central fortement homologue à un domaine LAAO et d'une partie C-terminale de fonction inconnue et très divergente entre les enzymes humaine et murine [Chu et al. 1997; Chavan et al. 2002; Boulland et al. 2007]. IL4I1 oxyde la phénylalanine pour produire du phénylpyruvate, de l'ammoniac et de l' H_2O_2 . IL4I1 présente un effet immunosuppresseur *in vitro* associé à son activité enzymatique et *in vivo* dans un modèle murin de cancer par un mécanisme qui reste à définir. En effet, IL4I1, parce qu'elle est sécrétée, pourrait également agir en se liant à un récepteur de surface exprimé par des cellules immunes ou non immunes, comme cela a été observé pour l'ectoenzyme « Vascular adhesion protein-1 » (VAP-1) qui présente une activité amine oxydase sensible au semicarbazide [Jalkanen et al. 2008]. Afin de déterminer le rôle respectif de la sécrétion et de l'activité enzymatique dans l'effet protumoral d'IL4I1 chez la souris, nous avons souhaité construire des mutants dépourvus de l'une ou l'autre de ces propriétés.

L'IL4I1 murine présente 37% d'identité avec l'apoxine I du venin de *Crotalus atrox* (serpent à sonnettes) et d'une façon générale, il existe une très forte homologie des domaines LAAO entre les différentes espèces [Chavan et al. 2002; Hughes]. Les études en cristallographie de la LAAO du serpent *C.rhodostoma* associée ou non à son substrat phénylalanine et à son cofacteur FAD ont permis de caractériser la structure tridimensionnelle de cette famille d'enzyme, identifiant plusieurs acides aminés potentiellement impliqués dans l'activité enzymatique [Pawelek et al. 2000; Moustafa et al. 2006]. Nous nous sommes basés sur ces travaux pour identifier dans la séquence d'IL4I1 les acides aminés pouvant interagir avec le cofacteur FAD ou s'associer au substrat phénylalanine. Ainsi, chez le serpent, l'acide glutamique E457 a été impliqué dans la liaison au cofacteur FAD, l'arginine R90 dans la liaison à la phénylalanine et l'histidine H223 a été associée à l'ouverture du canal contrôlant l'entrée de l' O_2 et de la phénylalanine dans le site catalytique ainsi que la sortie de l' H_2O_2 . Les acides aminés homologues dans la séquence d'IL4I1 murine ont été sélectionnés pour la mutagenèse

dirigée. Ces acides aminés sont R129, H249 et E478, respectivement homologues à R90, H223 et E457 dans la séquence LAAO de *C. rhodostoma*. Chez l'homme, nous avons précédemment montré que la mutagenèse de l'acide glutamique E481 (homologue à E457 chez le serpent) en alanine permettait de produire une protéine IL4I1 plus faiblement sécrétée, mais surtout présentant une très faible activité IL4I1 [Boulland et al. 2007]. L'élimination de la séquence codant le peptide signal a été choisie comme stratégie pour obtenir une protéine active mais non sécrétée.

B. Matériels et méthodes

1. Mutagenèse dirigée de la protéine IL4I1.

Les mutants DeltaPS, E478A, H249A, R129A+E478A et R129A sont générés à partir du plasmide pcDNA4-TO-mycHis-mIL4I1-WT contenant une séquence codante la résistance à l'ampicilline et une à la zéocine. La mutagenèse dirigée est réalisée en utilisant le kit Gentailor Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen) selon le protocole du fabricant avec les amorces suivantes : E478A 5'-CGC-ATTTACTTCGCGGGCGCGCACACAG-CTCTC-3' et 5'-GCCCCGCGAAGTAAATGCGGC-CGAAGGGGGCTGA-3, H249A 5'-GCAGAAGCCTT-ACGTGCGGCC-GCCTGCCTGAGC-3' et 5'-CGCACGTAAGGCTTCTGCAAAGCTG-AGGTA-3', et R129A 5'-GCAGATAAC-AGGATTGGGGGCGCTATCTTCACT-3' et 5'-GCCCCCAATCCTGTTATCTGCCTCCAG-GAT-3' Le mutant R129A/E478A a été réalisé grâce aux amorces : R129A 5'-GCAGATAACAGGATTGGG-GGCGCTATCTTCACT-3' et 5'-GCCCCCAATCCTGTTATCTGCCTCCAGGAT-3 à partir du plasmide muté pcDNA4-TO-mycHis-mIL4I1-E478A.

Pour le mutant de sécrétion (DeltaPS), la séquence codante d'IL4I1 murine est amplifiée par PCR en utilisant des amorces d'amplification contenant les sites de restriction pour EcoRI en 5' et Not I en 3' nous permettant d'insérer l'ADNc amplifié dans le vecteur pcDNA4-TO mycHis (codant pour une étiquette myc et une queue de 6 histidine) digéré par les mêmes enzymes de restriction. Les amorces utilisées sont les suivantes : DeltaPS 5'-CGACGTGGAATTCTGATGC-TGGACTGGAAGGCA-GCCTCCAGCTTGAAC-3' et 5'-CTTGACTGCGGCCGCGGAG-TGGTCCCCCACTCGGTGCAT-3'. Tous les réactifs de biologie moléculaire sont achetés chez Invitrogen.

2. Transformation bactérienne.

Des bactéries DH5 α -T1^r sont transformées avec les plasmides mutés selon le protocole du kit Gentailor Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen). Les bactéries sont ensuite étalées sur boîte de Pétri de milieu Luria-Bertani (LB) agar contenant 100 μ g/ml d'ampicilline (Im Media Amp Agar, Invitrogen) afin de sélectionner les bactéries transformées par le plasmide muté qui porte le gène de résistance à l'ampicilline. Dans ces colonies, le plasmide matrice méthylé non muté est digéré par l'endonucléase bactérienne *McrBC* laissant uniquement le plasmide non méthylé et donc muté.

3. Extraction plasmidique et Séquençage de l'ADN obtenu.

L'ADN plasmidique incorporé par les colonies résistantes à l'ampicilline est isolé par mini-préparation grâce au kit QuickLyse miniprep (Qiagen) selon le protocole du fabricant. L'ADN des plasmides contenant IL4I1 muté a été séquencé à l'aide du kit Big Dye Terminator 3.1 (Applied Biosystems) selon la technique de Sanger modifiée. Les réactions de séquence ont été analysés sur le séquenceur automatique 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem) à la plateforme génomique du site et sur le logiciel Chromas.

La colonie bactérienne ayant incorporé le plasmide porteur de la mutation d'intérêt, vérifiée par séquençage, est en suite amplifiée. L'ADN plasmidique est isolé avec le Qiafilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen) selon le protocole du fabricant. L'ADN muté sera ensuite transfecté dans des cellules eucaryotes afin de caractériser biochimiquement le mutant IL4I1 obtenu.

4. Lignée cellulaire et transfection des plasmides mutés dans les cellules B16GP33.

La lignée de mélanome murin B16GP33 exprimant à sa surface l'épitope immunodominant GP33 de la glycoprotéine du virus de la chorioméningite lymphocytaire est dérivée de la lignée parentale B16F10 [Prevost-Blondel et al. 1998] et nous a été donné par Armelle Prevost-Blondel. Cette lignée est cultivée en DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 2mM de L-glutamine, 100U/ml de pénicilline, 10 μ g/ml de

streptomycine, des acides aminés non essentiels, 200µg/ml de néomycine. Tous les réactifs de culture sont achetés chez Invitrogen. La lignée est transfectée indépendamment avec les plasmides codant pour les protéines IL411 mutées grâce à des lipides cationiques en utilisant le kit Transfast (Promega). Les transfections de la lignée B16GP33 sont réalisées sur la base d'un ratio 3 :1 de µl de solution transfast/µg d'ADN plasmidique, avec 4,5µg d'ADN pour un puit de 9 cm² semi-confluent. Le transfast et l'ADN sont incubés 1 heure sur les cellules à 37°C en absence de sérum, puis du milieu complet est rajouté. Les cellules sont placées à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂ et diluées 20 fois 24 h plus tard. Vingt-quatre heures après la dilution, les cellules sont sélectionnées par l'ajout de 300µg/ml de zéocine. Dix jours plus tard, les colonies résistantes apparaissent. Vingt colonies par mutations sont isolées, amplifiées et testées pour l'expression et l'activité de la protéine IL411 mutante produite. Un clone par type de mutation est choisi pour l'analyse successive.

5. Caractérisation de l'expression d'IL411 dans les clones développés.

- Préparation des échantillons.

Les échantillons sont : soit des milieux de culture, soit des extraits cellulaires totaux. Les milieux sont dissous à 4/5^{ème} dans un tampon de charge sur gel contenant 0.045M de Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 1% SDS et 50mM de Bleu de bromophénol.

Les cellules sont placées dans du « Phosphate Buffer Saline » (PBS) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Compleat mini, Roche). Les extraits totaux sont obtenus par lyse des cellules par cycles successifs de congélation et de décongélation en azote liquide et à 37°C. Après 4 cycles de lyse, les échantillons sont centrifugés 10mn à 10000g à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaire et le noyau et le surnageant récupéré. Dans ceci, les échantillons protéiques sont dosés par un test de Bradford en utilisant le kit Biorad en comparaison à une courbe étalon d'albumine bovine sérique (BSA).

- Western blot.

Dix microgrammes de protéines sont chargés sur un gel à 8% d'acrylamide. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de fluore de

polyvinylidene (PVDF) (Millipore) grâce à un transfert demi-sec (InVitrogen) dans un tampon contenant 25mM Tris et 192mM glycine pH 8,3, 20% éthanol.

Après blocage de la membrane avec une solution contenant 5% BSA, la protéine mL4I1 étiquetée est révélée grâce à un anticorps-anti-myc (clone 9E10 Calbiochem 2µg/ml) et un anticorps secondaire anti-anticorps de souris couplé à la peroxydase (Sigma, 0.5µg/ml,). Une révélation par chemoluminescence est réalisée en utilisant de l'ECL plus (GE Healthcare). La luminescence est détectée par le système Autochemi et le logiciel Labworks analysis (UVP).

6. Caractérisation de l'activité enzymatique de la protéine

IL4I1 exprimée.

La protéine IL4I1 présente une activité enzymatique de dégradation de la phénylalanine en phenylpyruvate et H₂O₂. Le test mesure, de façon indirecte, l'H₂O₂ produite en présence de phénylalanine. Cette production est révélée grâce à un substrat de la peroxydase : le 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex red, Molecular Probes, InVitrogen) qui est oxydé en présence de peroxydase et d'H₂O₂ pour former une molécule fluorescente : la resorufine. La fluorescence est mesurée à 590 nm après excitation à 550 nm dans un lecteur de plaque Fluostar Optima (LGB Labtech). En pratique, 40µl d'échantillon sont déposés en plaque 96 puits en présence ou en absence de 10mM de phénylalanine et avec 50µl de mélange contenant 0,2µg/µl d'amplex red et 0,0225 µU/µl de peroxydase dans du PBS.

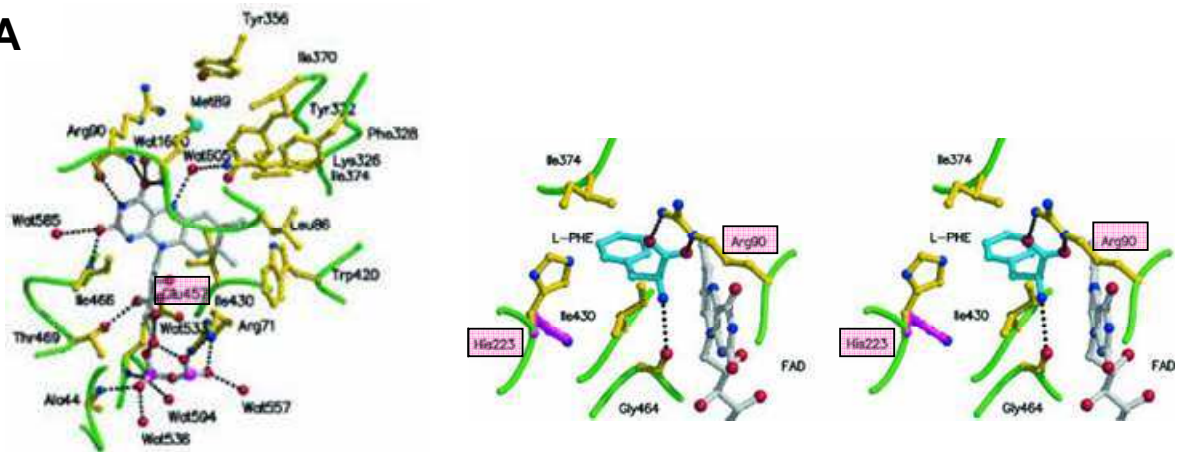
Afin d'évaluer la cinétique de sécrétion des différents clones développés, ceux-ci sont ensemencés dans des plaques 6W à 1,5.10⁶ cellules/puit. et cultivés dans 4ml de DMEM sans rouge phénol avec 1% de SVF. Après 4 heures de culture, 200µl de milieu sont prélevés toutes les deux heures pour la réalisation d'un test d'activité IL4I1 sur 40µl. Après 30 heures de cultures, un test d'activité est réalisé sur les cellules et le reste de milieu.

C. Résultats

1. Développement des mutants IL4I1.

Les acides aminés sélectionnés pour la mutagenèse dirigée dans la séquence d'IL4I1 murine sont représentés sur la **figure 25** et sont changés en alanine, acide aminé neutre. Un double mutant des deux acides aminés R129A et E478A a également été réalisé. L'ensemble de ces mutants a été développé à partir du plasmide codant pour la protéine IL4I1 murine native présentant une étiquette myc et une queue de 6 histidines en C-terminal. La présence de ces deux étiquettes C-terminales ne modifie pas les caractéristiques biochimique de la protéine IL4I1 [Boulland *et al.* 2007]. Le séquençage des plasmides obtenus a permis de vérifier l'absence de mutations additionnelles. Ces différents mutants sont représentés sur la **figure 25 B**.

En parallèle, nous avons développé un mutant non sécrété de la protéine IL4I1 appelé DeltaPS. Pour cela, nous avons amplifié l'ADNc de l'IL4I1 native sans les 21 codons correspondant au peptide signal.

A

D'après P.D.Pawelek et al, EMBO, 2000

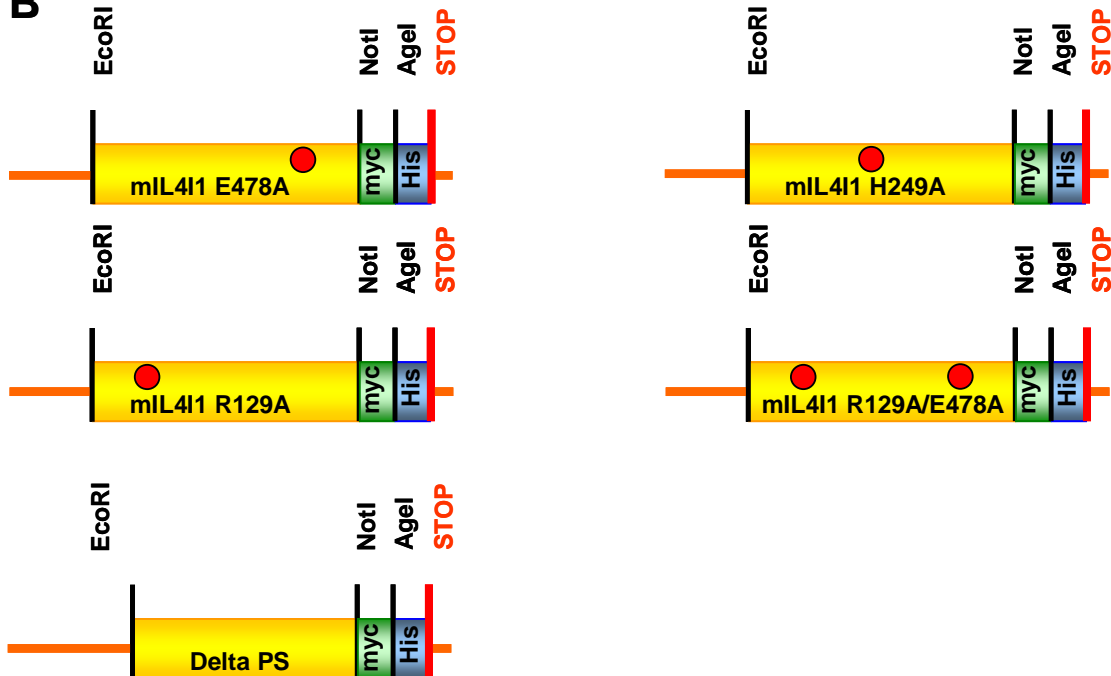
B

Figure 25 : Mutagenèse dirigée

(A). Schéma tridimensionnel de la protéine L-amino acid oxydase de venin de *Calloselasma rhodostoma*. Les acides aminés clés de l'activité enzymatique de cette LAAO sont encadrés en rose. Les acides aminés R90 et E457 sont impliqués respectivement dans la liaison au substrat phénylalanine et au cofacteur FAD. L'acide aminé H223 est impliqué dans l'ouverture du canal contrôlant l'entrée de l'O₂ et de la phénylalanine dans le site catalytique ainsi que la sortie d'H₂O₂.

(B) Schéma des différents mutants la protéine mIL411 produits par mutagenèse dirigée. Les acides aminés cibles: E478, H249 et R129 sont mutés en alanine acide aminé neutre. Le point rouge représente la position de la mutation dans la séquence codante. Les acides aminés 1 à 21 sont délétés dans le mutant DeltaPS. Deux étiquettes codant respectivement pour myc et pour 6 Histidines sont rajoutées dans la région C-terminale de la séquence Ces deux étiquettes ne modifient pas les caractéristiques biochimiques de la protéine.

2. La sécrétion des mutants DeltaPS, E478A et le double mutant R129A/E478A est diminuée.

Les cellules B16GP33 ne présentent pas d'activité d'IL4I1. A partir de ces cellules, nous avons généré les clones R129A, E478A, H249A et R129A/E478A exprimant constitutivement une forme mutée de la protéine IL4I1 murine et un clone DeltaPS exprimant une protéine IL4I1 murine sans peptide signal. Aucune toxicité des mutants d'IL4I1 n'est observée dans ces cellules.

Nous avons évalué l'expression des différents mutants d'IL4I1 dans les surnageants de culture et les extraits cellulaires par Western blot utilisant un anticorps reconnaissant la queue myc C-terminale (**Figure 26**). Dans les extraits cellulaires, cette expression est observée à des niveaux légèrement variables en comparaison à la protéine native exprimée par le clone B8. Aucun signal spécifique n'est détecté dans les extraits et les surnageants du clone contrôle A1 transfecté avec le vecteur vide. Comme attendu, le mutant DeltaPS présente une taille inférieure à la taille de 75kD de la protéine native et n'est pas détecté dans le milieu de culture. Nous avons précédemment montré qu'IL4I1 est une protéine N-glycosylée. La N-glycosylation consiste en l'ajout de glucides sur les résidus asparagine (N) de la protéine lors de son passage dans la lumière du réticulum endoplasmique rugueux puis dans l'appareil de Golgi. En l'absence de peptide signal, la protéine IL4I1 ne peut franchir la membrane du réticulum endoplasmique, ce qui devrait interdire sa glycosylation, pouvant contribuer ainsi à sa plus petite taille. La sécrétion du mutant R129A ne semble pas modifiée. Comme observé pour la protéine humaine, le mutant E478A semble peu sécrété, de même que le mutant H249A, tandis que le double mutant R129A/ E478A n'est pas du tout détecté dans le milieu de culture.

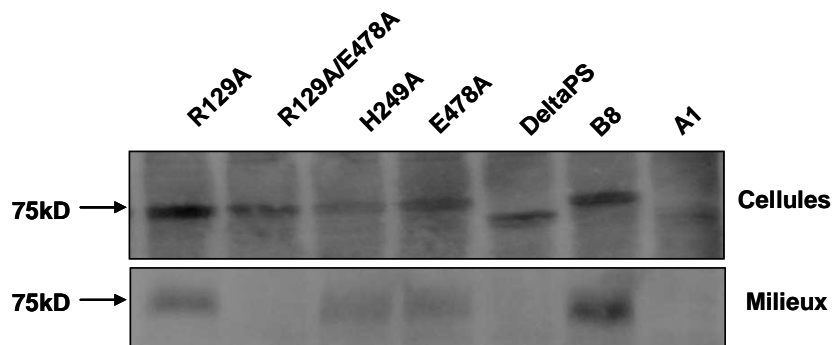


Figure 26 : Les mutants DeltaPS, E478A et le double mutant R129A/E478A présentent une sécrétion d'IL4I1 modifiée.

Les extraits cellulaires et les milieux de culture des cellules B16GP33 transfectées avec les vecteurs codant pour une protéine IL4I1 étiquetée myc et mutée sur les acides aminés cibles E478, H249, R129, le double mutant R129A/E478A ou une protéine IL4I1 sans peptide signal sont analysées par Western blot. Des cellules B16GP33 transfectées avec un vecteur vide (A1) ou avec le vecteur codant la protéine IL4I1 étiquetée native (B8) sont utilisés en contrôle de la transfection.

3. Les mutations DeltaPS, E478A et la double mutation

R129A/E478A modifient l'activité de la protéine IL411.

Les différents mutants ont été testés pour leur activité oxydative de la phénylalanine. Comme certains mutants présentent un défaut de sécrétion d'IL411, l'activité a été mesurée sur les extraits cellulaires (**Figure 27**). Comme attendu, le clone contrôle A1 ne présente aucune activité, alors que le clone B8 produit 235 ± 60 pmoles $H_2O_2/10^5$ cellules/h (moyenne +/- écart-type de 5 tests). Le mutant H249A présente une activité similaire à celle observée dans le clone B8. Le mutant R129A semble paradoxalement plus actif. A contrario, les mutants E478A, R129A/E478A et DeltaPS présentent une activité très faible, proche de celle du bruit de fond mesurable sur le lysat contrôle A1. Or, les clones R129A/E478A et DeltaPS ne sont pas sécrétés. La perte du peptide signal et la double mutation R129A/E478A affectent donc à la fois l'activité de l'enzyme et sa sécrétion.

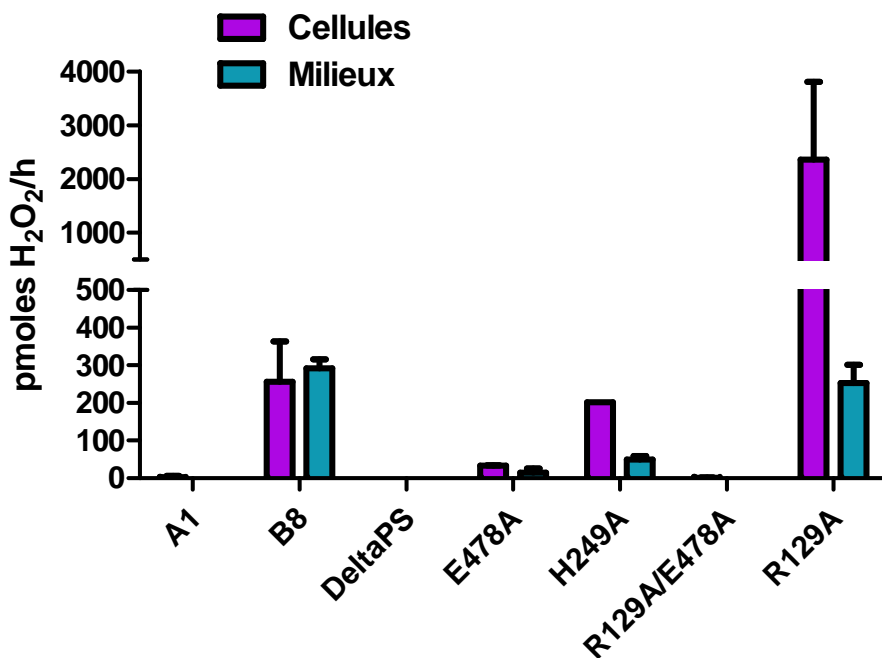


Figure 27: Les mutations DeltaPS, E478A et la double mutation R129A+E478A modifient l'activité de la protéine IL411.

L'activité IL411 des extraits cellulaires et les milieux de culture des cellules B16GP33 transfectées avec les vecteurs codant pour une protéine IL411 étiquetée myc et mutée sur les acides aminés cibles E478, H249, R129, le double mutant R129A/E478A ou une protéine IL411 sans peptide signal sont analysées. Des cellules B16GP33 transfectées avec un vecteur vide (A1) ou avec le vecteur codant la protéine IL411 étiquetée native (B8) sont utilisés en contrôle de l'activité IL411. L'activité IL411 est exprimée en pmoles H_2O_2/h pour 10^5 cellules finales.

4. Tous les mutants présentent un défaut de cinétique de sécrétion.

Pour s'assurer du défaut de sécrétion de l'enzyme, observé en Western blot, nous avons mesuré la cinétique de l'activité enzymatique dans le milieu des mutants pendant 30 heures de culture (**Figure 28**). L'augmentation de l'activité IL4I1 dans les milieux est exprimée en ratio par rapport à la mesure d'activité à 4 heures de culture. L'activité du clone B8 exprimant la protéine native augmente fortement et de façon linéaire dès 6 heures après l'ensemencement des cellules avec une pente de 0,14. L'activité des mutants H249A et R129A augmente plus lentement avec une pente de 0,05 et 0,07 respectivement, ce qui confirme un défaut de sécrétion de ces mutants, dont l'activité intracellulaire est conservée. Enfin, l'activité des mutants E478A et R129A/E478A n'augmente pas au cours du test. Le double mutant R129A/E478A n'est pas détectable par Western blot dans le milieu, alors qu'il est détectable dans les cellules mais inactif. Pour ce double mutant les résultats de la cinétique traduisent à la fois l'absence d'activité intrinsèque et de sécrétion de la protéine. En revanche, le mutant E478A est détectable par Western blot dans les cellules et le milieu, mais inactif lorsqu'il est extrait des cellules. L'absence d'activité sécrétée traduit donc dans le cas de ce mutant uniquement la perte intrinsèque de la capacité à dégrader la phénylalanine. Ce mutant pourrait donc permettre d'explorer le rôle de l'activité d'IL4I1 dans l'échappement tumoral au système immunitaire dans le modèle murin de mélanome.

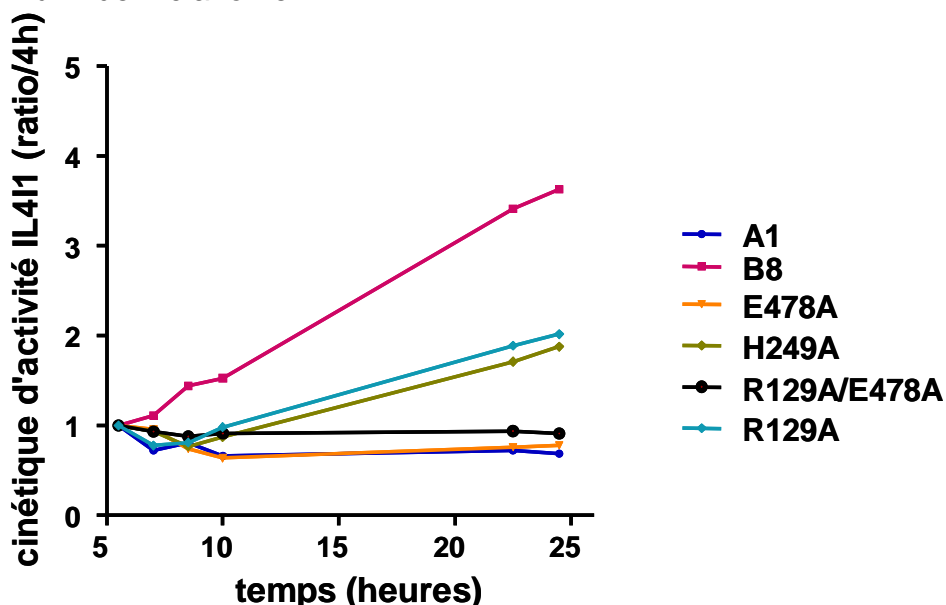


Figure 28: Tous les mutants présentent un défaut de cinétique de sécrétion.

Pour évaluer la cinétique de sécrétion des différents mutants générés, les cellules sont ensemencées à $1,5 \cdot 10^6$ cellules dans des plaques 6 puits. Après 4 heures de culture, l'activité IL4I1 dans le milieu de culture des clones est testée toutes les deux heures. La cinétique de l'activité IL4I1 dans le milieu de culture est exprimée en ratio par rapport à la première valeur d'activité IL4I1 mesurée 4 heures après l'ensemencement des cellules.

D. Conclusion

Pour déterminer si IL4I1 exerce son rôle immunosuppresseur *in vivo* via un récepteur de surface et/ou son activité de dégradation de la phénylalanine, nous avons développé une protéine privée de son peptide signal et plusieurs protéines mutées sur des acides aminés potentiellement impliqués dans l'activité enzymatique.

Les clones cellulaires transfectés avec les plasmides codant ces différents mutants expriment tous la protéine au niveau cellulaire. Les niveaux d'expression évalués semi-quantitativement par Western-blot sont peu différents de ceux du clone cellulaire exprimant la protéine native. En revanche, des différences importantes sont notées dans le milieu : le mutant DeltaPS et le double mutant R129A/E478A n'étant pas sécrétés de façon détectable. Malheureusement, ces deux mutants sont également inactifs et ne sont donc pas utilisables pour répondre à la question posée dans le modèle murin. Dans le cas du mutant sans peptide signal, la perte de la N-glycosylation pourrait être responsable de la perte d'activité de l'enzyme, comme cela a été observé après traitement à la tunicamycine des cellules HEK293 exprimant la protéine native humaine [Boulland *et al.* 2007].

La comparaison des résultats de Western blot et d'activité dans les milieux de culture fait apparaître que seul le mutant E478A présente un défaut intrinsèque d'activité IL4I1 tout en étant sécrété. Ces caractéristiques en font un mutant de choix pour l'étude *in vivo* du rôle d'IL4I1 dans l'échappement tumoral. Ces résultats restent toutefois à confirmer et à compléter.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Après plus d'un siècle de controverse, l'existence d'une réponse immunitaire anti-tumorale et l'importance de l'efficacité de cette réponse dans la régression des tumeurs ne sont plus à démontrer. Ainsi, de nouvelles thérapeutiques anti-cancéreuses visant à stimuler le système immunitaire du patient vis-à-vis de sa tumeur ont été développées. Récemment, la Food and Drug Administration (FDA) a autorisé la mise sur le marché du vaccin Provenge (sipuleucel-T) mis au point par Dendreon, premier vaccin thérapeutique dans le cancer de la prostate. Ce vaccin est composé de cellules mononucléées autologues du sang, chargées en culture avec la phosphatase acide prostatique (antigène tumoral) couplée au GM-CSF. Cette protéine recombinante active *in vivo* les lymphocytes T spécifiques de la phosphatase acide prostatique [Plosker 2011]

Cependant, jusqu'à aujourd'hui la plupart des stratégies d'immunothérapie ont donné des résultats décevants en clinique, malgré l'induction ou l'amplification des réponses lymphocytaires T antitumorales. L'identification des mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire et la compréhension des liens unissant ces différents mécanismes restent donc parmi les défis majeurs à relever pour développer des thérapeutiques immunologiques efficaces.

Les interactions du système immunitaire et de la cellule cancéreuse lors du développement tumoral sont extraordinairement complexes. Le microenvironnement et la cellule tumorale peuvent restreindre l'efficacité des réponses anti-tumorales par une variété de stratégies immunosuppressives. Hanahan et Weinberg ont proposé en 2000 une série de 6 propriétés nécessairement acquises par les cellules au cours du processus de transformation : insensibilité aux inhibiteurs de croissance, autosuffisance, potentiel réplicatif illimité, capacités angiogéniques, évation de l'apoptose, invasion tissulaire et potentiel métastatique [Hanahan et al. 2000]. La capacité d'échappement au système immunitaire a récemment été décrite comme une 7^{ème} caractéristique des cellules tumorales [Dunn et al. 2004; Zitvogel et al. 2006]. Un des mécanismes utilisés est représenté par la production d'enzymes immunosuppressives par les cellules tumorales et/ou les cellules myéloïdes infiltrant la tumeur, telles que les TAM ou les MDSC. L'IDO, par exemple, inhibe la réponse immunitaire anti-tumorale en bloquant les lymphocytes T effecteurs en phase G1 du cycle cellulaire et en activant les lymphocytes Treg.

Dans le laboratoire, nous avons mis en évidence les propriétés immunosuppressives d'IL4I1. Cette enzyme présente de nombreux points communs

avec les autres enzymes immunosuppressives identifiées : capacité à cataboliser un acide aminé essentiel pour produire des métabolites toxiques, production par des cellules tumorales ou des cellules du microenvironnement, inhibition de la prolifération des lymphocytes T.

Dans un premier temps, nous avons défini les conditions d'expression de l'enzyme IL4I1. La protéine IL4I1 a été initialement décrite dans les lymphocytes B stimulés par l'IL-4. Cependant, l'étude de coupes immunohistologiques d'amygdales normale et de tumeurs nous a permis de mettre en évidence une forte expression d'IL4I1 dans les cellules myéloïdes. Au cours de ma thèse, nous avons montré que les DC et les macrophages sont les principaux producteurs d'IL4I1 *in vitro* et *in vivo* dans des lésions inflammatoires chroniques. L'induction d'IL4I1 dans ces cellules est dépendante des interférons (IFN γ ou IFN de type I) et/ou de ligands des TLR tels que le LPS *via* des voies de signalisation impliquant respectivement les facteurs de transcription STAT1 et NF κ B. En accord avec ces résultats, une forte expression d'IL4I1 est détectée dans les granulomes de type Th1, en particulier dans les cellules géantes multinucléées. Les conditions d'expression d'IL4I1 dans les cellules d'origine myéloïde rappellent celles de l'IDO, qui est également détectée dans des granulomes de type Th1 [Popov *et al.* 2006]. En revanche, les lymphocytes B expriment IL4I1 en réponse à une activation de l'axe IL-4/STAT6 ou de la voie NF- κ B et, à l'exception de lymphocytes B tumoraux, beaucoup plus faiblement que les macrophages et DC. L'enzyme pourrait donc jouer un rôle différent dans ces deux types de populations cellulaires. L'expression d'IL4I1 par les cellules myéloïdes diminue *in vitro* la prolifération des lymphocytes T mais également leur sécrétion d'IL2, d'IFN γ et de chimiokines pro-inflammatoires et pourrait ainsi contribuer à limiter la réponse Th1 *in vivo*. A ce rôle pourrait s'adjoindre une inhibition directe de la croissance du pathogène (résultats non publiés du laboratoire), comme cela a été suggéré pour une LAAO de poisson [Jung *et al.* 2000].

Les tumeurs représentent une situation d'inflammation chronique. La présence locale d'IFN γ pourrait expliquer l'expression d'IL4I1 retrouvée dans les TAM infiltrant de nombreux types de cancers humains [Carbonnelle-Puscian *et al.* 2009]. En outre, un certain nombre de tumeurs présentent une expression d'IL4I1 dans les cellules tumorales. C'est notamment le cas des mésothéliomes, de certains carcinomes du

poumon et du colon et d'une partie des lymphomes B d'origine centrogerminative tels que le lymphome folliculaire et le lymphome de Hodgkin. Dans les lymphomes de Hodgkin, une activation constitutive de la voie de signalisation NF κ B pourrait expliquer la forte expression d'IL411 fréquemment retrouvée *in vivo* [Kuppers 2009]. De façon intéressante, il a été récemment montré qu'IL411 est un des principaux gènes cibles de l'activité ectopique de la cytidine déaminase « activation induced cytidine deaminase » (AID) [Yamane et al. 2011]. Cette enzyme est exprimée transitoirement dans les lymphocytes B centrogerminatifs, dans lesquels elle induit l'apparition des mutations somatiques des parties variables des gènes d'immunoglobulines et participe à la commutation isotypique. Son expression prolongée dans les cellules lymphomateuses d'origine centrogerminative pourrait jouer un rôle dans des modifications de l'expression ou de l'activité d'IL411. Une étude pilote réalisée dans l'équipe sur 23 patients atteints de lymphome folliculaire a montré qu'une forte expression d'IL411 dans la tumeur au diagnostic est associée à des facteurs de bon pronostic. Ceci suggère que l'IL411 produite par les cellules lymphomateuses pourrait cibler les lymphocytes T_{FH} qui soutiennent la croissance tumorale [Roulland et al. 2008].

En revanche, dans les tumeurs non lymphoïdes, l'inhibition des lymphocytes T effecteurs a été généralement associée à l'échappement tumoral. Dans le modèle murin que j'ai mis au point au cours de ma thèse, l'expression intratumorale d'IL411 est clairement responsable d'une fréquence accrue d'apparition des tumeurs et d'une inhibition de la prolifération, de la cytotoxicité et de la production d'IFN γ des lymphocytes T CD8⁺ antitumoraux. Une expression partielle d'IL411 dans la tumeur, à des niveaux d'activité équivalents à ceux observés chez l'homme, est suffisante pour conduire à un échappement tumoral à la réponse immunitaire. Dans une étude du rôle pronostic des transcrits exprimés par le stroma de tumeurs mammaires, Finak et collaborateurs ont montré une surexpression de l'ARNm d'IL411 associée aux tumeurs de mauvais pronostic [Finak et al. 2008]. Ainsi, IL411 pourrait contribuer à la progression des tumeurs humaines en compromettant la réponse T cytotoxique anti-tumorale.

Afin de définir le mode d'action d'IL411 dans ce modèle, *via* l'activité enzymatique et/ou la liaison éventuelle à un récepteur de surface, nous avons choisi de développer des mutants inactifs ou non sécrétés de la protéine. La stratégie adoptée a été, d'une part de générer une séquence sans peptide signal (DeltaPS) et

d'autre part des mutants d'acides aminés sur la base de l'homologie de séquence entre IL4I1 et la LAAO du serpent *Calloselasma rhodostoma* qui a été cristallisée. Le mutant DeltaPS est non seulement non sécrété mais également inactif, probablement par un défaut de glycosylation, ce qui le rend impropre à répondre à notre question. Parmi les autres mutants générés, seul le mutant E478A a permis d'obtenir une protéine inactive mais sécrétée, bien qu'à de plus faibles niveaux que ceux de la protéine native. Le faible taux de succès de la stratégie de mutagenèse dirigée pourrait s'expliquer par l'homologie partielle (37%) d'IL4I1 avec la LAAO de *Calloselasma rhodostoma* [Raibekas et al. 1998]. Certains acides aminés spécifiques de la séquence d'IL4I1 pourraient modifier le site catalytique tel qu'il est décrit pour les LAAO de serpent. Dans une étude récente des polymorphismes mononucléotiques (SNP) de la protéine humaine, nous avons mis en évidence que le changement de l'aspartate D296 en glutamate (E), tel que dans la séquence de *Crotalus Atrox*, produit une protéine IL4I1 active non sécrétée. Cette mutation pourrait être introduite dans la séquence murine. Le mutant obtenu pourrait être testé en parallèle avec le mutant E478A dans le modèle de tumeur murine.

La dégradation de la phénylalanine par la protéine IL4I1 produit de l'ammoniac, du phénylpyruvate et du peroxyde d'hydrogène. *In vitro*, nous avons précédemment montré que l'effet immunomodulateur de la protéine IL4I1 est dû, au moins en partie, à la production d'H₂O₂. L'H₂O₂ est connu pour ses effets suppresseurs des fonctions cellulaires T, notamment *via* la modulation de la signalisation du TCR [Kono et al. 1996; Otsuji et al. 1996; Schmielau et al. 2001; Takahashi et al. 2005]. Seules de fortes doses d'H₂O₂ induisent l'apoptose des lymphocytes T [Takahashi et al. 2005]. Une étude réalisée par Mougiakakos et collaborateurs a montré que les lymphocytes Treg sont beaucoup moins sensibles à l'H₂O₂ que les lymphocytes T effecteurs, grâce à une meilleure capacité anti-oxydante [Mougiakakos et al. 2009; Mougiakakos et al. 2011]. IL4I1 pourrait donc contribuer à diminuer le ratio T effecteurs/Treg dans le microenvironnement tumoral.

Nous n'avons pas exploré *in vitro* l'effet de la carence en phénylalanine induite par l'activité IL4I1. Il a été montré dans la littérature que la carence en acides aminés déclenche l'inactivation du complexe mTOR, central dans la survie, la prolifération et les fonctions lymphocytaires T [Powell et al. 1999; Powell et al. 2010], aboutissant ainsi à l'inhibition de la prolifération T [Cobbold et al. 2009]. De plus, il a été montré très

récemment que l'inactivation de la kinase centrale du complexe mTOR, modifie la polarisation fonctionnelle des lymphocytes T, conduisant à l'inhibition des fonctions effectrices au profit des fonctions T régulatrices [Delgoffe et al. 2009]. Dans le contexte de la tumeur, IL4I1 pourrait donc exacerber les dysfonctions immunitaires en induisant un enrichissement sélectif en Treg dans le microenvironnement tumoral et/ou dans les organes lymphoïdes de drainage. Le rôle d'IL4I1 sur l'expansion des populations Tregs est en cours d'exploration *in vitro* au laboratoire.

En dehors des cellules tumorales et des TAM, IL4I1 pourrait être impliquée dans l'action de différentes populations immunosuppressives dans le cancer. En effet, une surexpression des transcrits d'IL4I1 a été mise en évidence dans une population de lymphocytes T CD8⁺ présentant une activité pro-tumorale. Cette population nouvellement décrite inhibe les lymphocytes T cytotoxiques *via* notamment la production d'IL-10 [Kwong et al. 2010]. Une augmentation de l'expression des ARNm d'IL4I1 a également été mise en évidence dans les MDSC après 24 heures de culture [Gallina et al. 2006]. De plus, des MDSC stimulées par du LPS et de l'IFN γ , principaux inducteurs d'IL4I1, conditionnent les DC à acquérir des fonctions tolérogéniques et à induire l'anergie des cellules T *in vitro* [Greifenberg et al. 2009].

IDO et IL4I1 sont toutes les deux induites après stimulation par l'IFN γ et agissent par des mécanismes proches, permettant d'imaginer qu'elles puissent être exprimées dans le même environnement et agir en synergie. Une expression concomitante d'IL4I1 et d'IDO dans les tumeurs semble donc envisageable, ce que nous avons, en effet, observé chez un patient atteint de mésothéliome. Il sera intéressant par la suite, de caractériser l'effet de cette co-expression sur la réponse anti-tumorale. IL4I1 pourrait être avec IDO un des mécanismes facilitant le passage de l'état d'équilibre à l'état d'échappement tumoral au système immunitaire décrit par le groupe de Schreiber [Koebel et al. 2007].

Pour conclure, nous avons caractérisé les conditions d'expression d'IL4I1 et démontré son rôle immunosuppressif *in vivo* dans un modèle de cancer. Nos résultats suggèrent qu'IL4I1 pourrait être la cible de traitements adjuvants dans le cancer, ce d'autant qu'elle est facile d'accès car sécrétée et d'expression normale restreinte. Les stratégies visant à inhiber les mécanismes immunosuppressifs (Treg, MDSC, axe

PD1/PD-L1, IDO, TGF β , IL-10) développés par les tumeurs font en effet l'objet actuellement d'un intérêt particulier comme adjuvantes de thérapies conventionnelles ou d'immunothérapies plus classiques.

ANNEXE

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, Besken, Oberdorfer, MacKenzie, Takikawa and Daubener (2004). "Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in alpha/beta and gamma interferon-mediated antiviral effects against herpes simplex virus infections." *J Virol* **78**(5): 2632-6.
- Ahmadzadeh, Johnson, Heemskerk, Wunderlich, Dudley, White and Rosenberg (2009). "Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired." *Blood* **114**(8): 1537-44.
- Albina, Mills, Henry and Caldwell (1989). "Regulation of macrophage physiology by L-arginine: role of the oxidative L-arginine deiminase pathway." *J Immunol* **143**(11): 3641-6.
- Alderton, Cooper and Knowles (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." *Biochem J* **357**(Pt 3): 593-615.
- Alexander, Maniar, Cummings, Hebbeler, Schulze, Gastman, Pauza, Strome and Chapoval (2008). "Isopentenyl pyrophosphate-activated CD56+ $\{\gamma\}\{\delta\}$ T lymphocytes display potent antitumor activity toward human squamous cell carcinoma." *Clin Cancer Res* **14**(13): 4232-40.
- Alexandrescu, Ichim, Riordan, Marincola, Di Nardo, Kabigting and Dasanu (2010). "Immunotherapy for melanoma: current status and perspectives." *J Immunother* **33**(6): 570-90.
- Ali, Stoeva, Abbasi, Alam, Kayed, Faigle, Neumeister and Voelter (2000). "Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom." *Arch Biochem Biophys* **384**(2): 216-26.
- Allavena, Sica, Garlanda and Mantovani (2008). "The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance." *Immunol Rev* **222**: 155-61.
- Allavena, Sica, Vecchi, Locati, Sozzani and Mantovani (2000). "The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues." *Immunol Rev* **177**: 141-9.
- Altieri (2010). "Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms." *Biochem J* **430**(2): 199-205.
- Alvarez and Radi (2003). "Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins." *Amino Acids* **25**(3-4): 295-311.
- Alvaro, Lejeune, Salvado, Bosch, Garcia, Jaen, Banham, Roncador, Montalban and Piris (2005). "Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells." *Clin Cancer Res* **11**(4): 1467-73.
- Amiot, Le Friec, Sebti, Drenou, Pangault, Guilloux, Leleu, Bernard, Facon and Fauchet (2003). "HLA-G and lymphoproliferative disorders." *Semin Cancer Biol* **13**(5): 379-85.
- Anderson, Gerber and Mosser (2002). "Modulating macrophage function with IgG immune complexes." *J Endotoxin Res* **8**(6): 477-81.
- Angelini, Gardella, Ardy, Ciriolo, Filomeni, Di Trapani, Clarke, Sitia and Rubartelli (2002). "Antigen-presenting dendritic cells provide the reducing extracellular microenvironment required for T lymphocyte activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(3): 1491-6.
- Apetoh, Ghiringhelli, Tesniere, Obeid, Ortiz, Criollo, Mignot, Maiuri, Ullrich, Saulnier, Yang, Amigorena, Ryffel, Barrat, Saftig, Levi, Lidereau, Noguez, Mira, Chompret, Joulin, Clavel-Chapelon, Bourhis, Andre, Delaloge, Tursz, Kroemer and Zitvogel (2007). "Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy." *Nat Med* **13**(9): 1050-9.
- Aspord, Pedroza-Gonzalez, Gallegos, Tindle, Burton, Su, Marches, Banchereau and Palucka (2007). "Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development." *J Exp Med* **204**(5): 1037-47.
- Astigiano, Morandi, Costa, Mastracci, D'Agostino, Ratto, Melioli and Frumento (2005). "Eosinophil granulocytes account for indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated immune escape in human non-small cell lung cancer." *Neoplasia* **7**(4): 390-6.
- Aulak, Miyagi, Yan, West, Massillon, Crabb and Stuehr (2001). "Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(21): 12056-61.
- Azuma, Yao, Zhu, Flies, Flies and Chen (2008). "B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells." *Blood* **111**(7): 3635-43.
- Baban, Chandler, Sharma, Pihkala, Koni, Munn and Mellor (2009). "IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells." *J Immunol* **183**(4): 2475-83.
- Babcock and Carlin (2000). "Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells." *Cytokine* **12**(6): 588-94.
- Baek, Thiel, Lucas and Stuehr (1993). "Macrophage nitric oxide synthase subunits. Purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme." *J Biol Chem* **268**(28): 21120-9.
- Bahram, Inoko, Shiina and Radosavljevic (2005). "MIC and other NKG2D ligands: from none to too many." *Curr Opin Immunol* **17**(5): 505-9.

- Ball, Sanchez-Perez, Weiser, Austin, Astelbauer, Miu, McQuillan, Stocker, Jermini and Hunt (2007). "Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice." *Gene* **396**(1): 203-13.
- Bancroft, Schreiber and Unanue (1991). "Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse." *Immunol Rev* **124**: 5-24.
- Barbul, Rettura, Levenson and Seifter (1977). "Arginine: a thymotropic and wound-healing promoting agent." *Surg Forum* **28**: 101-3.
- Barth, Mule, Spiess and Rosenberg (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.
- Barthlott, Moncrieffe, Veldhoen, Atkins, Christensen, O'Garra and Stockinger (2005). "CD25+ CD4+ T cells compete with naive CD4+ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production." *Int Immunol* **17**(3): 279-88.
- Bates, Fox, Han, Leek, Garcia, Harris and Banham (2006). "Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse." *J Clin Oncol* **24**(34): 5373-80.
- Bauer, Jiga, Chuang, Randazzo, Opelz and Terness (2005). "Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses in vitro and in vivo." *Transpl Int* **18**(1): 95-100.
- Belladonna, Volpi, Bianchi, Vacca, Orabona, Pallotta, Boon, Gizzi, Fioretti, Grohmann and Puccetti (2008). "Cutting edge: Autocrine TGF-beta sustains default tolerogenesis by IDO-competent dendritic cells." *J Immunol* **181**(8): 5194-8.
- Benchetrit, Ciree, Vives, Warnier, Gey, Sautes-Fridman, Fossiez, Haicheur, Fridman and Tartour (2002). "Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism." *Blood* **99**(6): 2114-21.
- Bendelac, Savage and Teyton (2007). "The biology of NKT cells." *Annu Rev Immunol* **25**: 297-336.
- Bevan (2006). "Cross-priming." *Nat Immunol* **7**(4): 363-5.
- Beverly, Kang, Lenardo and Schwartz (1992). "Reversal of in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation." *Int Immunol* **4**(6): 661-71.
- Bianchi (2007). "DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger." *J Leukoc Biol* **81**(1): 1-5.
- Billiar, Curran, Stuehr, Stadler, Simmons and Murray (1990). "Inducible cytosolic enzyme activity for the production of nitrogen oxides from L-arginine in hepatocytes." *Biochem Biophys Res Commun* **168**(3): 1034-40.
- Bingisser, Tilbrook, Holt and Kees (1998). "Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway." *J Immunol* **160**(12): 5729-34.
- Biswas, Gangi, Paul, Schioppa, Saccani, Sironi, Bottazzi, Doni, Vincenzo, Pasqualini, Vago, Nebuloni, Mantovani and Sica (2006). "A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation)." *Blood* **107**(5): 2112-22.
- Biswas, Sica and Lewis (2008). "Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms." *J Immunol* **180**(4): 2011-7.
- Bodaghi, Goureau, Zipeto, Laurent, Virelizier and Michelson (1999). "Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3-dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells." *J Immunol* **162**(2): 957-64.
- Bogdan (2011). "Regulation of lymphocytes by nitric oxide." *Methods Mol Biol* **677**: 375-93.
- Bogdan (2001). "Nitric oxide and the immune response." *Nat Immunol* **2**(10): 907-16.
- Boismenu, Feng, Xia, Chang and Havran (1996). "Chemokine expression by intraepithelial gamma delta T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia." *J Immunol* **157**(3): 985-92.
- Bonneville and Scotet (2006). "Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors." *Curr Opin Immunol* **18**(5): 539-46.
- Boon, Coulie, Van den Eynde and van der Bruggen (2006). "Human T cell responses against melanoma." *Annu Rev Immunol* **24**: 175-208.
- Borrego, Ulbrecht, Weiss, Coligan and Brooks (1998). "Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis." *J Exp Med* **187**(5): 813-8.
- Bottazzi, Walter, Govoni, Colotta and Mantovani (1992). "Monocyte chemotactic cytokine gene transfer modulates macrophage infiltration, growth, and susceptibility to IL-2 therapy of a murine melanoma." *J Immunol* **148**(4): 1280-5.
- Boucher, Custot, Vadon, Delaforge, Lepoivre, Tenu, Yapo and Mansuy (1994). "N omega-hydroxyl-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase." *Biochem Biophys Res Commun* **203**(3): 1614-21.
- Boulland, Marquet, Molinier-Frenkel, Moller, Guiter, Lasoudris, Copie-Bergman, Baia, Gaulard, Leroy and Castellano (2007). "Human IL411 is a secreted L-phenylalanine oxidase expressed by mature dendritic cells that inhibits T-lymphocyte proliferation." *Blood* **110**(1): 220-7.

- Bourgeois, Rocha and Tanchot (2002). "A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory." *Science* **297**(5589): 2060-3.
- Bours, Bentires-Alj, Hellin, Viatour, Robe, Delhalle, Benoit and Merville (2000). "Nuclear factor-kappa B, cancer, and apoptosis." *Biochem Pharmacol* **60**(8): 1085-9.
- Bradley, Watson and Swain (1994). "Entry of naive CD4 T cells into peripheral lymph nodes requires L-selectin." *J Exp Med* **180**(6): 2401-6.
- Brady, Hayakawa, Smyth and Nutt (2004). "IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells." *J Immunol* **172**(4): 2048-58.
- Brandacher, Perathoner, Ladurner, Schneeberger, Obrist, Winkler, Werner, Werner-Felmayer, Weiss, Gobel, Margreiter, Konigsrainer, Fuchs and Amberger (2006). "Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells." *Clin Cancer Res* **12**(4): 1144-51.
- Brandes, Willmann, Bioley, Levy, Eberl, Luo, Tampe, Levy, Romero and Moser (2009). "Cross-presenting human gamma-delta T cells induce robust CD8+ alpha-beta T cell responses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(7): 2307-12.
- Brito, Naviliat, Tiscornia, Vuillier, Gualco, Dighiero, Radi and Cayota (1999). "Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death." *J Immunol* **162**(6): 3356-66.
- Brody, Costantino, Berger, Sato, Lisanti, Yeo, Emmons and Witkiewicz (2009). "Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic malignant melanoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection and affects survival." *Cell Cycle* **8**(12): 1930-4.
- Bromberg, Horvath, Wen, Schreiber and Darnell (1996). "Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(15): 7673-8.
- Bronte, Kasic, Gri, Gallana, Borsellino, Marigo, Battistini, Iafrate, Prayer-Galetti, Pagano and Viola (2005). "Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers." *J Exp Med* **201**(8): 1257-68.
- Bronte, Serafini, De Santo, Marigo, Tosello, Mazzoni, Segal, Staib, Lowel, Sutter, Colombo and Zanovello (2003). "IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice." *J Immunol* **170**(1): 270-8.
- Bronte and Zanovello (2005). "Regulation of immune responses by L-arginine metabolism." *Nat Rev Immunol* **5**(8): 641-54.
- Brossay, Chioda, Burdin, Koezuka, Casorati, Dellabona and Kronenberg (1998). "CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution." *J Exp Med* **188**(8): 1521-8.
- Brown, Miller, Horning, Czerwinski, Hart, McElderry, Basham, Warnke, Merigan and Levy (1989). "Treatment of B-cell lymphomas with anti-idiotype antibodies alone and in combination with alpha interferon." *Blood* **73**(3): 651-61.
- Buga, Singh, Pervin, Rogers, Schmitz, Jenkinson, Cederbaum and Ignarro (1996). "Arginase activity in endothelial cells: inhibition by NG-hydroxy-L-arginine during high-output NO production." *Am J Physiol* **271**(5 Pt 2): H1988-98.
- Bunt, Yang, Sinha, Clements, Leips and Ostrand-Rosenberg (2007). "Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression." *Cancer Res* **67**(20): 10019-26.
- Burnet (1967). "Immunological aspects of malignant disease." *Lancet* **1**(7501): 1171-4.
- Cabestre, Lefebvre, Moreau, Rouas-Friess, Dausset, Carosella and Paul (1999). "HLA-G expression: immune privilege for tumour cells?" *Semin Cancer Biol* **9**(1): 27-36.
- Campoli, Chang, Oldford, Edgecombe, Drover and Ferrone (2004). "HLA antigen changes in malignant tumors of mammary epithelial origin: molecular mechanisms and clinical implications." *Breast Dis* **20**: 105-25.
- Campoli and Ferrone (2008). "HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance." *Oncogene* **27**(45): 5869-85.
- Campos, Rouault, Sabido, Oriol, Roubi, Vasselon, Archimbaud, Magaud and Guyotat (1993). "High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy." *Blood* **81**(11): 3091-6.
- Cao, Cai, Fehniger, Song, Collins, Piwnicka-Worms and Ley (2007). "Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance." *Immunity* **27**(4): 635-46.
- Carbonnelle-Puscian, Copie-Bergman, Baia, Martin-Garcia, Allory, Haioun, Cremades, Abd-Alsamad, Farcet, Gaulard, Castellano and Molinier-Frenkel (2009). "The novel immunosuppressive enzyme IL4I1 is expressed by neoplastic cells of several B-cell lymphomas and by tumor-associated macrophages." *Leukemia* **23**(5): 952-60.
- Carosella, Kirszenbaum and Dausset (1995). "[HLA-G: a non classical antigen of major histocompatibility complex]." *C R Acad Sci III* **318**(8): 827-30.
- Carr, Kelman, Wu, Gopaul, Senkevitch, Aghvanyan, Turay and Frauwirth (2010). "Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation." *J Immunol* **185**(2): 1037-44.

- Carreras, Lopez-Guillermo, Fox, Colomo, Martinez, Roncador, Montserrat, Campo and Banham (2006). "High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma." *Blood* **108**(9): 2957-64.
- Cederbaum, Yu, Grody, Kern, Yoo and Iyer (2004). "Arginases I and II: do their functions overlap?" *Mol Genet Metab* **81 Suppl 1**: S38-44.
- Chang, Campoli and Ferrone (2005). "Classical and nonclassical HLA class I antigen and NK Cell-activating ligand changes in malignant cells: current challenges and future directions." *Adv Cancer Res* **93**: 189-234.
- Chappert and Schwartz (2010). "Induction of T cell anergy: integration of environmental cues and infectious tolerance." *Curr Opin Immunol* **22**(5): 552-9.
- Chaux, Favre, Martin and Martin (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.
- Chavan, Tian, Hsueh, Jawaheer, Gregersen and Chu (2002). "Characterization of the human homolog of the IL-4 induced gene-1 (Fig1)." *Biochim Biophys Acta* **1576**(1-2): 70-80.
- Chemnitz, Driesen, Classen, Riley, Debey, Beyer, Popov, Zander and Schultze (2006). "Prostaglandin E2 impairs CD4+ T cell activation by inhibition of Ick: implications in Hodgkin's lymphoma." *Cancer Res* **66**(2): 1114-22.
- Chen, Gabrilovich, Tampe, Girgis, Nadaf and Carbone (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, Kuchroo, Inobe, Hafler and Weiner (1994). "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis." *Science* **265**(5176): 1237-40.
- Chen, Liang, Peterson, Munn and Blazar (2008). "The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation." *J Immunol* **181**(8): 5396-404.
- Chen, Zhang, Zhuang, Luo, Su, Yin and Wang (2008). "Decoy receptor 3 overexpression and immunologic tolerance in hepatocellular carcinoma (HCC) development." *Cancer Invest* **26**(10): 965-74.
- Chon, Hassanain and Gupta (1996). "Cooperative role of interferon regulatory factor 1 and p91 (STAT1) response elements in interferon-gamma-inducible expression of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene." *J Biol Chem* **271**(29): 17247-52.
- Chu and Paul (1997). "Fig1, an interleukin 4-induced mouse B cell gene isolated by cDNA representational difference analysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(6): 2507-12.
- Cloke, Garvey, Choi, Abebe, Hailu, Hancock, Kadolsky, Bangham, Munder, Muller, Taylor and Kropf (2010). "Increased level of arginase activity correlates with disease severity in HIV-seropositive patients." *J Infect Dis* **202**(3): 374-85.
- Cobbold, Adams, Farquhar, Nolan, Howie, Lui, Fairchild, Mellor, Ron and Waldmann (2009). "Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(29): 12055-60.
- Cobbs, Brenman, Aldape, Bredt and Israel (1995). "Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors." *Cancer Res* **55**(4): 727-30.
- Cole, Strick, Paradis, Ogborne, Loetscher, Gladue, Lin, Boyd, Moser, Wood, Sahagan and Neote (1998). "Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3." *J Exp Med* **187**(12): 2009-21.
- Coleman and Stanley (1994). "Analysis of HLA-DR expression on keratinocytes in cervical neoplasia." *Int J Cancer* **56**(3): 314-9.
- Colleluori and Ash (2001). "Classical and slow-binding inhibitors of human type II arginase." *Biochemistry* **40**(31): 9356-62.
- Colleluori, Morris and Ash (2001). "Expression, purification, and characterization of human type II arginase." *Arch Biochem Biophys* **389**(1): 135-43.
- Collison, Chaturvedi, Henderson, Giacomini, Guy, Bankoti, Finkelstein, Forbes, Workman, Brown, Rehg, Jones, Ni, Artis, Turk and Vignali (2010). "IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population." *Nat Immunol*.
- Collison, Pillai, Chaturvedi and Vignali (2009). "Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner." *J Immunol* **182**(10): 6121-8.
- Collison and Vignali (2008). "Interleukin-35: odd one out or part of the family?" *Immunol Rev* **226**: 248-62.
- Collison, Workman, Kuo, Boyd, Wang, Vignali, Cross, Sehy, Blumberg and Vignali (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." *Nature* **450**(7169): 566-9.
- Copie-Bergman, Boulland, Dehoule, Moller, Farcet, Dyer, Haioun, Romeo, Gaulard and Leroy (2003). "Interleukin 4-induced gene 1 is activated in primary mediastinal large B-cell lymphoma." *Blood* **101**(7): 2756-61.
- Corbett, Tilton, Chang, Hasan, Ido, Wang, Sweetland, Lancaster, Williamson and McDaniel (1992). "Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction." *Diabetes* **41**(4): 552-6.
- Cosmi, Liotta, Angeli, Mazzinghi, Santarlasci, Manetti, Lasagni, Vanini, Romagnani, Maggi, Annunziato and Romagnani (2004). "Th2 cells are less susceptible than Th1 cells to the suppressive activity of CD25+ regulatory thymocytes because of their responsiveness to different cytokines." *Blood* **103**(8): 3117-21.
- Coudert and Held (2006). "The role of the NKG2D receptor for tumor immunity." *Semin Cancer Biol* **16**(5): 333-43.

- Curiel, Coukos, Zou, Alvarez, Cheng, Mottram, Evdemon-Hogan, Conejo-Garcia, Zhang, Burow, Zhu, Wei, Kryczek, Daniel, Gordon, Myers, Lackner, Disis, Knutson, Chen and Zou (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." *Nat Med* **10**(9): 942-9.
- Curti, Aluigi, Pandolfi, Ferri, Isidori, Salvestrini, Durelli, Horenstein, Fiore, Massaia, Piccioli, Pileri, Zavatto, D'Addio, Baccarani and Lemoli (2007). "Acute myeloid leukemia cells constitutively express the immunoregulatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase." *Leukemia* **21**(2): 353-5.
- Daghigh, Fukuto and Ash (1994). "Inhibition of rat liver arginase by an intermediate in NO biosynthesis, NG-hydroxy-L-arginine: implications for the regulation of nitric oxide biosynthesis by arginase." *Biochem Biophys Res Commun* **202**(1): 174-80.
- Dai and Gupta (1990). "Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression in human fibroblasts by interferon-gamma. Upstream control region discriminates between interferon-gamma and interferon-alpha." *J Biol Chem* **265**(32): 19871-7.
- Dardalhon, Awasthi, Kwon, Galileos, Gao, Sobel, Mitsdoerffer, Strom, Elyaman, Ho, Khoury, Oukka and Kuchroo (2008). "IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells." *Nat Immunol* **9**(12): 1347-55.
- Darrasse-Jeze, Bergot, Durgeau, Billiard, Salomon, Cohen, Bellier, Podsypanina and Klatzmann (2009). "Tumor emergence is sensed by self-specific CD44hi memory Tregs that create a dominant tolerogenic environment for tumors in mice." *J Clin Invest* **119**(9): 2648-62.
- Das, Groh, Kuijl, Sugita, Morita, Spies and Bukowski (2001). "MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function." *Immunity* **15**(1): 83-93.
- de Jonge, Hallemeesch, Kwikkers, Ruijter, de Gier-de Vries, van Roon, Meijer, Marescau, de Deyn, Deutz and Lamers (2002). "Overexpression of arginase I in enterocytes of transgenic mice elicits a selective arginine deficiency and affects skin, muscle, and lymphoid development." *Am J Clin Nutr* **76**(1): 128-40.
- de Sousa, Latini, Monteiro and Cerutti (2010). "Arginase 2 and nitric oxide synthase: Pathways associated with the pathogenesis of thyroid tumors." *Free Radic Biol Med*.
- de Vries, Trancikova, Ruiter and van Muijen (1998). "High expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, tyrosinase and TRP-1 in uveal melanoma." *Br J Cancer* **78**(9): 1156-61.
- Delgoffe, Kole, Zheng, Zarek, Matthews, Xiao, Worley, Kozma and Powell (2009). "The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment." *Immunity* **30**(6): 832-44.
- Della Chiesa, Carlomagno, Frumento, Balsamo, Cantoni, Conte, Moretta, Moretta and Vitale (2006). "The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of Nkp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function." *Blood* **108**(13): 4118-25.
- DeNardo, Andreu and Coussens (2010). "Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity." *Cancer Metastasis Rev* **29**(2): 309-16.
- DeNardo, Barreto, Andreu, Vasquez, Tawfik, Kolhatkar and Coussens (2009). "CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages." *Cancer Cell* **16**(2): 91-102.
- Di Pucchio, Pilla, Capone, Ferrantini, Montefiore, Urbani, Patuzzo, Pennacchioli, Santinami, Cova, Sovena, Arienti, Lombardo, Lombardi, Caporaso, D'Atri, Marchetti, Bonmassar, Parmiani, Belardelli and Rivoltini (2006). "Immunization of stage IV melanoma patients with Melan-A/MART-1 and gp100 peptides plus IFN-alpha results in the activation of specific CD8(+) T cells and monocyte/dendritic cell precursors." *Cancer Res* **66**(9): 4943-51.
- Diaz-Montero, Salem, Nishimura, Garrett-Mayer, Cole and Montero (2009). "Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy." *Cancer Immunol Immunother* **58**(1): 49-59.
- Diefenbach, Hsia, Hsiung and Raulet (2003). "A novel ligand for the NKG2D receptor activates NK cells and macrophages and induces tumor immunity." *Eur J Immunol* **33**(2): 381-91.
- Dighe, Richards, Old and Schreiber (1994). "Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors." *Immunity* **1**(6): 447-56.
- Djerbi, Screpanti, Catrina, Bogen, Biberfeld and Grandien (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, Strome, Salomao, Tamura, Hirano, Flies, Roche, Lu, Zhu, Tamada, Lennon, Celis and Chen (2002). "Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion." *Nat Med* **8**(8): 793-800.
- Dong, Zhu, Tamada and Chen (1999). "B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion." *Nat Med* **5**(12): 1365-9.
- Dorta, Landman, Kowalski, Lauris, Latorre and Oliveira (2002). "Tumour-associated tissue eosinophilia as a prognostic factor in oral squamous cell carcinomas." *Histopathology* **41**(2): 152-7.
- Du and Clemetson (2002). "Snake venom L-amino acid oxidases." *Toxicon* **40**(6): 659-65.

- Duenas-Gonzalez, Isales, del Mar Abad-Hernandez, Gonzalez-Sarmiento, Sanguenza and Rodriguez-Commes (1997). "Expression of inducible nitric oxide synthase in breast cancer correlates with metastatic disease." *Mod Pathol* **10**(7): 645-9.
- Dunbar, Smith, Chao, Salio, Shepherd, Mirza, Lipp, Lanzavecchia, Sallusto, Evans, Russell-Jones, Harris and Cerundolo (2000). "A shift in the phenotype of melan-A-specific CTL identifies melanoma patients with an active tumor-specific immune response." *J Immunol* **165**(11): 6644-52.
- Dunn, Bruce, Ikeda, Old and Schreiber (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." *Nat Immunol* **3**(11): 991-8.
- Dunn, Old and Schreiber (2004). "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting." *Immunity* **21**(2): 137-48.
- Dunn, Old and Schreiber (2004). "The three Es of cancer immunoediting." *Annu Rev Immunol* **22**: 329-60.
- Edwards, Cendan, Topping, Moldawer, MacKay, Copeland and Lind (1996). "Tumor cell nitric oxide inhibits cell growth in vitro, but stimulates tumorigenesis and experimental lung metastasis in vivo." *J Surg Res* **63**(1): 49-52.
- Edwards, Zhang, Frauwirth and Mosser (2006). "Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations." *J Leukoc Biol* **80**(6): 1298-307.
- Enk, Jonuleit, Saloga and Knop (1997). "Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma." *Int J Cancer* **73**(3): 309-16.
- Essner (2006). "Experimental frontiers for clinical applications: novel approaches to understanding mechanisms of lymph node metastases in melanoma." *Cancer Metastasis Rev* **25**(2): 257-67.
- Eyerich, Eyerich, Pennino, Carbone, Nasorri, Pallotta, Cianfarani, Odorisio, Traidl-Hoffmann, Behrendt, Durham, Schmidt-Weber and Cavani (2009). "Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling." *J Clin Invest* **119**(12): 3573-85.
- Fallarino, Grohmann, Hwang, Orabona, Vacca, Bianchi, Belladonna, Fioretti, Alegre and Puccetti (2003). "Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells." *Nat Immunol* **4**(12): 1206-12.
- Fallarino, Grohmann, You, McGrath, Cavener, Vacca, Orabona, Bianchi, Belladonna, Volpi, Santamaria, Fioretti and Puccetti (2006). "The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells." *J Immunol* **176**(11): 6752-61.
- Fallarino, Vacca, Orabona, Belladonna, Bianchi, Marshall, Keskin, Mellor, Fioretti, Grohmann and Puccetti (2002). "Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 alpha(+) dendritic cells." *Int Immunol* **14**(1): 65-8.
- Fallarino, Volpi, Fazio, Notartomaso, Vacca, Busceti, Biccato, Battaglia, Bruno, Puccetti, Fioretti, Nicoletti, Grohmann and Di Marco (2010). "Metabotropic glutamate receptor-4 modulates adaptive immunity and restrains neuroinflammation." *Nat Med* **16**(8): 897-902.
- Fazilleau, Mark, McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams (2009). "Follicular helper T cells: lineage and location." *Immunity* **30**(3): 324-35.
- Feng, Santoriello, Mione, Hurlstone and Martin (2010). "Live Imaging of Innate Immune Cell Sensing of Transformed Cells in Zebrafish Larvae: Parallels between Tumor Initiation and Wound Inflammation." *PLoS Biol* **8**(12): e1000562.
- Ferlazzo, Tsang, Moretta, Melioli, Steinman and Munz (2002). "Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells." *J Exp Med* **195**(3): 343-51.
- Fernandez-Acenero, Galindo-Gallego, Sanz and Aljama (2000). "Prognostic influence of tumor-associated eosinophilic infiltrate in colorectal carcinoma." *Cancer* **88**(7): 1544-8.
- Ferris, Whiteside and Ferrone (2006). "Immune escape associated with functional defects in antigen-processing machinery in head and neck cancer." *Clin Cancer Res* **12**(13): 3890-5.
- Filaci, Fenoglio and Indiveri (2011). "CD8(+) T regulatory/suppressor cells and their relationships with autoreactivity and autoimmunity." *Autoimmunity*.
- Finak, Bertos, Pepin, Sadekova, Souleimanova, Zhao, Chen, Omeroglu, Meterissian, Omeroglu, Hallett and Park (2008). "Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer." *Nat Med* **14**(5): 518-27.
- Finocchietto, Franco, Holod, Gonzalez, Converso, Arciuch, Serra, Poderoso and Carreras (2009). "Mitochondrial nitric oxide synthase: a masterpiece of metabolic adaptation, cell growth, transformation, and death." *Exp Biol Med (Maywood)* **234**(9): 1020-8.
- Fisher, Virmani, Wu, Aplenc, Harper, Powell, Rebbeck, Sidransky, Gazdar and El-Deiry (2001). "Nucleotide substitution in the ectodomain of trail receptor DR4 is associated with lung cancer and head and neck cancer." *Clin Cancer Res* **7**(6): 1688-97.
- Flies and Chen (2006). "Modulation of immune response by B7 family molecules in tumor microenvironments." *Immunol Invest* **35**(3-4): 395-418.
- Fonsatti, Sigalotti, Coral, Colizzi, Altomonte and Maio (2003). "Methylation-regulated expression of HLA class I antigens in melanoma." *Int J Cancer* **105**(3): 430-1; author reply 432-3.

- Fossiez, Djossou, Chomarat, Flores-Romo, Ait-Yahia, Maat, Pin, Garrone, Garcia, Saeland, Blanchard, Gaillard, Das Mahapatra, Rouvier, Golstein, Banchereau and Lebecque (1996). "*T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines.*" J Exp Med **183**(6): 2593-603.
- Fournel, Aguerre-Girr, Huc, Lenfant, Alam, Toubert, Bensussan and Le Bouteiller (2000). "*Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8.*" J Immunol **164**(12): 6100-4.
- Friberg, Jennings, Alsarraj, Dessureault, Cantor, Extermann, Mellor, Munn and Antonia (2002). "*Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection.*" Int J Cancer **101**(2): 151-5.
- Fridlender, Sun, Kim, Kapoor, Cheng, Ling, Worthen and Albelda (2009). "*Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN.*" Cancer Cell **16**(3): 183-94.
- Frumento, Rotondo, Tonetti, Damonte, Benatti and Ferrara (2002). "*Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase.*" J Exp Med **196**(4): 459-68.
- Fujigaki, Saito, Sekikawa, Tone, Takikawa, Fujii, Wada, Noma and Seishima (2001). "*Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN-gamma-independent mechanism.*" Eur J Immunol **31**(8): 2313-8.
- Fujii, Yamashita, Ishiguro, Tashiro and Kameyama (2002). "*Significance of epidermal growth factor receptor and tumor associated tissue eosinophilia in the prognosis of patients with nasopharyngeal carcinoma.*" Auris Nasus Larynx **29**(2): 175-81.
- Fukumura, Kashiwagi and Jain (2006). "*The role of nitric oxide in tumour progression.*" Nat Rev Cancer **6**(7): 521-34.
- Gabrilovich (2004). "*Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects.*" Nat Rev Immunol **4**(12): 941-52.
- Gabrilovich, Bronte, Chen, Colombo, Ochoa, Ostrand-Rosenberg and Schreiber (2007). "*The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells.*" Cancer Res **67**(1): 425; author reply 426.
- Gabrilovich, Corak, Ciernik, Kavanaugh and Carbone (1997). "*Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer.*" Clin Cancer Res **3**(3): 483-90.
- Gabrilovich, Ishida, Oyama, Ran, Kravtsov, Nadaf and Carbone (1998). "*Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo.*" Blood **92**(11): 4150-66.
- Gabrilovich and Nagaraj (2009). "*Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system.*" Nat Rev Immunol **9**(3): 162-74.
- Gabrilovich, Velders, Sotomayor and Kast (2001). "*Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells.*" J Immunol **166**(9): 5398-406.
- Gallina, Dolcetti, Serafini, De Santo, Marigo, Colombo, Basso, Brombacher, Borrello, Zanovello, Biccato and Bronte (2006). "*Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells.*" J Clin Invest **116**(10): 2777-90.
- Galon, Costes, Sanchez-Cabo, Kirilovsky, Mlecnik, Lagorce-Pages, Tosolini, Camus, Berger, Wind, Zinzindohoue, Bruneval, Cugnenc, Trajanoski, Fridman and Pages (2006). "*Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome.*" Science **313**(5795): 1960-4.
- Galon, Fridman and Pages (2007). "*The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective.*" Cancer Res **67**(5): 1883-6.
- Garg, Nowis, Golab, Vandenabeele, Krysko and Agostinis (2010). "*Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation.*" Biochim Biophys Acta **1805**(1): 53-71.
- Gerber and Mosser (2001). "*Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors.*" J Immunol **166**(11): 6861-8.
- Gershon and Kondo (1970). "*Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes.*" Immunology **18**(5): 723-37.
- Geyer, Fitzpatrick, Pawelek, Kitzing, Vrieling, Ghisla and Macheroux (2001). "*Structure and characterization of the glycan moiety of L-amino-acid oxidase from the Malayan pit viper Calloselasma rhodostoma.*" Eur J Biochem **268**(14): 4044-53.
- Ghebeh, Tulbah, Mohammed, Elkum, Bin Amer, Al-Tweigeri and Dermime (2007). "*Expression of B7-H1 in breast cancer patients is strongly associated with high proliferative Ki-67-expressing tumor cells.*" Int J Cancer **121**(4): 751-8.
- Ghiringhelli, Menard, Terme, Flament, Taieb, Chaput, Puig, Novault, Escudier, Vivier, Lecesne, Robert, Blay, Bernard, Caillat-Zucman, Freitas, Tursz, Wagner-Ballon, Capron, Vainchenker, Martin and Zitvogel (2005). "*CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner.*" J Exp Med **202**(8): 1075-85.
- Ghiringhelli, Puig, Roux, Parcellier, Schmitt, Solary, Kroemer, Martin, Chauffert and Zitvogel (2005). "*Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation.*" J Exp Med **202**(7): 919-29.

- Girardi, Oppenheim, Steele, Lewis, Glusac, Filler, Hobby, Sutton, Tigelaar and Hayday (2001). "Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells." *Science* **294**(5542): 605-9.
- Glatzel, Entschladen, Zollner, Kraiczky, Brade, Kaufmann, Janssen, Lengel-Janssen, Wesch and Kabelitz (2002). "The responsiveness of human V delta 1 gamma delta T cells to *Borrelia burgdorferi* is largely restricted to synovial-fluid cells from patients with Lyme arthritis." *J Infect Dis* **186**(7): 1043-6.
- Glennie, French, Cragg and Taylor (2007). "Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies." *Mol Immunol* **44**(16): 3823-37.
- Glimcher and Murphy (2000). "Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up." *Genes Dev* **14**(14): 1693-711.
- Gober, Kistowska, Angman, Jeno, Mori and De Libero (2003). "Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells." *J Exp Med* **197**(2): 163-8.
- Godfrey, Pellicci, Patel, Kjer-Nielsen, McCluskey and Rossjohn (2010). "Antigen recognition by CD1d-restricted NKT T cell receptors." *Semin Immunol* **22**(2): 61-7.
- Goff, Smith, Klapper, Sherry, Wunderlich, Steinberg, White, Rosenberg, Dudley and Yang (2010). "Tumor Infiltrating Lymphocyte Therapy for Metastatic Melanoma: Analysis of Tumors Resected for TIL." *J Immunother* **33**(8): 840-7.
- Goldsmith, Belchis, Cresson, Merritt and Askin (1992). "The importance of the eosinophil in head and neck cancer." *Otolaryngol Head Neck Surg* **106**(1): 27-33.
- Goldstein, Varghese, Brody, Rajapaksa, Kohrt, Czerwinski, Levy and Levy (2011). "A CpG-loaded tumor cell vaccine induces anti-tumor CD4+ T cells that are effective in adoptive therapy for large and established tumors." *Blood*.
- Gomes, Martins and Silva-Santos (2010). "Targeting gammadelta T lymphocytes for cancer immunotherapy: from novel mechanistic insight to clinical application." *Cancer Res* **70**(24): 10024-7.
- Gondek, Lu, Quezada, Sakaguchi and Noelle (2005). "Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism." *J Immunol* **174**(4): 1783-6.
- Gonzalvez and Ashkenazi (2010). "New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL." *Oncogene* **29**(34): 4752-65.
- Gordon (2003). "Alternative activation of macrophages." *Nat Rev Immunol* **3**(1): 23-35.
- Gotoh, Araki and Mori (1997). "Chromosomal localization of the human arginase II gene and tissue distribution of its mRNA." *Biochem Biophys Res Commun* **233**(2): 487-91.
- Greifengberg, Ribechini, Rossner and Lutz (2009). "Myeloid-derived suppressor cell activation by combined LPS and IFN-gamma treatment impairs DC development." *Eur J Immunol* **39**(10): 2865-76.
- Grivennikov, Greten and Karin (2010). "Immunity, inflammation, and cancer." *Cell* **140**(6): 883-99.
- Grohmann, Orabona, Fallarino, Vacca, Calcinario, Falorni, Candeloro, Belladonna, Bianchi, Fioretti and Puccetti (2002). "CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo." *Nat Immunol* **3**(11): 1097-101.
- Gros, Cabillic, Toutirais, Maux, Sebti and Amiot (2008). "Soluble HLA-G molecules impair natural killer/dendritic cell crosstalk via inhibition of dendritic cells." *Eur J Immunol* **38**(3): 742-9.
- Gross, Stuehr, Aisaka, Jaffe, Levi and Griffith (1990). "Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis: cell-type selective inhibition by NG-aminoarginine, NG-nitroarginine and NG-methylarginine." *Biochem Biophys Res Commun* **170**(1): 96-103.
- Grossman, Verbsky, Barchet, Colonna, Atkinson and Ley (2004). "Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death." *Immunity* **21**(4): 589-601.
- Groux, O'Garra, Bigler, Rouleau, Antonenko, de Vries and Roncarolo (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." *Nature* **389**(6652): 737-42.
- Guinan, Gribben, Boussiotis, Freeman and Nadler (1994). "Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity." *Blood* **84**(10): 3261-82.
- Guitier, Dusanter-Fourt, Copie-Bergman, Boulland, Le Gouvello, Gaulard, Leroy and Castellano (2004). "Constitutive STAT6 activation in primary mediastinal large B-cell lymphoma." *Blood* **104**(2): 543-9.
- Gupta, Carlin, Pyati, Dai, Pfefferkorn and Murphy (1994). "Antiparasitic and antiproliferative effects of indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme expression in human fibroblasts." *Infect Immun* **62**(6): 2277-84.
- Gutterman (1994). "Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(4): 1198-205.
- Hanahan and Folkman (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." *Cell* **86**(3): 353-64.
- Hanahan and Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hanson, Clements, Sinha, Ilkovitch and Ostrand-Rosenberg (2009). "Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells." *J Immunol* **183**(2): 937-44.
- Hao, Sharp, Ross-Inta, McDaniel, Anthony, Wek, Cavener, McGrath, Rudell, Koehnle and Gietzen (2005). "Uncharged tRNA and sensing of amino acid deficiency in mammalian piriform cortex." *Science* **307**(5716): 1776-8.

- Harding and Song (1994). "Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules." *J Immunol* **153**(11): 4925-33.
- Harrington, Hatton, Mangan, Turner, Murphy, Murphy and Weaver (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." *Nat Immunol* **6**(11): 1123-32.
- Harris and Lawrence (2003). "TOR signaling." *Sci STKE* **2003**(212): re15.
- Hassanain, Chon and Gupta (1993). "Differential regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression by interferons-gamma and -alpha. Analysis of the regulatory region of the gene and identification of an interferon-gamma-inducible DNA-binding factor." *J Biol Chem* **268**(7): 5077-84.
- Hayashi, Rao, Takabayashi, Van Uden, Kornbluth, Baird, Taylor, Carson, Catanzaro and Raz (2001). "Enhancement of innate immunity against *Mycobacterium avium* infection by immunostimulatory DNA is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase." *Infect Immun* **69**(10): 6156-64.
- Hermine, Haioun, Lepage, d'Agay, Briere, Lavignac, Fillet, Salles, Marolleau, Diebold, Reyas and Gaulard (1996). "Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA)." *Blood* **87**(1): 265-72.
- Hicklin, Wang, Arienti, Rivoltini, Parmiani and Ferrone (1998). "beta2-Microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma." *J Clin Invest* **101**(12): 2720-9.
- Hilders, Houbiers, van Ravenswaay Claasen, Veldhuizen and Fleuren (1993). "Association between HLA-expression and infiltration of immune cells in cervical carcinoma." *Lab Invest* **69**(6): 651-9.
- Hirahara, Nio, Sasaki, Minari, Takamura, Iguchi, Dong, Yamasawa and Tamura (2001). "Inoculation of human interleukin-17 gene-transfected Meth-A fibrosarcoma cells induces T cell-dependent tumor-specific immunity in mice." *Oncology* **61**(1): 79-89.
- Hodi, Mihm, Soiffer, Haluska, Butler, Seiden, Davis, Henry-Spires, MacRae, Willman, Padera, Jaklitsch, Shankar, Chen, Korman, Allison and Dranoff (2003). "Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(8): 4712-7.
- Hodi, O'Day, McDermott, Weber, Sosman, Haanen, Gonzalez, Robert, Schadendorf, Hassel, Akerley, van den Eertwegh, Lutzky, Lorigan, Vaubel, Linette, Hogg, Ottensmeier, Lebbe, Peschel, Quirt, Clark, Wolchok, Weber, Tian, Yellin, Nichol, Hoos and Urban (2010). "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma." *N Engl J Med* **363**(8): 711-23.
- Hofbauer, Kamarashev, Geertsen, Boni and Dummer (1998). "Melan A/MART-1 immunoreactivity in formalin-fixed paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution." *Melanoma Res* **8**(4): 337-43.
- Honorati, Neri, Cattini and Facchini (2006). "Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts." *Osteoarthritis Cartilage* **14**(4): 345-52.
- Hsiao, Liu, Wang, Lo, Wu, Jiang and Lai (2009). "Deltex1 is a target of the transcription factor NFAT that promotes T cell anergy." *Immunity* **31**(1): 72-83.
- Huang, Pan, Li, Sato, Levy, Bromberg, Divino and Chen (2006). "Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host." *Cancer Res* **66**(2): 1123-31.
- Huber, Schramm, Lehr, Mann, Schmitt, Becker, Protschka, Galle, Neurath and Blessing (2004). "Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells." *J Immunol* **173**(11): 6526-31.
- Hughes (2010). "Origin and diversification of the L-amino oxidase family in innate immune defenses of animals." *Immunogenetics* **62**(11-12): 753-9.
- Hwu, Du, Lapointe, Do, Taylor and Young (2000). "Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation." *J Immunol* **164**(7): 3596-9.
- Ibiza, Victor, Bosca, Ortega, Urzainqui, O'Connor, Sanchez-Madrid, Esplugues and Serrador (2006). "Endothelial nitric oxide synthase regulates T cell receptor signaling at the immunological synapse." *Immunity* **24**(6): 753-65.
- Ibrahim, Ringel, Schmidt, Ringel, Muller, Koczan, Thiesen and Lohr (2001). "Pancreatic adenocarcinoma cell lines show variable susceptibility to TRAIL-mediated cell death." *Pancreas* **23**(1): 72-9.
- Ikeda, Old and Schreiber (2002). "The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting." *Cytokine Growth Factor Rev* **13**(2): 95-109.
- Inaba, Ino, Kajiyama, Shibata, Yamamoto, Kondo, Umezumi, Nawa, Takikawa and Kikkawa (2010). "Indoleamine 2,3-dioxygenase expression predicts impaired survival of invasive cervical cancer patients treated with radical hysterectomy." *Gynecol Oncol* **117**(3): 423-8.
- Ishibashi, Ohashi, Suzuki, Miyazaki, Moriya, Satomi and Sasano (2006). "Tumor-associated tissue eosinophilia in human esophageal squamous cell carcinoma." *Anticancer Res* **26**(2B): 1419-24.
- Ishida, Ishii, Inagaki, Yano, Komatsu, Iida, Inagaki and Ueda (2006). "Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege." *Cancer Res* **66**(11): 5716-22.

- Ishida, Oyama, Carbone and Gabrilovich (1998). "Defective function of Langerhans cells in tumor-bearing animals is the result of defective maturation from hemopoietic progenitors." J Immunol **161**(9): 4842-51.
- Iyer, Yoo, Kern, Rozenfurt, Tsoa, O'Brien, Yu, Grody and Cederbaum (2002). "Mouse model for human arginase deficiency." Mol Cell Biol **22**(13): 4491-8.
- Jalkanen and Salmi (2008). "VAP-1 and CD73, endothelial cell surface enzymes in leukocyte extravasation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(1): 18-26.
- Janssen, Lemmens, Wolfe, Christen, von Herrath and Schoenberger (2003). "CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes." Nature **421**(6925): 852-6.
- Jarnicki, Lysaght, Todryk and Mills (2006). "Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells." J Immunol **177**(2): 896-904.
- Jenkinson, Grody and Cederbaum (1996). "Comparative properties of arginases." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **114**(1): 107-32.
- Jiang, Zhang and Pernis (1992). "Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis." Science **256**(5060): 1213-5.
- Johansson, Egyhazi, Masucci, Harlin, Mougiakakos, Poschke, Nilsson, Garberg, Tuominen, Linden, Stolt, Hansson and Kiessling (2009). "Prognostic significance of tumor iNOS and COX-2 in stage III malignant cutaneous melanoma." Cancer Immunol Immunother **58**(7): 1085-94.
- Johansson, Mougiakakos, Trocme, All-Ericsson, Economou, Larsson, Seregard and Kiessling (2009). "Expression and prognostic significance of iNOS in uveal melanoma." Int J Cancer.
- Jung, Mai, Iwamoto, Arizono, Fujimoto, Sakamaki and Yonehara (2000). "Purification and cloning of an apoptosis-inducing protein derived from fish infected with *Anisakis simplex*, a causative nematode of human anisakiasis." J Immunol **165**(3): 1491-7.
- Kagi, Vignaux, Ledermann, Burki, Depraetere, Nagata, Hengartner and Golstein (1994). "Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity." Science **265**(5171): 528-30.
- Kanyo, Scolnick, Ash and Christianson (1996). "Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase." Nature **383**(6600): 554-7.
- Karanikas, Zamanakou, Kerenidi, Dahabreh, Hevas, Nakou, Gourgoulianis and Germentis (2007). "Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in lung cancer." Cancer Biol Ther **6**(8): 1258-62.
- Karre, Klein, Kiessling, Klein and Roder (1980). "Low natural in vivo resistance to syngeneic leukaemias in natural killer-deficient mice." Nature **284**(5757): 624-6.
- Karre, Klein, Kiessling, Klein and Roder (1980). "In vitro NK-activity and in vivo resistance to leukemia: studies of beige, beige/nude and wild-type hosts on C57BL background." Int J Cancer **26**(6): 789-97.
- Kasaian, Whitters, Carter, Lowe, Jussif, Deng, Johnson, Witek, Senices, Konz, Wurster, Donaldson, Collins, Young and Grusby (2002). "IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity." Immunity **16**(4): 559-69.
- Kawaida, Kono, Takahashi, Sugai, Mimura, Miyagawa, Omata, Ooi and Fujii (2005). "Distribution of CD4+CD25high regulatory T-cells in tumor-draining lymph nodes in patients with gastric cancer." J Surg Res **124**(1): 151-7.
- Kawano, Cui, Koezuka, Toura, Kaneko, Motoki, Ueno, Nakagawa, Sato, Kondo, Koseki and Taniguchi (1997). "CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides." Science **278**(5343): 1626-9.
- Kawano, Cui, Koezuka, Toura, Kaneko, Sato, Kondo, Harada, Koseki, Nakayama, Tanaka and Taniguchi (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, Nakayama, Kamada, Kaneko, Harada, Ogura, Akutsu, Motohashi, Iizasa, Endo, Fujisawa, Shinkai and Taniguchi (1999). "Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V alpha24 NKT cells." Cancer Res **59**(20): 5102-5.
- Kehlen, Thiele, Riemann, Rainov and Langner (1999). "Interleukin-17 stimulates the expression of IkappaB alpha mRNA and the secretion of IL-6 and IL-8 in glioblastoma cell lines." J Neuroimmunol **101**(1): 1-6.
- Kiessling, Wasserman, Horiguchi, Kono, Sjoberg, Pisa and Petersson (1999). "Tumor-induced immune dysfunction." Cancer Immunol Immunother **48**(7): 353-62.
- Kingsley, Karim, Bushell and Wood (2002). "CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses." J Immunol **168**(3): 1080-6.
- Kirk, Regan, Wasserkrug, Sodeyama and Barbul (1992). "Arginine enhances T-cell responses in athymic nude mice." JPEN J Parenter Enteral Nutr **16**(5): 429-32.
- Klotz, Bloch, Volberg, Engelmann and Addicks (1998). "Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma." Cancer **82**(10): 1897-903.
- Kmieciak, Knutson, Dumur and Manjili (2007). "HER-2/neu antigen loss and relapse of mammary carcinoma are actively induced by T cell-mediated anti-tumor immune responses." Eur J Immunol **37**(3): 675-85.

- Kobayashi, Motoki, Uchida, Fukushima and Koezuka (1995). "*KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities.*" *Oncol Res* **7**(10-11): 529-34.
- Koebel, Vermi, Swann, Zerafa, Rodig, Old, Smyth and Schreiber (2007). "*Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state.*" *Nature* **450**(7171): 903-7.
- Kono, Salazar-Onfray, Petersson, Hansson, Masucci, Wasserman, Nakazawa, Anderson and Kiessling (1996). "*Hydrogen peroxide secreted by tumor-derived macrophages down-modulates signal-transducing zeta molecules and inhibits tumor-specific T cell-and natural killer cell-mediated cytotoxicity.*" *Eur J Immunol* **26**(6): 1308-13.
- Kronenberg and Havran (2007). "*Frontline T cells: gammadelta T cells and intraepithelial lymphocytes.*" *Immunol Rev* **215**: 5-7.
- Krummel and Allison (1996). "*CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells.*" *J Exp Med* **183**(6): 2533-40.
- Kryczek, Banerjee, Cheng, Vatan, Szeliga, Wei, Huang, Finlayson, Simeone, Welling, Chang, Coukos, Liu and Zou (2009). "*Phenotype, distribution, generation, and functional relevance of Th17 cells in the human tumor environments.*" *Blood* **114**(6): 1141-9.
- Kryczek, Wei, Szeliga, Vatan and Zou (2009). "*Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis.*" *Blood* **114**(2): 357-9.
- Kryczek, Wei, Zhu, Myers, Mottram, Cheng, Chen, Coukos and Zou (2007). "*Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma.*" *Cancer Res* **67**(18): 8900-5.
- Kryczek, Wei, Zou, Altuwajri, Szeliga, Kolls, Chang and Zou (2007). "*Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment.*" *J Immunol* **178**(11): 6730-3.
- Kryczek, Wei, Zou, Zhu, Mottram, Xu, Chen and Zou (2006). "*Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells.*" *J Immunol* **177**(1): 40-4.
- Kryczek, Zou, Rodriguez, Zhu, Wei, Mottram, Brumlik, Cheng, Curiel, Myers, Lackner, Alvarez, Ochoa, Chen and Zou (2006). "*B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma.*" *J Exp Med* **203**(4): 871-81.
- Kuppers (2009). "*Molecular biology of Hodgkin lymphoma.*" *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 491-6.
- Kurosawa, Harada, Matsuzaki, Shinomiya, Terao, Kobayashi and Nomoto (1995). "*Early-appearing tumour-infiltrating natural killer cells play a crucial role in the generation of anti-tumour T lymphocytes.*" *Immunology* **85**(2): 338-46.
- Kusmartsev, Cheng, Yu, Nefedova, Sotomayor, Lush and Gabrilovich (2003). "*All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination.*" *Cancer Res* **63**(15): 4441-9.
- Kusmartsev and Gabrilovich (2005). "*STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion.*" *J Immunol* **174**(8): 4880-91.
- Kusmartsev, Nagaraj and Gabrilovich (2005). "*Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells.*" *J Immunol* **175**(7): 4583-92.
- Kusmartsev, Su, Heiser, Dannull, Eruslanov, Kubler, Yancey, Dahm and Vieweg (2008). "*Reversal of myeloid cell-mediated immunosuppression in patients with metastatic renal cell carcinoma.*" *Clin Cancer Res* **14**(24): 8270-8.
- Kwong, Roberts, Silberzahn, Filler, Neustadter, Galan, Reddy, Lin, Ellis, Langford, Hayday and Girardi (2010). "*Molecular analysis of tumor-promoting CD8+ T cells in two-stage cutaneous chemical carcinogenesis.*" *J Invest Dermatol* **130**(6): 1726-36.
- La Motte, Sharpe, Bluestone and Mokyr (1999). "*Host B7-1 and B7-2 costimulatory molecules contribute to the eradication of B7-1-transfected P815 tumor cells via a CD8+ T cell-dependent mechanism.*" *J Immunol* **162**(8): 4817-23.
- Lahdenranta, Hagendoorn, Padera, Hoshida, Nelson, Kashiwagi, Jain and Fukumura (2009). "*Endothelial nitric oxide synthase mediates lymphangiogenesis and lymphatic metastasis.*" *Cancer Res* **69**(7): 2801-8.
- Landowski, Qu, Buyuksal, Painter and Dalton (1997). "*Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma.*" *Blood* **90**(11): 4266-70.
- Lanier (2005). "*NK cell recognition.*" *Annu Rev Immunol* **23**: 225-74.
- Lathers, Lubbers, Wright and Young (1999). "*Dendritic cell differentiation pathways of CD34+ cells from the peripheral blood of head and neck cancer patients.*" *J Leukoc Biol* **65**(5): 623-8.
- Lathrop, Santacruz, Pham, Luo and Hsieh (2008). "*Antigen-specific peripheral shaping of the natural regulatory T cell population.*" *J Exp Med* **205**(13): 3105-17.
- Law, Lukoyanova, Voskoboinik, Caradoc-Davies, Baran, Dunstone, D'Angelo, Orlova, Coulibaly, Verschoor, Browne, Ciccone, Kuiper, Bird, Trapani, Saibil and Whisstock (2010). "*The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin.*" *Nature* **468**(7322): 447-51.
- Le Friec, Gros, Sebti, Guilloux, Pangault, Fauchet and Amiot (2004). "*Capacity of myeloid and plasmacytoid dendritic cells especially at mature stage to express and secrete HLA-G molecules.*" *J Leukoc Biol* **76**(6): 1125-33.

- Leach, Krummel and Allison (1996). "Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade." *Science* **271**(5256): 1734-6.
- Lee, Chuang, Griffin, Khattri, Hong, Zhang, Straus, Samelson, Thompson and Bluestone (1998). "Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4." *Science* **282**(5397): 2263-6.
- Lee, Kim, Yang, Kong, Oh, Jeong, Chung, Bae, Shin, Hong and Choi (2010). "Peripheral blood gene expression of B7 and CD28 family members associated with tumor progression and microscopic lymphovascular invasion in colon cancer patients." *J Cancer Res Clin Oncol* **136**(9): 1445-52.
- Lee, Min, Jang, Hong and Hwang (2010). "In vivo tumor suppression activity by T cell-specific T-bet restoration." *Int J Cancer* **127**(9): 2129-37.
- Lee, Yee, Savage, Fong, Brockstedt, Weber, Johnson, Swetter, Thompson, Greenberg, Roederer and Davis (1999). "Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients." *Nat Med* **5**(6): 677-85.
- Legrand, Driss, Delbeke, Loiseau, Hermann, Dombrowicz and Capron (2010). "Human eosinophils exert TNF-alpha and granzyme A-mediated tumoricidal activity toward colon carcinoma cells." *J Immunol* **185**(12): 7443-51.
- Leithauser, Dhein, Mechttersheimer, Koretz, Bruderlein, Henne, Schmidt, Debatin, Krammer and Moller (1993). "Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells." *Lab Invest* **69**(4): 415-29.
- Leitner, Grabmeier-Pfistershammer and Steinberger (2010). "Receptors and ligands implicated in human T cell costimulatory processes." *Immunol Lett* **128**(2): 89-97.
- Lengagne, Le Gal, Garcette, Fiette, Ave, Kato, Briand, Massot, Nakashima, Renia, Guillet and Prevost-Blondel (2004). "Spontaneous vitiligo in an animal model for human melanoma: role of tumor-specific CD8+ T cells." *Cancer Res* **64**(4): 1496-501.
- Lewis and Pollard (2006). "Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments." *Cancer Res* **66**(2): 605-12.
- Li, Jia, Xie, Wang, Wang, He, Lin and Hu (2009). "Association of constitutive nuclear factor-kappaB activation with aggressive aspects and poor prognosis in cervical cancer." *Int J Gynecol Cancer* **19**(8): 1421-6.
- Li, Sze, Brown, Cowley, Kaplan, Mo, Yang, Akililu, Kabani, Loh, Yamagishi, Chen, Ho and Joshua (2010). "Clonal expansions of cytotoxic T cells exist in the blood of patients with Waldenstrom macroglobulinemia but exhibit anergic properties and are eliminated by nucleoside analogue therapy." *Blood* **115**(17): 3580-8.
- Li, Wu, Zhang, Li, Sun, Yu, Yin, Deng, Yin and Wang (2011). "Triple expression of B7-1, B7-2 and 4-1BBL enhanced antitumor immune response against mouse H22 hepatocellular carcinoma." *J Cancer Res Clin Oncol*.
- Lim, Ancrile, Kashatus and Counter (2008). "Tumour maintenance is mediated by eNOS." *Nature* **452**(7187): 646-9.
- Limmer, Ohl, Kurts, Ljunggren, Reiss, Groettrup, Momburg, Arnold and Knolle (2000). "Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance." *Nat Med* **6**(12): 1348-54.
- Littlejohn, Takikawa, Truscott and Walker (2003). "Asp274 and his346 are essential for heme binding and catalytic function of human indoleamine 2,3-dioxygenase." *J Biol Chem* **278**(32): 29525-31.
- Liu, Wang, Wang, Feng, Ko, Liu, Wu, Chu, Chung, Kuo, Lee, Lin, Lin, Wang, Yu and Kuo (2009). "Population alterations of L: -arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b(+)/CD14 (-)/CD15 (+)/CD33 (+) myeloid-derived suppressor cells and CD8 (+) T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer." *J Cancer Res Clin Oncol*.
- Liu, Wong, Jang, Shah, Park, Yang, Zhang, Lonning, Teicher and Lee (2007). "Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta." *J Immunol* **178**(5): 2883-92.
- Liu, Yu, Kappes, Wang, Grizzle, Zinn and Zhang (2007). "Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host." *Blood* **109**(10): 4336-42.
- Liyanage, Moore, Joo, Tanaka, Herrmann, Doherty, Drebin, Strasberg, Eberlein, Goedegebuure and Linehan (2002). "Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma." *J Immunol* **169**(5): 2756-61.
- Ljunggren and Karre (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition." *Immunol Today* **11**(7): 237-44.
- Lob, Konigsrainer, Zieker, Brucher, Rammensee, Opelz and Terness (2009). "IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism." *Cancer Immunol Immunother* **58**(1): 153-7.
- Loeb (1991). "Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis." *Cancer Res* **51**(12): 3075-9.
- Loeb, Loeb and Anderson (2003). "Multiple mutations and cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(3): 776-81.
- Lohr, Knoechel, Jiang, Sharpe and Abbas (2003). "The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens." *Nat Immunol* **4**(7): 664-9.
- Lohse, Schwerdt, Herkel, Spahn and Meyer zum Buschenfelde (1995). "Lack of requirement for CD8+ cells in recovery from and resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Autoimmun* **8**(3): 395-404.

- Lorsbach, Murphy, Lowenstein, Snyder and Russell (1993). "Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide." *J Biol Chem* **268**(3): 1908-13.
- Loser, Apelt, Voskort, Mohaupt, Balkow, Schwarz, Grabbe and Beissert (2007). "IL-10 controls ultraviolet-induced carcinogenesis in mice." *J Immunol* **179**(1): 365-71.
- Loser, Scherer, Krummen, Varga, Higuchi, Schwarz, Sharpe, Grabbe, Bluestone and Beissert (2005). "An important role of CD80/CD86-CTLA-4 signaling during photocarcinogenesis in mice." *J Immunol* **174**(9): 5298-305.
- Lotfi, Lee and Lotze (2007). "Eosinophilic granulocytes and damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs): role in the inflammatory response within tumors." *J Immunother* **30**(1): 16-28.
- Lotze and Tracey (2005). "High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal." *Nat Rev Immunol* **5**(4): 331-42.
- Luster and Leder (1993). "IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo." *J Exp Med* **178**(3): 1057-65.
- Luster and Ravetch (1987). "Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10)." *J Exp Med* **166**(4): 1084-97.
- Ma, Whitters, Konz, Senices, Young, Grusby, Collins and Dunussi-Joannopoulos (2003). "IL-21 activates both innate and adaptive immunity to generate potent antitumor responses that require perforin but are independent of IFN-gamma." *J Immunol* **171**(2): 608-15.
- Macher-Goeppinger, Aulmann, Wagener, Funke, Tagscherer, Haferkamp, Hohenfellner, Kim, Autschbach, Schirmacher and Roth (2008). "Decoy receptor 3 is a prognostic factor in renal cell cancer." *Neoplasia* **10**(10): 1049-56.
- Mackensen, Carcelain, Viel, Raynal, Michalaki, Triebel, Bosq and Hercend (1994). "Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma." *J Clin Invest* **93**(4): 1397-402.
- MacKenzie, Hadding and Daubener (1998). "Interferon-gamma-induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group B streptococci." *J Infect Dis* **178**(3): 875-8.
- Macphail, Gibney, Brooks, Booth, Flanagan and Coleman (2003). "Nitric oxide regulation of human peripheral blood mononuclear cells: critical time dependence and selectivity for cytokine versus chemokine expression." *J Immunol* **171**(9): 4809-15.
- Maczek, Berger, Schuler-Thurner, Schultz, Hamann, Dunbar, Cerundolo, Steinkasserer and Schuler (2005). "Differences in phenotype and function between spontaneously occurring melan-A-, tyrosinase- and influenza matrix peptide-specific CTL in HLA-A*0201 melanoma patients." *Int J Cancer* **115**(3): 450-5.
- Magram, Connaughton, Warriar, Carvajal, Wu, Ferrante, Stewart, Sarmiento, Faherty and Gately (1996). "IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses." *Immunity* **4**(5): 471-81.
- Maker, Phan, Attia, Yang, Sherry, Topalian, Kammula, Royal, Haworth, Levy, Kleiner, Mavroukakis, Yellin and Rosenberg (2005). "Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study." *Ann Surg Oncol* **12**(12): 1005-16.
- Mandruzzato, Solito, Falisi, Francescato, Chiarion-Sileni, Mocellin, Zanon, Rossi, Nitti, Bronte and Zanovello (2009). "IL4Ralpha+ myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients." *J Immunol* **182**(10): 6562-8.
- Maniar, Zhang, Lin, Gastman, Pauza, Strome and Chapoval (2010). "Human gammadelta T lymphocytes induce robust NK cell-mediated antitumor cytotoxicity through CD137 engagement." *Blood* **116**(10): 1726-33.
- Mantovani, Sica, Sozzani, Allavena, Vecchi and Locati (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." *Trends Immunol* **25**(12): 677-86.
- Mantovani, Sozzani, Locati, Allavena and Sica (2002). "Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes." *Trends Immunol* **23**(11): 549-55.
- Marin, Ruiz-Cabello, Pedrinaci, Mendez, Jimenez, Geraghty and Garrido (2003). "Analysis of HLA-E expression in human tumors." *Immunogenetics* **54**(11): 767-75.
- Marincola, Jaffee, Hicklin and Ferrone (2000). "Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance." *Adv Immunol* **74**: 181-273.
- Markiewski, DeAngelis, Benencia, Ricklin-Lichtsteiner, Koutoulaki, Gerard, Coukos and Lambris (2008). "Modulation of the antitumor immune response by complement." *Nat Immunol* **9**(11): 1225-35.
- Marrack, Kappler and Mitchell (1999). "Type I interferons keep activated T cells alive." *J Exp Med* **189**(3): 521-30.
- Martinez, Sica, Mantovani and Locati (2008). "Macrophage activation and polarization." *Front Biosci* **13**: 453-61.
- Marzo, Lake, Lo, Sherman, McWilliam, Nelson, Robinson and Scott (1999). "Tumor antigens are constitutively presented in the draining lymph nodes." *J Immunol* **162**(10): 5838-45.
- Mason, Naidu, Barcia, Porti, Chavan and Chu (2004). "IL-4-induced gene-1 is a leukocyte L-amino acid oxidase with an unusual acidic pH preference and lysosomal localization." *J Immunol* **173**(7): 4561-7.
- Matikainen, Sareneva, Ronni, Lehtonen, Koskinen and Julkunen (1999). "Interferon-alpha activates multiple STAT proteins and upregulates proliferation-associated IL-2Ralpha, c-myc, and pim-1 genes in human T cells." *Blood* **93**(6): 1980-91.

- Matsushita, Takenouchi, Kobayashi, Hayashi, Okuyama, Ochiai, Mikata and Isono (1996). "HLA-DR antigen expression in colorectal carcinomas: influence of expression by IFN-gamma in situ and its association with tumour progression." *Br J Cancer* **73**(5): 644-8.
- Matzinger (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." *Annu Rev Immunol* **12**: 991-1045.
- Maurin, Jousse, Averous, Parry, Bruhat, Cherasse, Zeng, Zhang, Harding, Ron and Fafournoux (2005). "The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores." *Cell Metab* **1**(4): 273-7.
- Mazzoni, Bronte, Visintin, Spitzer, Apolloni, Serafini, Zanovello and Segal (2002). "Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism." *J Immunol* **168**(2): 689-95.
- McWilliam, Napoli, Marsh, Pempfer, Nelson, Pimm, Stumbles, Wells and Holt (1996). "Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli." *J Exp Med* **184**(6): 2429-32.
- McWilliam, Nelson, Thomas and Holt (1994). "Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces." *J Exp Med* **179**(4): 1331-6.
- Medema, de Jong, Peltenburg, Verdegaal, Gorter, Bres, Franken, Hahne, Albar, Melief and Offringa (2001). "Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20): 11515-20.
- Medema, de Jong, van Hall, Melief and Offringa (1999). "Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein." *J Exp Med* **190**(7): 1033-8.
- Meeker, Lowder, Cleary, Stewart, Warnke, Sklar and Levy (1985). "Emergence of idiotype variants during treatment of B-cell lymphoma with anti-idiotype antibodies." *N Engl J Med* **312**(26): 1658-65.
- Melani, Chiodoni, Forni and Colombo (2003). "Myeloid cell expansion elicited by the progression of spontaneous mammary carcinomas in c-erbB-2 transgenic BALB/c mice suppresses immune reactivity." *Blood* **102**(6): 2138-45.
- Mellor and Munn (2004). "IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism." *Nat Rev Immunol* **4**(10): 762-74.
- Mellor, Sivakumar, Chandler, Smith, Molina, Mao and Munn (2001). "Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy." *Nat Immunol* **2**(1): 64-8.
- Messmer, Yang, Telusma, Knoll, Li, Messmer, Tracey and Chiorazzi (2004). "High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization." *J Immunol* **173**(1): 307-13.
- Michel and Feron (1997). "Nitric oxide synthases: which, where, how, and why?" *J Clin Invest* **100**(9): 2146-52.
- Miller, Maloney, Warnke and Levy (1982). "Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotype antibody." *N Engl J Med* **306**(9): 517-22.
- Mills, Kincaid, Alt, Heilman and Hill (2000). "M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm." *J Immunol* **164**(12): 6166-73.
- Mirza, Fishman, Fricke, Dunn, Neuger, Frost, Lush, Antonia and Gabrilovich (2006). "All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients." *Cancer Res* **66**(18): 9299-307.
- Mocellin, Bronte and Nitti (2007). "Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities." *Med Res Rev* **27**(3): 317-52.
- Mocikat, Braumuller, Gumy, Egeter, Ziegler, Reusch, Bubeck, Louis, Mailhammer, Riethmuller, Koszinowski and Rocken (2003). "Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses." *Immunity* **19**(4): 561-9.
- Mokyr, Kalinichenko, Gorelik and Bluestone (1998). "Realization of the therapeutic potential of CTLA-4 blockade in low-dose chemotherapy-treated tumor-bearing mice." *Cancer Res* **58**(23): 5301-4.
- Mori and Gotoh (2000). "Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes." *Biochem Biophys Res Commun* **275**(3): 715-9.
- Morimoto, Toyota, Satoh, Murai, Mita, Suzuki, Takamura, Ikeda, Ishida, Sato, Tokino and Imai (2004). "Inactivation of class II transactivator by DNA methylation and histone deacetylation associated with absence of HLA-DR induction by interferon-gamma in haematopoietic tumour cells." *Br J Cancer* **90**(4): 844-52.
- Morris (2002). "Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism." *Annu Rev Nutr* **22**: 87-105.
- Mosmann, Cherwinski, Bond, Giedlin and Coffman (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." *J Immunol* **136**(7): 2348-57.
- Mossner, Hammermann and Racke (2001). "Concomitant down-regulation of L-arginine transport and nitric oxide (NO) synthesis in rat alveolar macrophages by the polyamine spermine." *Pulm Pharmacol Ther* **14**(4): 297-305.
- Mougiakakos, Johansson, Jitschin, Bottcher and Kiessling (2011). "Increased thioredoxin-1 production in human naturally occurring regulatory T cells confers enhanced tolerance to oxidative stress." *Blood* **117**(3): 857-61.
- Mougiakakos, Johansson and Kiessling (2009). "Naturally occurring regulatory T cells show reduced sensitivity toward oxidative stress-induced cell death." *Blood* **113**(15): 3542-5.
- Moustafa, Foster, Lyubimov and Vrieland (2006). "Crystal structure of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* with an L-phenylalanine substrate: insights into structure and mechanism." *J Mol Biol* **364**(5): 991-1002.

- Movahedi, Guillems, Van den Bossche, Van den Bergh, Gysemans, Beschin, De Baetselier and Van Ginderachter (2008). "Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity." *Blood* **111**(8): 4233-44.
- Mowen and Glimcher (2004). "Signaling pathways in Th2 development." *Immunol Rev* **202**: 203-22.
- Mumenthaler, Rozengurt, Livesay, Sabaghian, Cederbaum and Grody (2008). "Disruption of arginase II alters prostate tumor formation in TRAMP mice." *Prostate* **68**(14): 1561-9.
- Mumprecht, Schurch, Schwaller, Solenthaler and Ochsenbein (2009). "Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression." *Blood* **114**(8): 1528-36.
- Munder, Eichmann and Modolell (1998). "Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype." *J Immunol* **160**(11): 5347-54.
- Munder, Mollinedo, Calafat, Canchado, Gil-Lamagnere, Fuentes, Luckner, Doschko, Soler, Eichmann, Muller, Ho, Goerner and Modolell (2005). "Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity." *Blood* **105**(6): 2549-56.
- Munn, Shafizadeh, Attwood, Bondarev, Pashine and Mellor (1999). "Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism." *J Exp Med* **189**(9): 1363-72.
- Munn, Sharma, Hou, Baban, Lee, Antonia, Messina, Chandler, Koni and Mellor (2004). "Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes." *J Clin Invest* **114**(2): 280-90.
- Munn, Sharma and Mellor (2004). "Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells." *J Immunol* **172**(7): 4100-10.
- Munn, Zhou, Attwood, Bondarev, Conway, Marshall, Brown and Mellor (1998). "Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism." *Science* **281**(5380): 1191-3.
- Murakawa, Jung, Iijima and Yonehara (2001). "Apoptosis-inducing protein, AIP, from parasite-infected fish induces apoptosis in mammalian cells by two different molecular mechanisms." *Cell Death Differ* **8**(3): 298-307.
- Murugaiyan and Saha (2009). "Protumor vs antitumor functions of IL-17." *J Immunol* **183**(7): 4169-75.
- Nagaoka, Aoki, Hayashi, Muroi, Sakurai, Itoh, Ikawa, Okabe, Imakawa and Sakai (2009). "L-amino acid oxidase plays a crucial role in host defense in the mammary glands." *Faseb J* **23**(8): 2514-20.
- Nagaraj, Gupta, Pisarev, Kinarsky, Sherman, Kang, Herber, Schneck and Gabrilovich (2007). "Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer." *Nat Med* **13**(7): 828-35.
- Nagaraj, Schrum, Cho, Celis and Gabrilovich (2010). "Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells." *J Immunol* **184**(6): 3106-16.
- Nakagawa, Komai, Takusagawa, Miura, Toda, Miyata, Ozawa and Ikota (2007). "Nitration of specific tyrosine residues of cytochrome C is associated with caspase-cascade inactivation." *Biol Pharm Bull* **30**(1): 15-20.
- Nakamura, Shima, Saeki, Hidaka, Nakashima, Takikawa and Saito (2007). "Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer." *Cancer Sci* **98**(6): 874-81.
- Nathan, Dvilansky, Yirmiyahu, Aharon and Livne (1982). "Impairment of platelet aggregation by Echi colorata venom mediated by L-amino acid oxidase or H2O2." *Thromb Haemost* **48**(3): 277-82.
- Nestle, Burg, Fah, Wrono-Smith and Nickoloff (1997). "Human sunlight-induced basal-cell-carcinoma-associated dendritic cells are deficient in T cell co-stimulatory molecules and are impaired as antigen-presenting cells." *Am J Pathol* **150**(2): 641-51.
- Newsholme and Calder (1997). "The proposed role of glutamine in some cells of the immune system and speculative consequences for the whole animal." *Nutrition* **13**(7-8): 728-30.
- Nie, Yang, Song, Zhao, So, Liao, Wang and Yang (2001). "DNA hypermethylation is a mechanism for loss of expression of the HLA class I genes in human esophageal squamous cell carcinomas." *Carcinogenesis* **22**(10): 1615-23.
- Nielsen, Hansen, Christensen, Reimert, Brunner and Moesgaard (1999). "Independent prognostic value of eosinophil and mast cell infiltration in colorectal cancer tissue." *J Pathol* **189**(4): 487-95.
- Nishikawa and Sakaguchi (2010). "Regulatory T cells in tumor immunity." *Int J Cancer* **127**(4): 759-67.
- Noonan and De Fabo (1992). "Immunosuppression by ultraviolet B radiation: initiation by urocanic acid." *Immunol Today* **13**(7): 250-4.
- Numasaki, Fukushi, Ono, Narula, Zavodny, Kudo, Robbins, Tahara and Lotze (2003). "Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth." *Blood* **101**(7): 2620-7.
- Nurieva, Zheng, Jin, Chung, Zhang, Martinez, Reynolds, Wang, Lin, Sun, Lozano and Dong (2010). "The E3 ubiquitin ligase GRAIL regulates T cell tolerance and regulatory T cell function by mediating T cell receptor-CD3 degradation." *Immunity* **32**(5): 670-80.
- O'Callaghan and Bell (1998). "Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G." *Immunol Rev* **163**: 129-38.

- Oberlies, Watzl, Giese, Luckner, Kropf, Muller, Ho and Munder (2009). "Regulation of NK cell function by human granulocyte arginase." *J Immunol* **182**(9): 5259-67.
- Ochoa, Bernard, Mistry, Morris, Figert, Maley, Tsuei, Boulanger and Kearney (2000). "Trauma increases extrahepatic arginase activity." *Surgery* **127**(4): 419-26.
- Ochoa, Strange, Kearney, Gellin, Endean and Fitzpatrick (2001). "Effects of L-arginine on the proliferation of T lymphocyte subpopulations." *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **25**(1): 23-9.
- Ochsenbein, Sierro, Odermatt, Pericin, Karrer, Hermans, Hemmi, Hengartner and Zinkernagel (2001). "Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction." *Nature* **411**(6841): 1058-64.
- Okamoto, Nikaïdo, Ochiai, Takakura, Saito, Aoki, Ishii, Yanaihara, Yamada, Takikawa, Kawaguchi, Isonishi, Tanaka and Urashima (2005). "Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells." *Clin Cancer Res* **11**(16): 6030-9.
- Otsuji, Kimura, Aoe, Okamoto and Saito (1996). "Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 zeta chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(23): 13119-24.
- Owen-Schaub, van Golen, Hill and Price (1998). "Fas and Fas ligand interactions suppress melanoma lung metastasis." *J Exp Med* **188**(9): 1717-23.
- Ozoren and El-Deiry (2003). "Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells." *Semin Cancer Biol* **13**(2): 135-47.
- Pages, Galon and Fridman (2008). "The essential role of the in situ immune reaction in human colorectal cancer." *J Leukoc Biol* **84**(4): 981-7.
- Pages, Kirilovsky, Mlecnik, Asslaber, Tosolini, Bindea, Lagorce, Wind, Marliot, Bruneval, Zatloukal, Trajanoski, Berger, Fridman and Galon (2009). "In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer." *J Clin Oncol* **27**(35): 5944-51.
- Palmer, Harries, Gore and Collins (2000). "Interferon-alpha (IFN-alpha) stimulates anti-melanoma cytotoxic T lymphocyte (CTL) generation in mixed lymphocyte tumour cultures (MLTC)." *Clin Exp Immunol* **119**(3): 412-8.
- Pan, Wang, Yin, Ozao, Ku, Divino and Chen (2008). "Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function." *Blood* **111**(1): 219-28.
- Pandiyani, Zheng, Ishihara, Reed and Lenardo (2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells." *Nat Immunol* **8**(12): 1353-62.
- Park, Svetkauskaite, He, Kim, Strassheim, Ishizaka and Abraham (2004). "Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein." *J Biol Chem* **279**(9): 7370-7.
- Pawelek, Cheah, Coulombe, Macheroux, Ghisla and Vrieland (2000). "The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site." *Embo J* **19**(16): 4204-15.
- Peng, Townsend, Hecht, White and Glimcher (2004). "T-bet regulates metastasis rate in a murine model of primary prostate cancer." *Cancer Res* **64**(2): 452-5.
- Penn (1988). "Tumors of the immunocompromised patient." *Annu Rev Med* **39**: 63-73.
- Peranzoni, Marigo, Dolcetti, Ugel, Sonda, Taschin, Mantelli, Bronte and Zanovello (2007). "Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology." *Immunobiology* **212**(9-10): 795-812.
- Peranzoni, Zilio, Marigo, Dolcetti, Zanovello, Mandruzzato and Bronte (2010). "Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition." *Curr Opin Immunol*.
- Pericle, Kirken, Bronte, Sconocchia, DaSilva and Segal (1997). "Immunocompromised tumor-bearing mice show a selective loss of STAT5a/b expression in T and B lymphocytes." *J Immunol* **159**(6): 2580-5.
- Perrot, Blanchard, Freymond, Isaac, Guibert, Pacheco and Lebecque (2007). "Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage." *J Immunol* **178**(5): 2763-9.
- Pfefferkorn, Eckel and Rebhun (1986). "Interferon-gamma suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan." *Mol Biochem Parasitol* **20**(3): 215-24.
- Phan, Yang, Sherry, Hwu, Topalian, Schwartzentruber, Restifo, Haworth, Seipp, Freezer, Morton, Mavroukakis, Duray, Steinberg, Allison, Davis and Rosenberg (2003). "Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8372-7.
- Piccotti, Li, Chan, Ferrante, Magram, Eichwald and Bishop (1998). "Alloantigen-reactive Th1 development in IL-12-deficient mice." *J Immunol* **160**(3): 1132-8.
- Piontek, Taniguchi, Ljunggren, Gronberg, Kiessling, Klein and Karre (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.
- Platten, Ho, Youssef, Fontoura, Garren, Hur, Gupta, Lee, Kidd, Robinson, Sobel, Selley and Steinman (2005). "Treatment of autoimmune neuroinflammation with a synthetic tryptophan metabolite." *Science* **310**(5749): 850-5.

- Plosker (2011). "Sipuleucel-T: in metastatic castration-resistant prostate cancer." *Drugs* **71**(1): 101-8.
- Polat, Taysi, Polat, Boyuk and Bakan (2003). "Elevated serum arginase activity levels in patients with breast cancer." *Surg Today* **33**(9): 655-61.
- Ponnudurai, Chung and Tan (1994). "Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom." *Arch Biochem Biophys* **313**(2): 373-8.
- Popov, Abdullah, Wickenhauser, Saric, Driesen, Hanisch, Domann, Raven, Dehus, Hermann, Eggle, Debey, Chakraborty, Kronke, Utermohlen and Schultze (2006). "Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells form suppurative granulomas following *Listeria monocytogenes* infection." *J Clin Invest* **116**(12): 3160-70.
- Porembaska, Luboinski, Chrzanoska, Mielczarek, Magnuska and Baranczyk-Kuzma (2003). "Arginase in patients with breast cancer." *Clin Chim Acta* **328**(1-2): 105-11.
- Powell and Delgoffe (2010). "The mammalian target of rapamycin: linking T cell differentiation, function, and metabolism." *Immunity* **33**(3): 301-11.
- Powell, Lerner and Schwartz (1999). "Inhibition of cell cycle progression by rapamycin induces T cell clonal anergy even in the presence of costimulation." *J Immunol* **162**(5): 2775-84.
- Prevost-Blondel, Roth, Rosenthal and Pircher (2000). "Crucial role of TNF-alpha in CD8 T cell-mediated elimination of 3LL-A9 Lewis lung carcinoma cells in vivo." *J Immunol* **164**(7): 3645-51.
- Prevost-Blondel, Zimmermann, Stemmer, Kulmburg, Rosenthal and Pircher (1998). "Tumor-infiltrating lymphocytes exhibiting high ex vivo cytolytic activity fail to prevent murine melanoma tumor growth in vivo." *J Immunol* **161**(5): 2187-94.
- Qin and 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.
- Raibekas and Massey (1998). "Primary structure of the snake venom L-amino acid oxidase shows high homology with the mouse B cell interleukin 4-induced Fig1 protein." *Biochem Biophys Res Commun* **248**(3): 476-8.
- Rakhra, Bachireddy, Zabuawala, Zeiser, Xu, Kopelman, Fan, Yang, Braunstein, Crosby, Ryeom and Felsher (2010). "CD4(+) T cells contribute to the remodeling of the microenvironment required for sustained tumor regression upon oncogene inactivation." *Cancer Cell* **18**(5): 485-98.
- Rebmann, Regel, Stolke and Grosse-Wilde (2003). "Secretion of sHLA-G molecules in malignancies." *Semin Cancer Biol* **13**(5): 371-7.
- Reis e Sousa (2006). "Dendritic cells in a mature age." *Nat Rev Immunol* **6**(6): 476-83.
- Reith, LeibundGut-Landmann and Waldburger (2005). "Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator." *Nat Rev Immunol* **5**(10): 793-806.
- Rey, Veuillen, Vey, Bouabdallah and Olive (2009). "Natural killer and gammadelta T cells in haematological malignancies: enhancing the immune effectors." *Trends Mol Med* **15**(6): 275-84.
- Rifa'i, Shi, Zhang, Lee, Shiku, Isobe and Suzuki (2008). "CD8+CD122+ regulatory T cells recognize activated T cells via conventional MHC class I-alpha-betaTCR interaction and become IL-10-producing active regulatory cells." *Int Immunol* **20**(7): 937-47.
- Rizza, Moretti and Belardelli (2010). "Recent advances on the immunomodulatory effects of IFN-alpha: implications for cancer immunotherapy and autoimmunity." *Autoimmunity* **43**(3): 204-9.
- Roberts, Wright, Rosenwald, Jaramillo, Grogan, Miller, Frutiger, Chan, Gascoyne, Ott, Muller-Hermelink, Staudt and Rimsza (2006). "Loss of major histocompatibility class II gene and protein expression in primary mediastinal large B-cell lymphoma is highly coordinated and related to poor patient survival." *Blood* **108**(1): 311-8.
- Robinson, Hale and Carlin (2006). "NF-kappa B activation contributes to indoleamine dioxygenase transcriptional synergy induced by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha." *Cytokine* **35**(1-2): 53-61.
- Robinson, Shirey and Carlin (2003). "Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha." *J Interferon Cytokine Res* **23**(8): 413-21.
- Rodriguez, Hernandez, Quiceno, Dubinett, Zabaleta, Ochoa, Gilbert and Ochoa (2005). "Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma." *J Exp Med* **202**(7): 931-9.
- Rodriguez, Quiceno, Zabaleta, Ortiz, Zea, Piazuelo, Delgado, Correa, Brayer, Sotomayor, Antonia, Ochoa and Ochoa (2004). "Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses." *Cancer Res* **64**(16): 5839-49.
- Rodriguez, Zea, Culotta, Zabaleta, Ochoa and Ochoa (2002). "Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine." *J Biol Chem* **277**(24): 21123-9.
- Rodriguez, Zea, DeSalvo, Culotta, Zabaleta, Quiceno, Ochoa and Ochoa (2003). "L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes." *J Immunol* **171**(3): 1232-9.
- Rosenberg and Dudley (2009). "Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma." *Curr Opin Immunol* **21**(2): 233-40.
- Rossig, Fichtlscherer, Breitschopf, Haendeler, Zeiher, Mulsch and Dimmeler (1999). "Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo." *J Biol Chem* **274**(11): 6823-6.

- Roth, Isenmann, Nakamura, Platten, Wick, Kleihues, Bahr, Ohgaki, Ashkenazi and Weller (2001). "Soluble decoy receptor 3 is expressed by malignant gliomas and suppresses CD95 ligand-induced apoptosis and chemotaxis." *Cancer Res* **61**(6): 2759-65.
- Rotondo, Mastracci, Piazza, Barisione, Fabbì, Cassanello, Costa, Morandi, Astigiano, Cesario, Sormani, Ferlazzo, Grossi, Ratto, Ferrini and Frumento (2008). "Arginase 2 is expressed by human lung cancer, but it neither induces immune suppression, nor affects disease progression." *Int J Cancer* **123**(5): 1108-16.
- Rouas-Freiss, Moreau, Menier, LeMaoult and Carosella (2007). "Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor responses." *Semin Cancer Biol* **17**(6): 413-21.
- Roulland, Suarez, Hermine and Nadel (2008). "Pathophysiological aspects of memory B-cell development." *Trends Immunol* **29**(1): 25-33.
- Rovere-Querini, Capobianco, Scaffidi, Valentinis, Catalanotti, Giazzon, Dumitriu, Muller, Iannacone, Traversari, Bianchi and Manfredi (2004). "HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells." *EMBO Rep* **5**(8): 825-30.
- Saccani, Schioppa, Porta, Biswas, Nebuloni, Vago, Bottazzi, Colombo, Mantovani and Sica (2006). "p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance." *Cancer Res* **66**(23): 11432-40.
- Sakaguchi, Sakaguchi, Asano, Itoh and Toda (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* **155**(3): 1151-64.
- Sakurai, Takatsuka, Yoshioka, Matsui, Suzuki, Titani and Fujimura (2001). "Inhibition of human platelet aggregation by L-amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom." *Toxicol* **39**(12): 1827-33.
- Salimuddin, Nagasaki, Gotoh, Isobe and Mori (1999). "Regulation of the genes for arginase isoforms and related enzymes in mouse macrophages by lipopolysaccharide." *Am J Physiol* **277**(1 Pt 1): E110-7.
- Salvadori, Martinelli and Zier (2000). "Resection of solid tumors reverses T cell defects and restores protective immunity." *J Immunol* **164**(4): 2214-20.
- Sasada, Kimura, Yoshida, Kanai and Takabayashi (2003). "CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression." *Cancer* **98**(5): 1089-99.
- Sato, Olson, Ahn, Bundy, Nishikawa, Qian, Jungbluth, Frosina, Gnjjatic, Ambrosone, Kepner, Odunsi, Ritter, Lele, Chen, Ohtani, Old and Odunsi (2005). "Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(51): 18538-43.
- Satoh, Toyota, Ikeda, Morimoto, Akino, Mita, Suzuki, Sasaki, Kanaseki, Takamura, Soejima, Urano, Yanagihara, Endo, Hinoda, Fujita, Hosokawa, Sato, Tokino and Imai (2004). "Epigenetic inactivation of class II transactivator (CIITA) is associated with the absence of interferon-gamma-induced HLA-DR expression in colorectal and gastric cancer cells." *Oncogene* **23**(55): 8876-86.
- Sawanobori, Ueha, Kurachi, Shimaoka, Talmadge, Abe, Shono, Kitabatake, Kakimi, Mukaida and Matsushima (2008). "Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice." *Blood* **111**(12): 5457-66.
- Scaffidi, Misteli and Bianchi (2002). "Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation." *Nature* **418**(6894): 191-5.
- Schaefer, Kim, Albers, Hoermann, Myers and Whiteside (2005). "Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer." *Br J Cancer* **92**(5): 913-20.
- Schmielau and Finn (2001). "Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients." *Cancer Res* **61**(12): 4756-60.
- Schmitt, Rosenthal and Lowe (2000). "Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas." *Nat Med* **6**(9): 1029-35.
- Schumacher, Schmitz, Brune, Tiacchi, Doring, Hansmann, Siebert and Kuppers (2011). "Mutations in the genes coding for the NF-kappaB regulating factors IkappaBalpha and A20 are uncommon in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's lymphoma." *Haematologica* **95**(1): 153-7.
- Sebti, Le Maux, Gros, De Guibert, Pangault, Rouas-Freiss, Bernard and Amiot (2007). "Expression of functional soluble human leucocyte antigen-G molecules in lymphoproliferative disorders." *Br J Haematol* **138**(2): 202-12.
- Seliger (2008). "Different regulation of MHC class I antigen processing components in human tumors." *J Immunotoxicol* **5**(4): 361-7.
- Seliger, Hohne, Knuth, Bernhard, Ehring, Tampe and Huber (1996). "Reduced membrane major histocompatibility complex class I density and stability in a subset of human renal cell carcinomas with low TAP and LMP expression." *Clin Cancer Res* **2**(8): 1427-33.

- Serafini, Carbley, Noonan, Tan, Bronte and Borrello (2004). "High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells." Cancer Res **64**(17): 6337-43.
- Serafini, Mgebroff, Noonan and Borrello (2008). "Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells." Cancer Res **68**(13): 5439-49.
- Sfanos, Bruno, Maris, Xu, Thoburn, DeMarzo, Meeker, Isaacs and Drake (2008). "Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing." Clin Cancer Res **14**(11): 3254-61.
- Sgadari, Angiolillo and Tosato (1996). "Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10." Blood **87**(9): 3877-82.
- Shankaran, Ikeda, Bruce, White, Swanson, Old and Schreiber (2001). "IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." Nature **410**(6832): 1107-11.
- Sharma, Baban, Chandler, Hou, Singh, Yagita, Azuma, Blazar, Mellor and Munn (2007). "Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase." J Clin Invest **117**(9): 2570-82.
- Sharma, Hou, Liu, Koni, Metz, Chandler, Mellor, He and Munn (2009). "Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes." Blood **113**(24): 6102-11.
- Shi, Morris, Zoghbi, Porter and O'Brien (2001). "Generation of a mouse model for arginase II deficiency by targeted disruption of the arginase II gene." Mol Cell Biol **21**(3): 811-3.
- Shin, Kim, Lee, Park, Kim, Park, Lee, Lee, Lee, Jung, Han, Kim, Lee and Yoo (2001). "Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers." Cancer Res **61**(13): 4942-6.
- Shin, Park, Kim, Kim, Kang, Song, Park, Dong, Pi, Oh, Lee, Yoo and Lee (1999). "Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in cutaneous malignant melanoma." Am J Pathol **154**(6): 1785-91.
- Shu, Cochran, Huang, Morton and Maecker (2006). "Immune responses in the draining lymph nodes against cancer: implications for immunotherapy." Cancer Metastasis Rev **25**(2): 233-42.
- Sica and Bronte (2007). "Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development." J Clin Invest **117**(5): 1155-66.
- Sica, Schioppa, Mantovani and Allavena (2006). "Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy." Eur J Cancer **42**(6): 717-27.
- Simard, Pfeiffer and Engels (2010). "Cumulative incidence of cancer among individuals with acquired immunodeficiency syndrome in the United States." Cancer.
- Simard, Pfeiffer and Engels (2010). "Spectrum of cancer risk late after AIDS onset in the United States." Arch Intern Med **170**(15): 1337-45.
- Singh, Pervin, Karimi, Cederbaum and Chaudhuri (2000). "Arginase activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells." Cancer Res **60**(12): 3305-12.
- Sinha, Clements, Bunt, Albelda and Ostrand-Rosenberg (2007). "Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response." J Immunol **179**(2): 977-83.
- Sinha, Clements, Fulton and Ostrand-Rosenberg (2007). "Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells." Cancer Res **67**(9): 4507-13.
- Sinha, Clements and Ostrand-Rosenberg (2005). "Interleukin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis." Cancer Res **65**(24): 11743-51.
- Sinha, Okoro, Foell, Freeze, Ostrand-Rosenberg and Srikrishna (2008). "Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells." J Immunol **181**(7): 4666-75.
- Smyth, Godfrey and Trapani (2001). "A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy." Nat Immunol **2**(4): 293-9.
- Smyth, Thia, Street, Cretney, Trapani, Taniguchi, Kawano, Pelikan, Crowe and Godfrey (2000). "Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells." J Exp Med **191**(4): 661-8.
- Smyth, Thia, Street, MacGregor, Godfrey and Trapani (2000). "Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma." J Exp Med **192**(5): 755-60.
- Sojka, Huang and Howell (2008). "Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target." Immunology **124**(1): 13-22.
- Song, Krelin, Dvorkin, Bjorkdahl, Segal, Dinarello, Voronov and Apte (2005). "CD11b+/Gr-1+ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1 β -secreting cells." J Immunol **175**(12): 8200-8.
- Sonoki, Nagasaki, Gotoh, Takiguchi, Takeya, Matsuzaki and Mori (1997). "Coinduction of nitric-oxide synthase and arginase I in cultured rat peritoneal macrophages and rat tissues in vivo by lipopolysaccharide." J Biol Chem **272**(6): 3689-93.

- Sparkes, Dizikes, Klisak, Grody, Mohandas, Heinzmann, Zollman, Lulis and Cederbaum (1986). "The gene for human liver arginase (ARG1) is assigned to chromosome band 6q23." *Am J Hum Genet* **39**(2): 186-93.
- Srivastava and Maki (1991). "Stress-induced proteins in immune response to cancer." *Curr Top Microbiol Immunol* **167**: 109-23.
- Srivastava, Sinha, Clements, Rodriguez and Ostrand-Rosenberg (2011). "Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine." *Cancer Res* **70**(1): 68-77.
- Stein, Go, Lane, Primakoff and Myles (2006). "Proteomic analysis of sperm regions that mediate sperm-egg interactions." *Proteomics* **6**(12): 3533-43.
- Strassmann, Patil-Koota, Finkelman, Fong and Kambayashi (1994). "Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2." *J Exp Med* **180**(6): 2365-70.
- Strauss, Bergmann, Szczepanski, Gooding, Johnson and Whiteside (2007). "A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment." *Clin Cancer Res* **13**(15 Pt 1): 4345-54.
- Street, Trapani, MacGregor and Smyth (2002). "Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma." *J Exp Med* **196**(1): 129-34.
- Stutman (1979). "Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose." *J Natl Cancer Inst* **62**(2): 353-8.
- Sugimoto, Oda, Otsuki, Hino, Yoshida and Shiro (2006). "Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O2 incorporation by a heme-containing dioxygenase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(8): 2611-6.
- Suhr and Kim (1999). "Comparison of the apoptotic pathways induced by L-amino acid oxidase and hydrogen peroxide." *J Biochem* **125**(2): 305-9.
- Sun, Nonobe, Kobayashi, Kuraishi, Aoki, Yamamoto and Sakai (2002). "Characterization and expression of L-amino acid oxidase of mouse milk." *J Biol Chem* **277**(21): 19080-6.
- Sun, Qin, Chluba, Eppel and Wekerle (1988). "Suppression of experimentally induced autoimmune encephalomyelitis by cytolytic T-T cell interactions." *Nature* **332**(6167): 843-5.
- Suzuki, Kapoor, Jassar, Kaiser and Albelda (2005). "Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity." *Clin Cancer Res* **11**(18): 6713-21.
- Takahama, Yamada, Emoto, Fujimoto, Takayama, Ueno, Uchida, Hirao, Mizuno and Nakajima (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, Hanson, Norell, Havelka, Kono, Malmberg and Kiessling (2005). "Preferential cell death of CD8+ effector memory (CCR7-CD45RA-) T cells by hydrogen peroxide-induced oxidative stress." *J Immunol* **174**(10): 6080-7.
- Takeda, Smyth, Cretney, Hayakawa, Kayagaki, Yagita and Okumura (2002). "Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development." *J Exp Med* **195**(2): 161-9.
- Talmadge, Hood, Zobel, Shafer, Coles and Toth (2007). "Chemoprevention by cyclooxygenase-2 inhibition reduces immature myeloid suppressor cell expansion." *Int Immunopharmacol* **7**(2): 140-51.
- Talmadge, Meyers, Prieur and Starkey (1980). "Role of NK cells in tumour growth and metastasis in beige mice." *Nature* **284**(5757): 622-4.
- Tang and Bluestone (2008). "The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation." *Nat Immunol* **9**(3): 239-44.
- Taniguchi, Tashiro, Dashtsoodol, Hongo and Watarai (2011). "The specialized iNKT cell system recognizes glycolipid antigens and bridges the innate and acquired immune systems with potential applications for cancer therapy." *Int Immunol* **22**(1): 1-6.
- Tannenbaum and Hamilton (2000). "Immune-inflammatory mechanisms in IFNgamma-mediated anti-tumor activity." *Semin Cancer Biol* **10**(2): 113-23.
- Tartour, Fossiez, Joyeux, Galinha, Gey, Claret, Sastre-Garau, Couturier, Mosseri, Vives, Banchereau, Fridman, Wijdenes, Lebecque and Sautes-Fridman (1999). "Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice." *Cancer Res* **59**(15): 3698-704.
- Tate, Vonderhaar, Caldas, Metoyer, Patterson, Aviles and Zea (2008). "Effect of arginase II on L-arginine depletion and cell growth in murine cell lines of renal cell carcinoma." *J Hematol Oncol* **1**: 14.
- Taylor and Feng (1991). "Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism." *Faseb J* **5**(11): 2516-22.
- Tedder, Steeber and Pizcueta (1995). "L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites." *J Exp Med* **181**(6): 2259-64.

- Terabe, Matsui, Park, Mamura, Noben-Trauth, Donaldson, Chen, Wahl, Ledbetter, Pratt, Letterio, Paul and Berzofsky (2003). "Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence." *J Exp Med* **198**(11): 1741-52.
- Terabe, Swann, Ambrosino, Sinha, Takaku, Hayakawa, Godfrey, Ostrand-Rosenberg, Smyth and Berzofsky (2005). "A nonclassical non-Valpha14Jalpha18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance." *J Exp Med* **202**(12): 1627-33.
- Thomas, Salahifar, Mashima, Hunt, Richardson and Stocker (2001). "Antioxidants inhibit indoleamine 2,3-dioxygenase in IFN-gamma-activated human macrophages: posttranslational regulation by pyrrolidine dithiocarbamate." *J Immunol* **166**(10): 6332-40.
- Thomas and Stocker (1999). "Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway." *Redox Rep* **4**(5): 199-220.
- Thompson, Gillett, Chevillat, Lohse, Webster, Krejci, Lobo, Sengupta, Chen, Zincke, Blute, Strome, Leibovich and Kwon (2004). "Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(49): 17174-9.
- Thomsen, Miles, Happerfield, Bobrow, Knowles and Moncada (1995). "Nitric oxide synthase activity in human breast cancer." *Br J Cancer* **72**(1): 41-4.
- Todaro, D'Asaro, Caccamo, Iovino, Francipane, Meraviglia, Orlando, La Mendola, Gulotta, Salerno, Dieli and Stassi (2009). "Efficient killing of human colon cancer stem cells by gamma delta T lymphocytes." *J Immunol* **182**(11): 7287-96.
- Tomasi, Magner and Khan (2006). "Epigenetic regulation of immune escape genes in cancer." *Cancer Immunol Immunother* **55**(10): 1159-84.
- Topalian, Solomon and Rosenberg (1989). "Tumor-specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas." *J Immunol* **142**(10): 3714-25.
- Torii, Naito and Tsuruo (1997). "Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom." *J Biol Chem* **272**(14): 9539-42.
- Torok, Higuchi, Bronk and Gores (2002). "Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome C release by nitrosylating caspase 9." *Cancer Res* **62**(6): 1648-53.
- Townsend and Allison (1993). "Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells." *Science* **259**(5093): 368-70.
- Trapani and Smyth (2002). "Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway." *Nat Rev Immunol* **2**(10): 735-47.
- Travers, Gow, Barber, Thomson and Shennan (2004). "Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and L-tryptophan transport in human breast cancer cells." *Biochim Biophys Acta* **1661**(1): 106-12.
- Troy, Davidson, Atkinson and Hart (1998). "Phenotypic characterisation of the dendritic cell infiltrate in prostate cancer." *J Urol* **160**(1): 214-9.
- Troy, Summers, Davidson, Atkinson and Hart (1998). "Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma." *Clin Cancer Res* **4**(3): 585-93.
- Tsai, Chen, Wang, Huang, Jung, Wu, Lee, McBride, Chiang and Hong (2007). "Macrophages from irradiated tumors express higher levels of iNOS, arginase-I and COX-2, and promote tumor growth." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **68**(2): 499-507.
- Tsujimoto, Cossman, Jaffe and Croce (1985). "Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma." *Science* **228**(4706): 1440-3.
- Tsushima, Yao, Shin, Flies, Xu, Tamada, Pardoll and Chen (2007). "Interaction between B7-H1 and PD-1 determines initiation and reversal of T-cell anergy." *Blood* **110**(1): 180-5.
- Ubukata, Motohashi, Tabuchi, Nagata, Konishi and Tabuchi (2010). "Evaluations of interferon-gamma/interleukin-4 ratio and neutrophil/lymphocyte ratio as prognostic indicators in gastric cancer patients." *J Surg Oncol* **102**(7): 742-7.
- Ueno, Cho, Cheng, Wang, Hou, Nakano, Santamaria and Yang (2007). "Transient upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by human chorionic gonadotropin downregulates autoimmune diabetes." *Diabetes* **56**(6): 1686-93.
- Ueno, Klechevsky, Morita, Aspod, Cao, Matsui, Di Pucchio, Connolly, Fay, Pascual, Palucka and Banchereau (2007). "Dendritic cell subsets in health and disease." *Immunol Rev* **219**: 118-42.
- Ugurel, Rappl, Tilgen and Reinhold (2001). "Increased soluble CD95 (sFas/CD95) serum level correlates with poor prognosis in melanoma patients." *Clin Cancer Res* **7**(5): 1282-6.
- Ugurel, Rebmann, Ferrone, Tilgen, Grosse-Wilde and Reinhold (2001). "Soluble human leukocyte antigen-G serum level is elevated in melanoma patients and is further increased by interferon-alpha immunotherapy." *Cancer* **92**(2): 369-76.

- Uyttenhove, Pilotte, Theate, Stroobant, Colau, Parmentier, Boon and Van den Eynde (2003). "Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase." *Nat Med* **9**(10): 1269-74.
- van den Broek, Kagi, Ossendorp, Toes, Vamvakas, Lutz, Melief, Zinkernagel and Hengartner (1996). "Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice." *J Exp Med* **184**(5): 1781-90.
- Varga, Yufit, Hitraya and Brown (1996). "Control of extracellular matrix degradation by interferon-gamma. The tryptophan connection." *Adv Exp Med Biol* **398**: 143-8.
- Veldhoen, Uyttenhove, van Snick, Helmbj, Westendorf, Buer, Martin, Wilhelm and Stockinger (2008). "Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset." *Nat Immunol* **9**(12): 1341-6.
- Vieira, Christensen, Minaee, O'Neill, Barrat, Boonstra, Barthlott, Stockinger, Wraith and O'Garra (2004). "IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Immunol* **172**(10): 5986-93.
- Viey, Fromont, Escudier, Morel, Da Rocha, Chouaib and Caignard (2005). "Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma." *J Immunol* **174**(3): 1338-47.
- Viguier, Lemaître, Verola, Cho, Gorochov, Dubret, Bachelez, Kourilsky and Ferradini (2004). "Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells." *J Immunol* **173**(2): 1444-53.
- Vitale, Rezzani, Rodella, Zauli, Grigolato, Cadei, Hicklin and Ferrone (1998). "HLA class I antigen and transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP2) down-regulation in high-grade primary breast carcinoma lesions." *Cancer Res* **58**(4): 737-42.
- Vivier, Raulet, Moretta, Caligiuri, Zitvogel, Lanier, Yokoyama and Ugolini (2011). "Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells." *Science* **331**(6013): 44-9.
- von Bergwelt-Baildon, Popov, Saric, Chemnitz, Classen, Stoffel, Fiore, Roth, Beyer, Debey, Wickenhauser, Hanisch and Schultze (2006). "CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition." *Blood* **108**(1): 228-37.
- Walunas, Bakker and Bluestone (1996). "CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation." *J Exp Med* **183**(6): 2541-50.
- Walunas and Bluestone (1998). "CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo." *J Immunol* **160**(8): 3855-60.
- Walunas, Lenschow, Bakker, Linsley, Freeman, Green, Thompson and Bluestone (1994). "CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation." *Immunity* **1**(5): 405-13.
- Wang, Simonavicius, Wu, Swaminath, Reagan, Tian and Ling (2006). "Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35." *J Biol Chem* **281**(31): 22021-8.
- Weber, Feder-Mengus, Chiarugi, Rosenthal, Reschner, Schumacher, Zajac, Misteli, Frey, Oertli, Heberer and Spagnoli (2006). "Differential effects of the tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid on the proliferation of human CD8+ T cells induced by TCR triggering or homeostatic cytokines." *Eur J Immunol* **36**(2): 296-304.
- Wei, Kryczek, Zou, Daniel, Cheng, Mottram, Curiel, Lange and Zou (2005). "Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma." *Cancer Res* **65**(12): 5020-6.
- Weiner (2001). "Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells." *Immunol Rev* **182**: 207-14.
- Weller, Malipiero, Aguzzi, Reed and Fontana (1995). "Protooncogene bcl-2 gene transfer abrogates Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of human malignant glioma cells and confers resistance to chemotherapeutic drugs and therapeutic irradiation." *J Clin Invest* **95**(6): 2633-43.
- Werneck, Lugo-Villarino, Hwang, Cantor and Glimcher (2008). "T-bet plays a key role in NK-mediated control of melanoma metastatic disease." *J Immunol* **180**(12): 8004-10.
- Whiteside and Herberman (1995). "The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer." *Curr Opin Immunol* **7**(5): 704-10.
- Wiemann, Kolb-Kokocinski and Poustka (2005). "Alternative pre-mRNA processing regulates cell-type specific expression of the IL411 and NUP62 genes." *BMC Biol* **3**: 16.
- Williams, Tyznik and Bevan (2006). "Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells." *Nature* **441**(7095): 890-3.
- Wing, Onishi, Prieto-Martin, Yamaguchi, Miyara, Fehervari, Nomura and Sakaguchi (2008). "CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function." *Science* **322**(5899): 271-5.
- Winzler, Rovere, Rescigno, Granucci, Penna, Adorini, Zimmermann, Davoust and Ricciardi-Castagnoli (1997). "Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures." *J Exp Med* **185**(2): 317-28.

- Witkiewicz, Williams, Cozzitorto, Durkan, Showalter, Yeo and Brody (2008). "Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection." *J Am Coll Surg* **206**(5): 849-54; discussion 854-6.
- Woo, Chu, Goletz, Schlienger, Yeh, Coukos, Rubin, Kaiser and June (2001). "Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer." *Cancer Res* **61**(12): 4766-72.
- Workman, Szymczak-Workman, Collison, Pillai and Vignali (2009). "The development and function of regulatory T cells." *Cell Mol Life Sci* **66**(16): 2603-22.
- Worschech, Kmiecik, Knutson, Bear, Szalay, Wang, Marincola and Manjili (2008). "Signatures associated with rejection or recurrence in HER-2/neu-positive mammary tumors." *Cancer Res* **68**(7): 2436-46.
- Wright and Ting (2006). "Epigenetic regulation of MHC-II and CIITA genes." *Trends Immunol* **27**(9): 405-12.
- Wu and Morris (1998). "Arginine metabolism: nitric oxide and beyond." *Biochem J* **336** (Pt 1): 1-17.
- Xia, Roman, Masters and Zweier (1998). "Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain." *J Biol Chem* **273**(35): 22635-9.
- Xia and Zweier (1997). "Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(13): 6954-8.
- Xie, Mei, Liao, Qian, Yu, Fei, Qin, Zhang, Peng, Shen, Wei and Chen (2009). "Expression of CIITA-related MHCII molecules in tumors linked to prognosis in hepatocellular carcinoma." *Int J Oncol* **34**(3): 681-8.
- Xu, Liu, Smith and Charles (2000). "Nitric oxide upregulates expression of DNA-PKcs to protect cells from DNA-damaging anti-tumour agents." *Nat Cell Biol* **2**(6): 339-45.
- Xystrakis, Dejean, Bernard, Druet, Liblau, Gonzalez-Dunia and Saoudi (2004). "Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation." *Blood* **104**(10): 3294-301.
- Yamane, Resch, Kuo, Kuchen, Li, Sun, Robbiani, McBride, Nussenzweig and Casellas (2011). "Deep-sequencing identification of the genomic targets of the cytidine deaminase AID and its cofactor RPA in B lymphocytes." *Nat Immunol* **12**(1): 62-9.
- Yamasaki, Horiguchi, Kurosaki, Kunii, Nagato, Hanaoka, Shimizu, Ueno, Yamamoto, Taniguchi, Motohashi, Nakayama and Okamoto (2010). "Induction of NKT cell-specific immune responses in cancer tissues after NKT cell-targeted adoptive immunotherapy." *Clin Immunol*.
- Yan, Zhang, Gran, Fallarino, Yu, Li, Cullimore, Rostami and Xu (2010). "IDO upregulates regulatory T cells via tryptophan catabolite and suppresses encephalitogenic T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* **185**(10): 5953-61.
- Yang, Cai, Zhang, Yutzy, Roby and Roden (2006). "CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells." *Cancer Res* **66**(13): 6807-15.
- Yang, Novak, Stenson, Witzig and Ansell (2006). "Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma." *Blood* **107**(9): 3639-46.
- Yoshida, Ino, Ishida, Kajiyama, Yamamoto, Shibata, Terauchi, Nawa, Akimoto, Takikawa, Isobe and Kikkawa (2008). "Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human endometrial carcinoma cells induces rapid tumor growth in a mouse xenograft model." *Clin Cancer Res* **14**(22): 7251-9.
- Youn, Nagaraj, Collazo and Gabrilovich (2008). "Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice." *J Immunol* **181**(8): 5791-802.
- Zamanakou, Germainis and Karanikas (2007). "Tumor immune escape mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase." *Immunol Lett* **111**(2): 69-75.
- Zarek and Powell (2007). "Adenosine and anergy." *Autoimmunity* **40**(6): 425-32.
- Zea, Rodriguez, Atkins, Hernandez, Signoretti, Zabaleta, McDermott, Quiceno, Youmans, O'Neill, Mier and Ochoa (2005). "Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion." *Cancer Res* **65**(8): 3044-8.
- Zeller and Maritz (1944). "Über eine neue l-aminosäure-oxydase." *Helv.Chim.Acta* **27**: 1888-1903.
- Zheng, Collins, Lutz, Allen, Kole, Zarek and Powell (2007). "A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy." *J Immunol* **178**(4): 2163-70.
- Zhou, Chong and Littman (2009). "Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation." *Immunity* **30**(5): 646-55.
- Zhu, Lu, Huang, Link and Xiao (2007). "A putative mechanism on remission of multiple sclerosis during pregnancy: estrogen-induced indoleamine 2,3-dioxygenase by dendritic cells." *Mult Scler* **13**(1): 33-40.
- Zhu and Paul (2008). "CD4 T cells: fates, functions, and faults." *Blood* **112**(5): 1557-69.
- Zhu, Yamane and Paul (2010). "Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)." *Annu Rev Immunol* **28**: 445-89.
- Zimmer, Nguyen, Wang, Xu, Colmone, Felio, Choi, Zhou, Alegre and Wang (2009). "Polymorphisms in CD1d affect antigen presentation and the activation of CD1d-restricted T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(6): 1909-14.
- Zitvogel, Tesniere and Kroemer (2006). "Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion." *Nat Rev Immunol* **6**(10): 715-27.

Zou, Machelon, Coulomb-L'Hermin, Borvak, Nome, Isaeva, Wei, Krzysiek, Durand-Gasselín, Gordon, Pustilnik, Curiel, Galanaud, Capron, Emilie and Curiel (2001). "*Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells.*" Nat Med **7**(12): 1339-46.

**Immunosuppression associée à l'enzyme Interleukine-4 induced gene 1 (IL4I1) :
Régulation de l'expression dans les cellules humaines et rôle dans l'échappement
tumoral à la réponse immune dans un modèle murin**

RESUME : La protéine IL4I1 est une enzyme sécrétée dont l'activité L-amino acide oxydase vis-à-vis de la phénylalanine inhibe la prolifération des lymphocytes T *in vitro* (Boulland et al, Blood 2007). Comme d'autres enzymes immunosuppressives, elle est exprimée dans les tumeurs au niveau des cellules myéloïdes et/ou des cellules tumorales (Carbonnelle-Puscian et al, Leukemia 2009). Le but de cette thèse a été de caractériser les conditions d'expression d'IL4I1 et de comprendre son rôle dans le cancer.

Nous avons montré que les macrophages et les cellules dendritiques représentent la principale source d'IL4I1 *in vitro* et dans des lésions inflammatoires chroniques. L'expression d'IL4I1 dans les phagocytes mononucléés est induite par les interférons ou les ligands de TLR, activant respectivement STAT1 et NF- κ B, tandis que les lymphocytes B expriment des niveaux nettement plus faibles d'IL4I1 sous le contrôle de la voie IL-4/STAT6 et de la voie CD40/NF κ B. L'expression d'IL4I1 par des cellules monocytaires inhibe la production de cytokines Th1 et pourrait donc contribuer à la régulation de l'inflammation Th1 *in vivo*.

Dans un modèle murin de cancer, l'expression d'IL4I1 facilite le développement tumoral en diminuant la réponse T cytotoxique spécifique de la tumeur. Ceci est observé à des niveaux d'activité IL4I1 proches de ceux mesurés dans des tumeurs humaines, suggérant qu'IL4I1 puisse contribuer à l'échappement des tumeurs au système immunitaire chez l'homme. Nous avons développé plusieurs mutants d'IL4I1, afin d'évaluer l'impact de l'activité enzymatique *versus* celui de l'éventuelle liaison de l'enzyme à un récepteur, dans l'effet protumoral observé. Un de ces mutants est actuellement disponible pour une étude chez la souris.

Nos résultats installent définitivement IL4I1 dans le panorama des enzymes immunosuppressives associées au cancer et ouvrent la voie au développement d'inhibiteurs spécifiques comme outils thérapeutiques.

Mots clefs : Interleukin-4 induced gene 1 (IL4I1), enzyme immunosuppressive, échappement tumoral

**TITRE EN ANGLAIS : Immunosuppression induced by Interleukin-4 Induced gene 1 (IL4I1):
Regulation of expression in human cells and role in tumor escape from the immune response in
a murine model**

SUMMARY: The IL4I1 protein is a secreted L-amino acid oxidase, which inhibits T cell proliferation through phenylalanine degradation *in vitro* (Boulland et al, Blood 2007). Similar to previously described immunosuppressive enzymes, IL4I1 is expressed in cancer by myeloid cells and/or tumor cells (Carbonnelle-Puscian et al, Leukemia 2009). The aim of this work was to characterize the cells and stimuli associated with IL4I1 expression and to decipher its role in cancer.

We showed that macrophages and dendritic cells are the main source of IL4I1 *in vitro* and in chronic inflammatory lesions. IL4I1 expression in mononuclear phagocytes is induced by interferons or TLR ligands, which act through STAT1 and NF κ B respectively. Conversely, B cells express dramatically lower levels of IL4I1 under the control of IL-4/STAT6 and CD40/NF κ B. IL4I1 expression by monocytic cells inhibits the production of Th1 cytokines and may thus contribute to Th1 inflammation control *in vivo*.

In a murine model of cancer, IL4I1 expression facilitates tumor development by depressing the tumor specific cytotoxic T cell response. This is observed for IL4I1 activity levels in the range of those measured in human tumors, suggesting that IL4I1 may contribute to tumor immune escape in humans. We developed several IL4I1 mutants to discriminate the role of the enzymatic activity versus the binding to a putative cell surface receptor in the protumor effect observed. One of these mutants is currently available for *in vivo* testing.

Our results definitively establish IL4I1 in the family of immunosuppressive enzymes associated with cancer and pave the way for the development of specific inhibitors as therapeutic tools.

Key-words: Interleukin-4 induced gene 1 (IL4I1), Immunosuppressive Enzyme, tumor escape