



Les cellules Myéloïdes Dans le Microenvironnement Tumoral : Rôle de FasL

Sanam Peyvandi

► To cite this version:

Sanam Peyvandi. Les cellules Myéloïdes Dans le Microenvironnement Tumoral : Rôle de FasL. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T042 . tel-00968103

HAL Id: tel-00968103

<https://theses.hal.science/tel-00968103>

Submitted on 31 Mar 2014

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
SUD**
Université Paris Sud XI-
Faculté de Médecine 63
Rue Gabriel Péri, 94270
Le Kremlin-Bicêtre



 Institut de cancérologie
GUSTAVE ROUSSY
VILLEJUIF - www.igr.fr

114 Rue Édouard Vaillant,
94805, Villejuif

Inserm
● Unité 753

Thèse de Doctorat

École Doctorale de Cancérologie : Biologie, Médecine, Santé

Les cellules Myéloïdes Dans le Microenvironnement Tumoral : Rôle de FasL

Présentée Par

Sanam PEYVANDI

Pour Obtenir le Titre de Docteur de l'Université Paris 11 - Sud

Soutenue le 9 Juillet 2013 Devant le Jury Composé de :

Pierre BOBÉ (Président du Jury)

Armelle BLONDEL (Rapporteur)

Ali BETTAIEB (Rapporteur)

Jean KANELLOPOULOS (Examineur)

Saoussen KARRAY (Directeur de Thèse)

Résumé

La voie Fas-FasL est la voie majeure d'apoptose dont le rôle est indispensable pour l'homéostasie des cellules hématopoïétiques et la tolérance périphérique. Mon projet de thèse consiste à étudier le rôle de FasL dans la réponse anti tumorale, notamment le rôle de son expression sur les cellules myéloïdes, en l'occurrence les macrophages et les mélyloïdes suppressives.

Les souris *Fasl KO* sont caractérisées par une accumulation des différentes populations de cellules hématopoïétiques dans les organes lymphoïdes périphériques . Cependant, elles ne développent pas de tumeurs spontanées. De façon intéressante, nos résultats montrent que lors qu'elles sont transplantées par les cellules tumorales, leur survie est significativement diminuée par rapport aux souris contrôles (*Fasl^{fl/fl}*), ce qui suggère un rôle de FasL dans la réponse anti-tumorale. Une caractérisation fine de la répartition des cellules myéloïdes chez les souris *Fasl KO* porteuses de tumeur, montre une répartition différentielle des cellules Gr1⁺, par une accumulation des M-MDSC, dans la rate de ces souris. En plus, un enrichissement de l'infiltrat tumoral par les macrophages TAM chez les souris *Fasl KO* a été observé. Ces macrophages, indépendamment de génotype exècrent une forte activité d'arginase et iNOS et une inhibition de la prolifération des cellules T in vitro. Ainsi, la mortalité plus importante chez les souris *Fasl KO* pourrait, en partie, être associée à cet enrichissement des TAM dans l'infiltrat des souris déficientes en FasL.

Afin de déterminer si cette accumulation des cellules myéloïdes immunosuppressives déficientes en FasL est spécifique d'un environnement tumoral ou le reflet d'un état inflammatoire, nous avons examiné le phénotype des macrophages dans un modèle d'inflammation induite par le thioglycolate. Les résultats montrent que les macrophages $CD11b^+F480^+$, recrutés sur le site de l'inflammation, lorsqu'elles sont déficientes en FasL, sur-expriment les gènes anti-inflammatoires comme IL-10, Arg1, CCL17. La caractérisation plus fine de cette population de macrophages a montré que la population responsable de ce phénotype suppressive est $F480^+CD115^+IL-4R^+$. Chez les souris *Fasl KO*, le pourcentage des macrophages $F480^+CD115^+IL-4R^+$ est significativement augmenté en comparaison avec les souris contrôles. L'analyse fonctionnelle de cette population $CD115^+$ a montré que ces cellules, inhibent la prolifération et la production d'IFN- γ des cellules T activées. Ces caractéristiques fonctionnelles sont en faveur d'un phénotype anti-inflammatoire de ces macrophages, qui lorsqu'ils sont déficients en FasL, leur recrutement sur le site de l'inflammation est plus important.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'expression de FasL sur les cellules myéloïdes pourrait jouer un rôle dans leur polarisation vers un phénotype pro inflammatoire. Ainsi, ce travail pourrait apporter de nouvelles approches de levée de l'immunosuppression pour une immunothérapie efficace.

تقدیم بہ کل مریم زندکیم

À ma mère

Tu es partie trop tôt mais tu es à tout jamais dans mon coeur.

Remerciements

J'exprime ma sincère reconnaissance à l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail de thèse :

Je remercie le Pr. Pierre Bobé de me faire l'honneur de présider ce jury. J'adresse mes remerciements au Dr. Armelle Blondel et au Dr. Ali Bettaieb pour avoir eu la gentillesse d'être rapporteurs de ce travail. Je remercie également le Pr. Jean Kanellopoulos de me faire l'honneur d'accepter de faire partie de mon jury en qualité d'examineur.

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma reconnaissance au Dr. Salem Chouaib pour m'avoir accueilli au sein de son unité et pour la confiance qu'il m'a accordé au cours de ces années. Je le remercie pour son soutien et ses conseils.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Dr. Saoussen Karray qui m'a accueillie au sein de son équipe. Durant ces années de thèse, elle m'a aidé au niveau scientifique à acquérir de la rigueur scientifique et de l'esprit critique. Je la remercie également pour toute l'attention et le soutien inconditionnels qu'elle a pu me porter sur le plan personnel et professionnel surtout pendant les moments les plus durs. Qu'on se le dise, cette expérience à la fois scientifique et humaine m'a permis de montrer que le travail et la persévérance sont sources d'accomplissement.

Je souhaite remercier Dr. Boubekour Samah, avec qui nous avons travaillé pendant 2 ans sur ce projet, et qui m'a aidé énormément sur la réflexion intellectuelle par nos discussions scientifiques.

Je souhaite exprimer mes profondes gratitude à Stéphanie Buart, avec qui j'ai passé beaucoup de temps et elle m'a aidé énormément ainsi que de sa gentillesse et des nombreuses discussions que nous avons eues.

J'adresse mes remerciements aux Dr Fathia Mami Chouaib, Dr Jean-Henri Bourhis, Dr Sophie Gad, Dr Sophie Couve, Pr Stéphane Richard et au Dr. Jérôme Thierry.

Je tiens à remercier chaleureusement mes chères Marie Boutet et Yosra Messai, pour nos moments ensemble mais aussi pour avoir supporté mon humeur et mes discussions souvent peu passionnantes et qui m'ont beaucoup soutenue moralement ces derniers jours. Je n'oublierai jamais vos disponibilités et votre gentillesse. Je souhaite bon courage à Marie qui va soutenir bientôt sa thèse.

Je souhaite remercier également à Marie Vetizou pour son apport sur ce projet et nos discussions et je lui souhaite le meilleur dans sa vie professionnelle car elle le mérite. Je tiens à exprimer mes gratitude à Dr. Meriem Hasmim pour sa gentillesse, sa disponibilité et son soutien et aussi au Dr. Zaeem Noman pour nos échanges scientifiques et parfois techniques.

Je souhaite aussi tout particulièrement remercier Christine Leroy pour sa gentillesse et sa disponibilité, et lui témoigner ici ma plus grande sympathie.

Je souhaiterais également remercier les différentes personnes passées ou encore présentes dans le laboratoire pour tous les bons moments passés avec eux : Abdérémane Abdou, Jane Muret, Isabelle Vergnon, Aurélie Durgeau, M'barka Mokrani, Fayçal Djenidi, Thouraya Ben

Safta, Mouna Tabbeck et très particulièrement Arash Nanbakhsh à qui je souhaite beaucoup de réussite pour la suite de son projet. J'espère qu'il ne va jamais perdre son persévérance et courage.

Je souhaite bon courage pour ma chère Intissar Akalay qui soutiendrait bien tôt sa thèse. Je n'oublie pas non plus Mélanie Polrot pour sa précieuse aide technique à l'animalerie, Yann Lecluse et Philippe Rameau pour toutes leurs compétences en cytométrie en flux.

Je tiens à remercier l'association pour la recherche de cancer (ARC), pour leur soutien financier lors de ma quatrième année de thèse.

J'exprime ma profonde gratitude à ma famille, mon père et ma chère soeur, et mes amis pour m'avoir encouragée tout au long de mes études, même lorsque je baissais les bras et plus particulièrement, mon père qui m'a soutenue inconditionnellement. J'aurais souhaité de tout mon cœur que vous soyez présent lors de ce moment inoubliable. Sans vous, la vie était beaucoup plus difficile pour moi. Mon cher oncle, Saeed, je vous remercie infiniment d'être là, être disponible à tout moment, me soutenir en l'absence de mon père. Vous m'avez appris la façon de vivre, la façon devenir mature.

Mes meilleures amies, Sarah, Anahita et Setareh, je vous remercie infiniment pour votre soutien, votre amour et gentillesse. Je te souhaite le meilleur ma chère Anahita pour ta thèse et d'avoir ce que tu mérites dans la vie. Setareh , ne perds jamais ton espoir et persévérance.

J'exprime ma reconnaissance de tout mon cœur à Sam. Sans ton soutien, je n'aurai jamais réussi cette thèse. Les mots ne peuvent pas exprimer mes profonds sentiments de gratitude. Je te remercie de m'avoir toujours écoutée, soutenue et encouragée. Enfin, notre fleur commence à fleurir dans ce printemps tardé.

Liste des Abbreviations

Ac	Anticorps
ADN	Acide desoxynucléique
Ag	Antigène
AICD	Activation-induced cell death
APC	Cellule Présentatrice d'Antigènes
ARN	Acide ribonucléique
Bcl-2	B cell lymphoma 2
β 2m	Bêta 2 microglobuline
cFLIP	cellular FLICE/caspase-8 Inhibitory Protein
CRD	Cystein Rich Domain
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CTL	Lymphocyte T Cytotoxique
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4
DC	Cellule Dendritique
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DN	Dominant-Négatif
EGF	Epidermal Growth Factor
FADD	Fas-Associated Death Domain

FAS L	Fas Ligand
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Fator
Gr	Granzyme
HLA	Human Leucocyte Antigen
ICAM	Intercellular adhesion molecule-1, also called CD54
IDO	Indoleamine-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
LMP	Low Molecular weight Protein
LOH	Loss of Heterozygosity
LT	Lymphocyte T
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCA	Méthylcholanthrène
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MDSC	Myeloid derived suppressive cells
MTOC	MicroTubule Organizing Center
NF κ B	Nuclear Factor - κ B
NK	Natural Killer cell
NKT	Natural Killer T cell
NO	Nitric Oxide
M-CSF	Macrophages Colony Stimulating Factor
MMP	Matrix Metalloproteinase
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
PD-1	Programmed cell Death-1
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PI-9	Protease Inhibitor-9

PLAD	Pre ligand Assembly Domain
PMN	Polymorphonuclear
ROS	Reactive Oxygen Species/Espèces Réactives de l'Oxygène
SCID	Severe Combined Immunodeficiency Disease
SODD	Silencer of Death Domain
STAT	Signal Transducer and Activation of Transcription
TAA	Tumor Associated Antigen
TAM	Tumor Associated Macrophage
TAP	Transporter associated with Antigen Processing
TCR	T Cell Receptor
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TH	Helper T cell
THD	TNF Homology Domain
TLR	Toll Like Receptor
TMD	Domaine transmembranaire « transmembrane domain »
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TRAIL-R	TRAIL Receptor
TRADD	TNF Recombination Associated Death Domain
TRAF	TNF Receptor Associated Factor
Treg	T régulateur
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Table des matières

Résumé	ii
Remerciements	v
Liste des Abbreviations	viii
1 Introduction	1
1.1 La réponse immunitaire anti-tumorale	2
1.1.1 Le concept de l'immunosurveillance anti-tumorale	2
1.1.2 Les effecteurs de la réponse anti-tumorale	4
1.1.2.1 L'immunité innée	5
1.1.2.2 Immunité adaptative	6
1.1.2.2.a Les cellules T CD8 ⁺	7
1.1.2.2.b Les cellules T CD4 ⁺	8
1.1.3 Mécanismes de cytotoxicité des cellules immunitaires	11
1.1.3.1 La voie Perforine/ Granzymes	11
1.1.3.2 La voie des récepteurs à domaine de mort	12
1.1.3.3 La voie TNF/TNF-R	13
1.1.3.4 La voie TRAIL/TRAIL-Rs	14
1.1.3.5 La voie de Fas / FasL	15

1.2	La voie de signalisation de Fas/ FasL dans le système immunitaire	16
1.2.1	Structure biologique de Fas et FasL	16
1.2.2	Expression	17
1.2.3	La voie de signalisation d'apoptose par Fas/FasL	19
1.2.4	Rôles physiologique de la signalisation de la voie Fas et FasL	22
1.2.4.1	Rôle de Fas/FasL dans la tolérance périphérique et l'homéostasie des cellules immunes.	22
1.2.4.2	Rôle de voie Fas/FasL dans la cytotoxicité par les cellules T et NK.	24
1.2.4.3	Les rôles non-apoptotiques de la voie Fas/FasL.	25
1.2.4.4	Fas/FasL et la tumeur.	26
1.3	Echappement des cancers aux réponses immunitaires	28
1.3.1	Théorie de l'« immunoediting »	28
1.3.1.1	La phase d'élimination	28
1.3.1.2	La phase d'équilibre	28
1.3.1.3	La phase d'échappement	31
1.3.2	Les mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire . . .	31
1.3.2.1	Echappement à la reconnaissance : Altération de la présentation antigénique	33
1.3.2.2	Echappement à la lyse : Résistance à l'apoptose.	34
1.3.2.2.a	Résistance à l'apoptose initiée par les récepteurs à domaine de mort.	34
1.3.2.2.b	Résistance à la mort induite par perforine/granzyme.	36
1.3.2.3	Délétion des lymphocytes T	37
1.3.2.4	Production des facteurs immunosuppresseurs	37
1.3.2.4.a	TGF- β	37
1.3.2.4.b	IL-10.	38

1.3.2.4.c	VEGF.	39
1.3.2.4.d	IL-6 et M-CSF.	39
1.3.2.4.e	IDO.	39
1.3.2.4.f	iNOS et <i>NO</i>	40
1.3.2.4.g	Les prostaglandines.	41
1.3.3	Immunosuppression et induction de tolérance	41
1.3.3.1	Les lymphocytes T CD4 ⁺ CD25 ⁺ régulateurs	42
1.3.3.2	Les macrophages	45
1.3.3.2.a	Les monocytes.	46
1.3.3.2.b	Hétérogénéité des monocytes.	47
1.3.3.2.c	La différenciation des monocytes en macrophages.	48
1.3.3.2.d	Polarisation des macrophages.	49
1.3.3.2.d.i	Les macrophages M1.	50
1.3.3.2.d.ii	Les macrophages M2.	52
1.3.3.2.e	Différenciation intra-tumorale des TAM.	54
1.3.3.2.f	Rôle des TAM dans la progression tumorale.	55
1.3.3.3	Les cellules suppressives myéloïdes (MDSC)	57
1.3.3.3.a	Définition et caractérisation.	57
1.3.3.3.b	Mécanismes d'immunosuppression par les MDSC.	59
1.3.3.3.b.i	Arginase 1 et iNOS.	59
1.3.3.3.b.ii	ROS (Reactive Oxygen Species).	60
2	Objectifs des Travaux	62
3	Résultats	64
3.1	La déficience en FasL n'affecte pas la différenciation et la maturation des cellules myéloïdes	65
3.1.1	Répartition cellulaire dans la moelle osseuse.	65

3.1.2	Différenciation et maturation des cellules myéloïdes	67
3.2	L'homéostasie des cellules myéloïdes en périphérie est régulée par la voie de Fas/FasL	71
3.2.1	Répartition des différentes populations myéloïdes dans le sang	71
3.2.2	Répartition des différentes populations myéloïdes dans la rate	72
3.3	Inefficacité de la réponse anti-tumorale chez les souris <i>Fasl KO</i>	75
3.3.1	Répartition des cellules immunitaires dans la rate	76
3.3.2	Répartition des cellules immunitaires dans l'infiltrat tumoral	80
3.3.3	Caractérisation fonctionnelle des cellules myéloïdes dans la rate et l'infiltrat.	82
3.3.3.1	Caractérisation fonctionnelle des cellules Gr1 ⁺ de la rate . .	82
3.3.3.1.a	Profil génique.	82
3.3.3.1.b	Activité immunosuppressive des cellules Gr1 ⁺	83
3.3.3.2	Caractérisation fonctionnelle des cellules myéloïdes de l'infiltrat	85
3.3.3.2.a	Les cellules Gr1 ⁺	85
3.3.3.2.b	Les macrophages.	86
3.4	Rôle pro-inflammatoire de FasL dans un modèle d'inflammation expérimentale	88
3.4.1	Profil génique des macrophages induit par thioglycolate	88
3.4.2	Caractérisation phénotypique des cellules induites par thioglycolate .	91
3.4.3	Caractérisation fonctionnelle des macrophages F480 ⁺ CD115 ⁺ IL-4R ⁺	93
3.4.3.1	Profil d'expression génique	93
3.4.3.2	Inhibition de la réponse proliférative T par les macrophages F480 ⁺ CD115 ⁺ IL-4R ⁺	96
3.4.3.3	Mécanismes d'inhibition de la réponse proliférative exercés par les macrophages F480 ⁺ CD115 ⁺ IL-4R ⁺	97
3.4.3.4	Amplification de cellules T CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺	100

4	Discussion	102
4.1	La relevance de la voie Fas/FasL dans l'homéostasie des cellules immunitaires	103
4.2	Rôle de FasL dans la réponse anti-tumorale	104
4.3	Rôle de FasL dans un modèle d'inflammation expérimentale	108
4.4	Rôle de FasL dans l'accumulation des macrophages ?	109
5	Matériels et Méthodes	111
	Bibliographie	120

Table des figures

1.1	Les différentes sous populations des cellules T CD4 : TH1, TH2, TH17 et Treg	9
1.2	Voies de cytotoxicité des CTL	13
1.3	Structure de Fas et FasL	17
1.4	Les voies extrinsèques et intrinsèques conduisent à l'apoptose	21
1.5	Trois phases d'immunoediting du cancer	29
1.6	Les mécanismes de l'échappement de tumeur	32
1.7	Le métabolisme de L-arginine dans les macrophages	40
1.8	Les interactions entre les cellules de système immunitaire et les cellules tumorales dans le microenvironnement tumoral	42
1.9	Les mécanismes d'action des cellules T régulatrices	44
1.10	Développement des sous-populations monocytaires chez la souris	48
1.11	Les trois phénotypes des macrophages : M1 (Classique), M2-like (Alternative) et Régulateurs	51
1.12	Le rôle des TAM dans l'immunobiologie des tumeurs	56
1.13	Les mécanismes de suppression induits par les différentes sous-populations des MDSC	60
3.1	L'homéostasie des cellules dans la moelle osseuse est indépendante de FasL .	66
3.2	La différenciation des macrophages est indépendante de FasL	68

3.3	Maturation des macrophages in vitro en présence de LPS n'est pas régulée par FasL	69
3.4	Maturation des macrophages in vitro en présence d'IL-4 n'est pas régulée par FasL	70
3.5	L'homéostasie des cellules myéloïdes dans le sang est régulée par FasL	72
3.6	L'homéostasie des cellules myéloïdes dans la rate est régulée par FasL	73
3.7	La survie des souris porteuses de tumeur est affectée par la présence de FasL	75
3.8	FasL régule la répartition des sous-populations des cellules Gr1 ⁺ dans la rate des souris porteuses de tumeur	77
3.9	Amplification des cellules T CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ dans la rate des souris FasL déficientes porteuses de tumeur	79
3.10	Répartition des populations des cellules myéloïdes dans l'infiltrat des souris porteuses de tumeur	81
3.11	Les cellules Gr1 ⁺ FasL déficientes sur expriment les gènes anti-inflammatoires	83
3.12	Les cellules Gr1 ⁺ issues des souris FasL déficientes montrent plus faible activité ROS par rapport aux souris <i>Fasl</i> ^{fl/fl}	84
3.13	Les cellules Gr1 ⁺ n'inhibent pas la prolifération des splénocytes activées de façon non-spécifique	85
3.14	Les cellules Gr1 ⁺ issues de l'infiltrat tumoral inhibent la prolifération des splénocytes activées de façon non-spécifique	86
3.15	Les macrophages d'infiltrat inhibent la prolifération des Splénocytes activées par anti-CD3	87
3.16	Phénotype inflammatoire des macrophages FasL déficients	90
3.17	Les macrophages recrutés se divisent en deux sous-population, macrophage et éosinophiles	92
3.18	Les souris déficientes en FasL accumulent les macrophages F480 ⁺ CD115 ⁺ à J3 post injection de thioglycolate	93

3.19 Les macrophages CD115 ⁺ FasL déficientes montrent un profil génique anti-inflammatoire	94
3.20 Les macrophages F480 ⁺ CD115 ⁺ IL-4R ⁺ montrent une forte activité arginase	95
3.21 Les macrophages F480 ⁺ CD115 ⁺ IL-4R ⁺ déficientes en FasL expriment fortement d'IL-10	95
3.22 Les macrophages CD115 ⁺ suppriment la prolifération des cellules T activées par anti-CD3	97
3.23 Les macrophages CD115 ⁺ utilisent deux voies iNOS et arginase pour inhiber la prolifération des cellules T	98
3.24 L'inhibition de la réponse proliférative par des macrophages CD115 ⁺ est dépendante de la voie iNOS	99
3.25 Les macrophages F480 ⁺ CD115 ⁺ IL-4R ⁺ amplifient les cellules T CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺	101

Chapitre 1

Introduction

1.1 La réponse immunitaire anti-tumorale

1.1.1 Le concept de l'immunosurveillance anti-tumorale

Le concept d'immunosurveillance anti-tumorale a été initialement émis par Paul Ehrlich au début du siècle dernier (Kristiansen et al., 2004). A partir des connaissances acquises en transplantation et en immunité anti-tumorale et surtout à partir de la découverte d'antigènes associés aux tumeurs (TAAs), les bases fondamentales de ce concept ont été formellement établies par Burnet et Thomas quelques années plus tard. Ils ont alors émis l'hypothèse que les cellules tumorales apparaissent continuellement au cours de la vie et que les lymphocytes T, comme des sentinelles, jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance et l'élimination permanentes des cellules tumorales avant qu'elles ne deviennent cliniquement visibles (Burnet et al., 1970; Thomas and Lawrence, 1959; Klein et al., 1966; Old and Boyse, 1964). A côté de nombreux mécanismes suppresseurs de tumeurs intrinsèques, ce processus d'immunosurveillance anti-tumorale constituerait ainsi un suppresseur extrinsèque de tumeurs. En effet, si la réparation de l'ADN, l'apoptose, ou la sénescence ne permet pas d'éliminer les cellules transformées, le système immunitaire interviendrait dans la destruction de ces dernières. Cependant, la validation de ce concept n'a pu être réellement réalisée que seulement récemment à travers une longue histoire de débats tendus (Dunn et al., 2002; Pardoll, 2003) avec le développement de nouvelles techniques permettant le ciblage de gènes et la génération de souris transgéniques. Bien que cela ait été plus compliqué, les preuves cliniques de l'immunosurveillance chez l'homme ont pu être apportées.

Les premières expériences sur des souris nude (présentant une atrophie thymique) n'ont pas permis de mettre en évidence une différence d'incidence de tumeurs spontanées ou induites par des carcinogènes chimiques (tel que le méthylcholanthrène ou MCA) par rapport à des souris immunocompétentes (Burstein and Law, 1971; Johnson, 1968; Nomoto and Takeya, 1969; Outzen et al., 1975; Stutman, 1974). Ces premiers résultats obtenus dans les années 70 ont donc fortement mis en doute la validité du concept d'immunosurveillance

anti-tumorale. Mais, dans les années qui suivirent, la souris nude a été reconnue comme un modèle imparfait d'immunodéficiency depuis la découverte de l'existence d'un nombre réduit mais fonctionnel de lymphocytes T (Hunig, 1983; Ikehara et al., 1984; Maleckar and Sherman, 1987). De plus, ces souris ne sont pas déficientes pour les cellules NK, lesquelles n'étaient pas encore bien définies à cette époque (Herberman et al., 1978), et qui sont aujourd'hui décrites pour jouer un rôle prépondérant dans l'immunité innée. D'ailleurs, la profonde influence de l'immunité innée sur l'immunité adaptative n'était pas encore reconnue (Janeway, 1989). Ces travaux pionniers chez la souris nude ne permettaient pas de conclure rigoureusement à la validité de la théorie de l'immunosurveillance anti-tumorale. Ce sont les modèles de souris KO, développés plus tard, ou l'utilisation d'anticorps monoclonaux qui ont permis de réévaluer et de mettre en évidence un rôle du système immunitaire dans le contrôle de la formation de tumeurs spontanées ou induites par des carcinogènes chimiques. Par exemple, les souris déficientes pour le gène codant le récepteur à l'IFN- γ (interféron- γ) ou STAT-1 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1), facteur de transcription impliqué dans la transduction du signal de l'IFN- γ ont montré une incidence plus élevée de tumeurs induites chimiquement par le MCA par rapport aux souris immunocompétentes (Kaplan et al., 1998). De la même manière, l'incidence de tumeurs induites par MCA ou spontanées est augmentée chez les souris déficientes pour Perforine, acteur essentiel dans l'action cytotoxique des lymphocytes T et des cellules NK (Street et al., 2004), ou pour TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) (Finnberg et al., 2008). Par ailleurs, cette augmentation se révèle plus importante dans un fond génétique muté pour le gène p53 codant pour la protéine suppresseur de tumeur p53. De la même manière, les souris déficientes pour les cellules T, B, et NKT développent plus rapidement et plus fréquemment des sarcomes chimiquement induits par MCA par rapport aux souris sauvages, et ces mêmes souris âgées développent plus de tumeurs spontanées (Shankaran et al., 2001). Cette altération est induite par la déficiency pour le gène "Recombinase Activating Gene" (RAG) 1 ou 2, codant pour les enzymes impliquées spécifiquement dans la recombinaison des gènes des récepteurs à l'antigène des lymphocytes

B, T, et également NKT (Smyth et al., 2003). L'ensemble de ces études confirme clairement que le système immunitaire contrôle la formation tumorale chez la souris, permettant ainsi de valider de manière expérimentale le concept d'immunosurveillance anti-tumorale et surtout la participation à la fois de l'immunité innée et adaptative.

Chez l'homme, la démonstration formelle de ce concept d'immunosurveillance anti-tumorale est plus compliquée. En effet, bien qu'il a été initialement montré une augmentation de l'incidence de certains cancers chez les individus immunodéprimés, il a été par la suite démontré que ces tumeurs présentaient pour la plupart une origine virale (Epstein-Barr Virus, Herpes Virus, Papillome Virus, etc.) reflétant la susceptibilité accrue de ces patients aux infections (Dunn et al., 2002; Pardoll, 2003). Néanmoins, un risque plus élevé de développer des cancers ne présentant pas d'étiologie virale comme des cancers du poumon, du rein, du colon, du pancréas et des mélanomes a été observé chez de nombreux patients immunodéprimés suite à une greffe d'organe (Dunn et al., 2004). Par ailleurs, les études de Galon et d'autres équipes ont bien mis en évidence la corrélation positive entre la présence d'infiltrat lymphocytaire au sein de la tumeur et la survie globale des patients atteints (Galon et al., 2006, 2007; Mlecnik et al., 2011). En effet, cette corrélation a été obtenue dans le cas de différents cancers comme mélanome (Clark et al., 1989; Tefany et al., 1991; Mihm Jr et al., 1996), cancer du sein (Mahmoud et al., 2011; Menegaz et al., 2008), du colon (Pages et al., 2008; Tosolini et al., 2011), de la prostate (Kärjä et al., 2005; Richardsen et al., 2008), de l'ovaire (Hamanishi et al., 2007; Sato et al., 2005) ou encore pour les neuroblastes (Dunn et al., 2004). En résumé et même si les résultats ne sont pas aussi concluant que chez la souris, il existe un faisceau d'arguments forts qui abonde dans le sens de l'existence d'une immunosurveillance anti-tumorale chez l'homme (Crocì et al., 2007; Smyth et al., 2006).

1.1.2 Les effecteurs de la réponse anti-tumorale

Le développement d'une réponse immunitaire à l'agression constituée par l'émergence et la croissance d'une tumeur se traduit par l'activation de deux systèmes de défense : une

réponse innée qui constitue la première ligne de défense suivie d'une réponse spécifique ou adaptative. Ces deux types de réponse résultent de l'activation d'un enchevêtrement complexe de cellules immunocompétentes qui vont coopérer entre elles afin d'éliminer, tout du moins potentiellement, les cellules tumorales.

1.1.2.1 L'immunité innée

La réponse immunitaire innée correspond à la première ligne de défense de l'organisme contre les infections et différents effecteurs de ce système ont été impliqués dans le contrôle de la croissance tumorale, notamment les macrophages et les cellules NK (Natural Killer) (Galon et al., 2012; Smyth et al., 2001; Godfrey et al., 2000).

Les cellules NK jouent un rôle clé dans le système immunitaire inné et sont capables d'induire la lyse de nombreuses cellules tumorales. Leur fonction est régulée par une balance de signaux inhibiteurs et activateurs, transmis respectivement par des récepteurs inhibiteurs se liant aux molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), et par des récepteurs activateurs se liant à différents ligands exprimés par les cellules infectées par des virus ou par les cellules tumorales (Smyth et al., 2002). De plus, les cellules NK répondent à de nombreuses cytokines comme l'IL-2, l'IL-12, l'IL-15 et les interférons de type I (α et β), qui augmentent leurs capacités lytiques, sécrétoires et prolifératives ainsi que leur potentiel anti tumoral.

Les macrophages, autres partenaires de système immunité innée, sont des cellules spécialisées dans la phagocytose, mais possèdent également, comme les cellules NK, une capacité cytotoxique naturelle. Des cytokines (TNF) ou d'autres agents produits par les macrophages (NO, H₂O₂) seraient responsables de cette cytotoxicité. Au contraire, certains facteurs présents dans l'environnement tumoral peuvent altérer le phénotype des macrophages et leur accorder une fonction pro-tumorale. Je vais discuter sur l'origine, la plasticité et les phénotypes des macrophages dans la partie 1.3.3.2.

Le rôle d'autres effecteurs de l'immunité innée (éosinophiles, neutrophiles,...) a pu être

démontré dans des situations expérimentales très particulières, néanmoins, ces cellules ne semblent participer que modestement au contrôle de la réponse anti-tumorale.

1.1.2.2 Immunité adaptative

La réponse immune adaptative se base essentiellement sur la reconnaissance de peptides antigéniques par les cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$. L'identification et la caractérisation de TAA (Tumor Associated Antigen) ont permis de mettre en évidence une réponse CTL spécifiquement dirigée contre ces antigènes tumoraux. Néanmoins, la réponse cellulaire T dirigée contre la tumeur ne se limite pas à une réponse T $CD8^+$ mais aussi une réponse par les cellules T $CD4^+$. Le rôle des lymphocytes T dans la réponse immune a été mis en évidence dans un premier temps par l'équipe de Schreiber en 2001 en utilisant des souris mutées sur le gène RAG2 (Shankaran et al., 2001). L'inactivation de ce gène qui est exprimé uniquement dans les lymphocytes et qui est nécessaire au réarrangement V(D) J des chaînes du récepteur des lymphocytes T (TCR) et du récepteur des lymphocytes B (BCR), empêche la génération de lymphocytes B et T matures dans ces souris (Shinkai et al., 1992).

Il est bien montré que ces souris développent plus rapidement et plus fréquemment des tumeurs induites par MCA par rapport les souris sauvages. Par la suite, de nombreuses études ont étendu ces observations en identifiant quels lymphocytes RAG2-dépendants pouvaient contribuer aux défenses anti tumorales. Ces travaux ont mis en avant un rôle important des populations T dans le processus d'immunosurveillance anti tumorale.

La majorité des lymphocytes T qui sortent du thymus et circulent dans le sang entrent dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, lymphatiques, plaques de Peyer et rate), expriment un TCR formé par l'association de deux chaînes protéiques, α et β , leur permettant de reconnaître des antigènes peptidiques présentés par une CPA (Cellule Présentatrice Antigène) dans les ganglions lymphatiques. Pour avoir un nombre suffisant de lymphocytes T spécifiques de l'antigène en réponse à la stimulation antigéniques, les lymphocytes doivent être activées et proliférer, processus appelé « Expansion Clonale », qui permet de différencier

ces cellules en cellules effectrices.

1.1.2.2.a Les cellules T CD8⁺ . De nombreuses études réalisées ces 20 dernières années démontrent que les lymphocytes T CD8⁺, aussi appelés lymphocytes T cytotoxiques (CTL), jouent un rôle important dans les réponses immunitaires anti-tumorales. Les lymphocytes T CD8⁺ naïfs vont continuellement de sang périphérique vers les organes lymphoïdes secondaires où leur différenciation va s'initier vers les effecteurs cytotoxiques après leur activation par les CPA professionnelles qui présentent des complexes CMH de classe I/peptide. Au cours de ce processus, les CPA expriment à leur surface un ensemble de récepteurs qui attirent les lymphocytes vers ces organes et qui leurs permettent de pénétrer dans ceux-ci. CCR7 est le récepteur principal impliqué dans le chimiotactisme des lymphocytes T vers les ganglions (Miyasaka and Tanaka, 2004). Il permet aux lymphocytes de répondre aux chimio-kines CCL21 et CCL19 respectivement produites par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins lymphatiques appelées HEV (High Endothelium Veinule) et par les cellules stromas entourant ces structures. L'expression de CD62L sur les lymphocytes CD8⁺ permet le ralentissement et le roulement des lymphocytes le long de la paroi des HEV, et par la suite leur entrée dans les ganglions lymphatiques (Miyasaka and Tanaka, 2004).

La voie d'activation des lymphocytes T CD8⁺ anti-tumoraux par la tumeur est celle de la présentation croisée d'antigènes tumoraux restreints par les molécules de classe I du CMH, par le biais des cellules dendritiques, nécessitant à la fois une fonction T CD4⁺ et la sécrétion de cytokine par la CPA (IL-12) et par la cellule T CD4⁺ (profil de type Th1/sécrétion d'IL-2, IL-4, IL-12). Cette différenciation des cellules T CD8⁺ en cellules CTL repose sur d'importantes modifications de leur profil d'expression génique et sur l'acquisition de différentes fonctions importantes (Kaech et al., 2002).

Après leur activation par les CPA, les cellules CD8⁺ vont exprimer les molécules nécessaires pour exercer les fonctions cytotoxiques contre leurs cellules cibles, comme la Perforine, les Granzymes A et B, Fas ligand (FasL), l'Interféron- γ (IFN- γ) ou le TNF- α .

Suite à leur activation, les CTLs ont deux types de mécanismes de cytotoxicité : Le premier mécanisme correspond à la voie Perforine/Granzymes qui consiste en l'exocytose polarisée du contenu de granules cytotoxiques aboutissant à la libération de différentes protéines cytolytiques (Perforine et serines protéases appartenant à la famille des Granzymes) au niveau de la synapse immunologique. Après sécrétion, ces Granzymes vont être internalisés par la cellule cible et activer sa mort cellulaire programmée par apoptose. Le second mécanisme correspond à la voie des récepteurs à domaine de mort appartenant à la superfamille du récepteur au TNF qui consiste en l'activation de récepteurs induisant un signal pro apoptotique, au niveau de la cellule cible, suite à leur engagement par leurs ligands exprimés par les CTLs activés. Les principaux récepteurs identifiés sont le récepteur de type I au TNF (TNF RI /p55/CD120a), le récepteur Fas (CD95) et les récepteurs à TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) DR4 et DR5. Leur engagement dépend respectivement du TNF, Fas Ligand (FasL) et TRAIL (Dorothee et al., 2004).

1.1.2.2.b Les cellules T CD4⁺ . Historiquement, l'étude de la réponse immunitaire T anti tumorale s'est focalisée sur la réponse lymphocytaire T CD8⁺, premièrement par le fait que les CTL peuvent directement détruire la tumeur, et secondairement par l'observation que de nombreux antigènes putatifs sont issus de protéines intracellulaires, présentés dans le contexte des molécules de classe I du CMH. Néanmoins, il est maintenant clairement établi que la réponse T CD4⁺ auxiliaire (TH, T Helper) joue un rôle crucial dans la réponse immune anti tumorale. En effet, les cellules TH ont un rôle central dans le développement d'une réponse immunitaire en activant les effecteurs spécifiques d'antigène et en recrutant les cellules du système immunitaire inné comme les macrophages (Knutson and Disis, 2005). Deux sous-types majeurs de cellules CD4⁺ existent : les cellules de type TH1, TH2, et aussi il existe deux sous-types mineurs : TH17 et les cellules T régulatrices (Figure 1.1).

Les cellules de type TH1 se caractérisent par la sécrétion d'IFN- γ , d'IL-12 et de TNF- α qui sont impliqués dans l'activation, le développement et la persistance d'une réponse CTL.

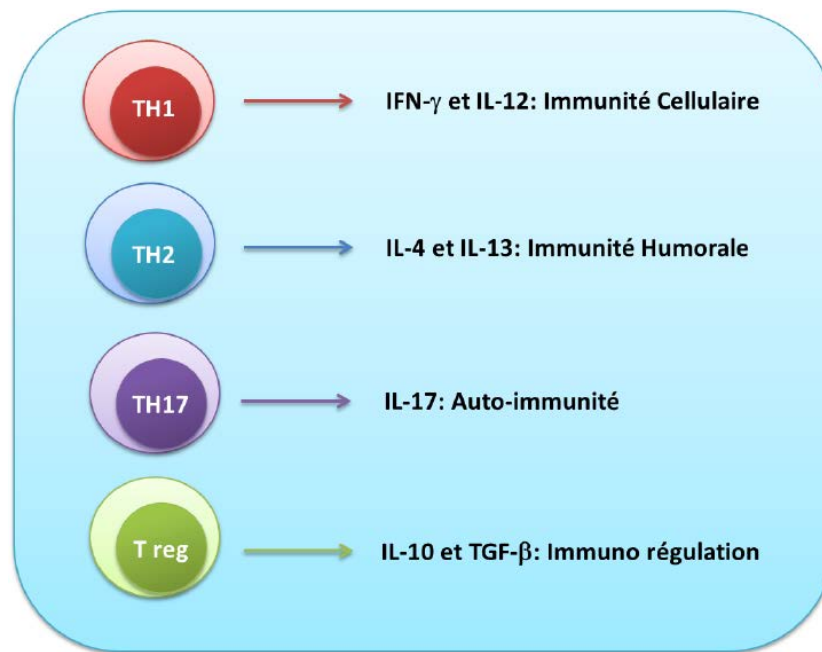


FIGURE 1.1 – Les différentes sous populations des cellules T CD4 : TH1, TH2, TH17 et Treg.

Les cellules de type TH2 sont, quant à elles, caractérisées par la sécrétion d'IL-4 et IL-13 et sont impliquées dans le développement d'une réponse humorale. Un autre sous type de T CD4⁺, qui se développe indépendamment des TH1 et TH2, a récemment été décrit, les lymphocytes Th17. Ces cellules sont caractérisées principalement par la production d'IL-17A, d'IL-17F, de TNF- α et d'IL-6 et semblent jouer un rôle dans de nombreuses pathologies auto-immunes (Kryczek et al., 2008) et aussi dans le cancer. Récemment, il y a de plus en plus des études qui montrent une corrélation avec la présence des cellules TH17 et la progression tumorale dans les patients atteints de cancer (Kryczek et al., 2009). Un autre sous-type de lymphocytes T CD4⁺ qui trouve son origine dans le thymus et qui représente 5-6% des lymphocytes T CD4⁺ circulants fait également l'objet d'intenses recherches ces dernières années. Il s'agit des lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ régulateurs (Treg) dont le rôle sera détaillé plus loin.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'activation des lymphocytes T CD8⁺ est via la

présentation croisée de peptides tumoraux restreints par les molécules de classe I du CMH par le biais des cellules dendritiques. Néanmoins, un signal d'aide délivré par les cellules T CD4⁺ est crucial pour une activation complète des cellules T CD8⁺. Ainsi, l'interaction entre le complexe CMH de classe II/peptide exprimé par la DC et le TCR de la cellule T CD4⁺ va permettre à la DC d'induire l'expression de CD40L sur la cellule T CD4⁺. L'interaction CD40/CD40L va induire la maturation terminale de la DC, en augmentant son expression de CD80 et CD86, et induire sa sécrétion d'IL-12. Cette stimulation des DC via CD40 est ainsi un facteur critique pour rendre les DC pleinement compétentes pour l'activation des cellules T CD8⁺. De plus, Giuntoli et al. (2002); Meunier et al. (2012) ont montré une interaction directe entre CTL-CD8⁺ et cellules CD4⁺ dans un modèle in vitro. La fonction des CTL pourrait ainsi être augmentée par les cellules CD4⁺ par le contact entre les molécules de co-stimulation présentes à la surface des cellules T CD8⁺ et les molécules de classe II du CMH présentes à la surface des cellules T auxiliaires (Giuntoli et al., 2002; Meunier et al., 2012). Par ailleurs, un rôle fondamental des cellules T CD4⁺ dans le développement d'une mémoire T CD8⁺ fonctionnelle a été décrit (Bourgeois et al., 2002; Janssen et al., 2003; Shedlock and Shen, 2003; Sun and Bevan, 2003). Selon ces travaux, il semble que les cellules T CD8⁺ générées en l'absence de cellules T CD4⁺ soient incapables de générer une réponse secondaire. En effet, les cellules T CD8⁺ mémoires générées en présence de cellules T CD4⁺ répondent par la suite normalement à une ré-stimulation antigénique et sont capables d'une expansion secondaire, même en l'absence d'une activité auxiliaire, alors que les cellules T CD8⁺ mémoires générées en absence de lymphocytes T CD4⁺ présentent un défaut de réponse secondaire, malgré la présence à ce moment de cellules T CD4⁺. Le signal d'aide délivré par les cellules T CD4⁺ lors de l'activation primaire des lymphocytes T CD8⁺ semble donc être nécessaire pour la différenciation de cellules CD8⁺ mémoires possédant la capacité de développer une réponse secondaire.

Enfin, différents travaux ont permis de mettre en évidence des fonctions effectrices des cellules T CD4⁺. Il a été ainsi montré que les cellules de type TH1 produisent de l'IFN- α

qui active la production de *NO* et de super oxyde par les macrophages intra tumoraux, qui eux-mêmes exercent une activité anti tumorale. De plus, les macrophages peuvent être directement impliqués dans le rejet de tumeurs induit par la sécrétion d'IL-12 provenant des cellules TH1 (Tsung et al., 2002). De même, les cellules de type TH2 sont capables de recruter et d'activer des éosinophiles capables de produire des facteurs anti tumoraux (Hung et al., 1998). Par ailleurs, les cellules TH1 possèdent une activité anti tumorale in vivo dépendante de leur activité anti-angiogénique, en relation avec certaines cytokines qu'elles produisent, en particulier l'IFN- γ , et son récepteurs exprimé par les cellules non-hématopoïétiques du stroma tumoral (Qin and Blankenstein, 2000).

En résumé, les cellules T CD4⁺ jouent un rôle fondamental pour l'initiation et le maintien d'une réponse T CD8⁺ fonctionnelle. De plus, ces cellules dites auxiliaires sont capables d'exercer une activité cytotoxique propre, soit indirectement en recrutant des macrophages et des éosinophiles, soit en inhibant la néo-angiogenèse tumorale, soit en exerçant une activité lytique directe vis à vis des cellules tumorales CMH-II⁺ (Quezada et al., 2010).

1.1.3 Mécanismes de cytotoxicité des cellules immunitaires

Après l'activation des CTLs et des cellules NK, ces cellules vont entrer dans une phase effectrice qui va leur permettre de lyser spécifiquement leurs cellules cibles. Pour ce faire, deux types de mécanismes sont à la disposition de ces cellules tueuses : La voie intrinsèque et la voie extrinsèque.

1.1.3.1 La voie Perforine/ Granzymes

La voie Perforine/Granzymes est basée sur l'exocytose polarisée du contenu de granules cytotoxiques par les cellules tueuses (CTL et ainsi que les cellules NK—Figure 1.2). Ces granules lytiques sont des lysosomes sécrétoires spécialisés contenant différentes protéines

impliquées dans la mort par apoptose de la cellule cible (Pipkin and Lieberman, 2007; Lieberman, 2003). Un des constituants essentiels de ces granules est la Perforine. Présentant une analogie de structure avec la protéine C9 du complément, la Perforine est caractérisée par sa capacité à former des pores par multimérisation dans les membranes cellulaires de manière Ca^{2+} dépendante (Tschopp and Nabholz, 1990) et permet ainsi l'internalisation passive des autres constituants des granules dans la cellule cible (Young et al., 1987). Les autres constituants essentiels de ces granules sont les Granzymes (pour Granule Enzyme) qui représentent une famille de sérine protéases. L'activation des granzymes est via un clivage protéolytique induit par la Cathepsine C. Par ailleurs, le pH acide des granules inhibe l'activité des Granzymes ainsi que celle de la Perforine. Chez l'homme et la souris, les deux types de Granzymes les plus abondants et les plus étudiés sont les Granzymes A avec une activité tryptase et B avec une spécificité de substrat très similaire à celle des caspases et clive après un résidu d'acide aspartique (Barry and Bleackley, 2002).

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., 1998; Law et al., 2010).

1.1.3.2 La voie des récepteurs à domaine de mort

Le deuxième mécanisme correspond à la voie des récepteurs à domaine de mort qui appartiennent à la superfamille du récepteur au TNF. Cette voie consiste en l'activation de récepteurs induisant un signal pro-apoptotique, dans la cellule cible, suite à leur engagement par leurs ligands exprimés par les CTL activées. Les principaux récepteurs identifiés sont le récepteur de type I au TNF (TNF-RI), le récepteur Fas (CD95) et les récepteurs à TRAIL, DR4 et DR5. Leur engagement dépend respectivement du TNF, FasL, et TRAIL.

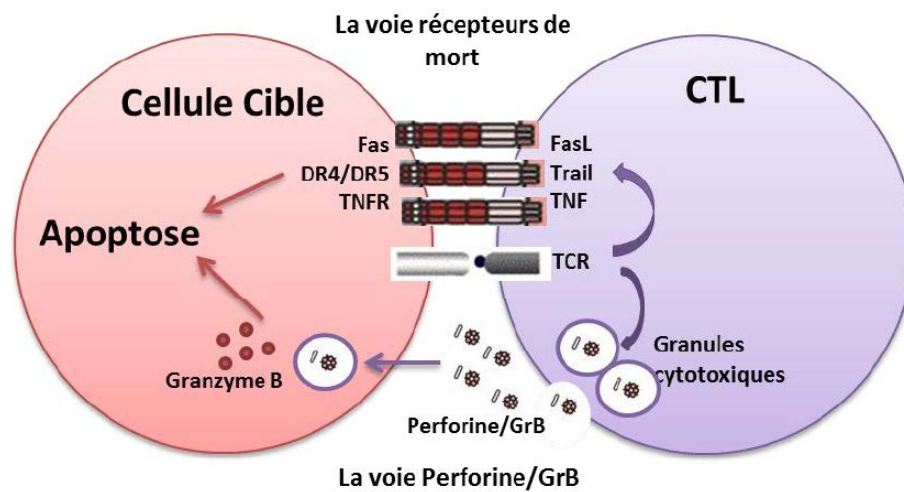


FIGURE 1.2 – Voies de cytotoxicité des CTL : La voie des récepteurs de mort (Fas, TNFR1, DR4, DR5) et l'exocytose du contenu de granules cytotoxiques (perforine, granzymes).

1.1.3.3 La voie TNF/TNF-R

Le facteur de nécrose tumorale (TNF, Tumor Necrosis Factor) est une cytokine dotée de propriétés pléiotropes, principalement produite par les macrophages et les lymphocytes T activés. Il a été initialement démontré que le TNF- α (TNF-alpha) était capable d'induire une nécrose hémorragique de tumeurs transplantées chez la souris, d'où son nom (Old et al., 1988). Le TNF- α est d'une part exprimé sous forme d'une protéine transmembranaire de type II assemblée en homotrimère (Tang et al., 1996) et d'autre part sous forme soluble résultant du clivage de la forme membranaire du TNF- α par une métalloprotéase appelée TACE (TNF Alpha Converting Enzyme) (Black et al., 1997). Chez l'Homme, deux récepteurs membranaires distincts pour le TNF ont été identifiés : le récepteur de type I (TNF-RI/p55/CD120a) et le récepteur de type II (TNF-RII/p75/CD120b) ; qui ont des domaines intracellulaires distincts (Tartaglia et al., 1993). D'autre part, TNF-RI est exprimé constitutivement et semble, dans la majorité des cas, initier la plupart des fonctions biologiques du TNF, notamment son activité cytotoxique. En revanche, l'expression de TNF-RII est inductible et aurait plutôt un rôle de régulation de la prolifération notamment au niveau

des cellules du système immunitaire.

Il a été montré que les récepteurs au TNF étaient exprimés à la surface cellulaire sous forme d'homotrimères pré-associés en l'absence de ligand (Chan et al., 2000). En effet, TNF-RI possède d'une part la capacité d'induire un signal apoptotique et d'autre part d'induire les voies JNK et NF κ B. Le signal apoptotique induit par TNF-RI va passer par le recrutement, via une protéine adaptatrice, TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain), de la protéine FADD puis de la procaspase-8. La voie de signalisation de TNF-RI semble ensuite suivre une cascade moléculaire très similaire à celle décrite précédemment pour Fas. D'autre part, la molécule TRADD va être capable de recruter la protéine adaptatrice TRAF2 et la kinase RIP (Hsu et al., 1996) qui vont permettre l'activation des voies NF κ B et JNK (Kelliher et al., 1998; Liu et al., 1996; Yeh et al., 1997). En résumé, il existe une compétition et une interdépendance très complexe au niveau des différentes voies induites par le TNF, qui sont sans doute le reflet de la pléiotropie exceptionnelle de cette cytokine.

1.1.3.4 La voie TRAIL/TRAIL-Rs

La molécule TRAIL (Apo2L/Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand) a été clonée en vertu de son homologie de séquence avec d'autres membres de la famille du TNF notamment FasL (Wiley et al., 1995). TRAIL est exprimé par de nombreux tissus et lignées cellulaires et a été impliquée dans l'activité anti tumorale de plusieurs populations lymphocytaires T et NK (Smyth et al., 2003). Apo2L est une protéine transmembranaire de type II et son domaine extracellulaire peut être clivé sous l'action de cystéine-protéases et générer une forme soluble (Mariani and Krammer, 1998) notamment au niveau des monocytes et des neutrophiles (Tecchio et al., 2004). Comme la plupart des autres membres de la famille du TNF, TRAIL forme des homotrimères qui se lient à des trimères de récepteurs.

D'autre part, la complexité du système de récepteur de la voie TRAIL est sans précédent dans la famille des récepteurs au TNF (Kimberley and Screaton, 2004; LeBlanc and Ashkenazi, 2003). En effet, cinq récepteurs à TRAIL ont été identifiés chez l'homme :

TRAIL-R1 (DR4/APO-2), TRAIL-R2 (DR5/KILLER), TRAIL-R3 (DcR1/TRID), TRAIL-R4 (DcR2/TRUNDD) et l'ostéoprotégérine (OPG). Les récepteurs DR4 et DR5 sont deux récepteurs capables d'induire l'apoptose de la cellule cible. Les trois autres récepteurs sont en revanche incapables d'induire un signal apoptotique et sont qualifiés de "récepteurs leurres" (Dc : Decoy Receptor). L'engagement des récepteurs pro-apoptotiques DR4 et DR5 par la molécule TRAIL va induire un signal de mort très similaire à celui observé pour la voie Fas. En effet, la protéine FADD va être recrutée au niveau du DISC de DR4 et DR5 par une interaction entre domaine de mort homologue et permettre le recrutement de la procaspase-8 (Bodmer et al., 2000; Sprick et al., 2000). Ce recrutement va alors permettre l'activation de la procaspase-8 par auto- et trans protéolyse, initiant le programme apoptotique et l'activation de la voie des caspases ou de la voie mitochondriale (LeBlanc and Ashkenazi, 2003).

1.1.3.5 La voie de Fas / FasL

La voie impliquant le récepteur Fas (APO-1 ou CD95) a été sans aucun doute la plus étudiée (Chaigne-Delalande et al., 2008) comme voie de cytotoxicité exercée par les CTL et NK. J'aborderai ce sujet plus en profondeur dans le chapitre suivant.

1.2 La voie de signalisation de Fas/ FasL dans le système immunitaire

1.2.1 Structure biologique de Fas et FasL

Le récepteur Fas est une glycoprotéine transmembranaire de type I de 317 acides aminés qui comporte trois domaines extracellulaires riches en cystéines (CRDs, cysteine-rich domains). CRD2 et CRD3, les deux CRD de Fas les plus proches de la membrane, sont nécessaires pour la fixation du ligand, FasL (Orlinick et al., 1997; Starling et al., 1997). Fas, est trimérique et cette forme préexiste à la surface cellulaire en absence de ligand (Chan et al., 2000). En effet, ces deux récepteurs possèdent dans leur région extracellulaire une séquence PLAD (preligand assembly domain) qui permet de trimériser, par des liaisons homophiliques, le récepteur au repos. Ce domaine PLAD est localisé au niveau du CRD1 (Siegel et al., 2000) et est essentiel pour la liaison de FasL ainsi que pour la transduction du signal apoptotique (Figure 1.3).

Le domaine extracellulaire de FasL comporte des sites de liaison à Fas, des sites de glycosylation et un site, conservé par tous les membres de la famille du TNF, permettant son homo-trimérisation (Figure 1.3). Le domaine intra-cytoplasmique régule négativement l'expression de FasL à la membrane plasmique et participe à l'activité cytotoxique de FasL. Ce domaine intra-cytoplasmique peut également induire des signaux de co-stimulation au TCR (Jodo et al., 2005; Orlinick et al., 1997; Sun et al., 2006a; Xiao et al., 2004). Par ailleurs, il a été reporté qu'un hexamère de FasL (c'est-à-dire deux trimères adjacents de FasL) est le complexe minimum requis pour induire efficacement un signal de mort (Holler et al., 2003).

La partie intracellulaire qui s'appelle « death domain » (DD) ou « domaine de mort », est caractéristique des récepteurs de la superfamille du TNFR. Le DD de Fas est une structure comprenant 6 hélices α amphipathiques et antiparallèles ne possédant aucune activité enzymatique propre. Lors de l'activation de Fas, le DD permet le recrutement, par

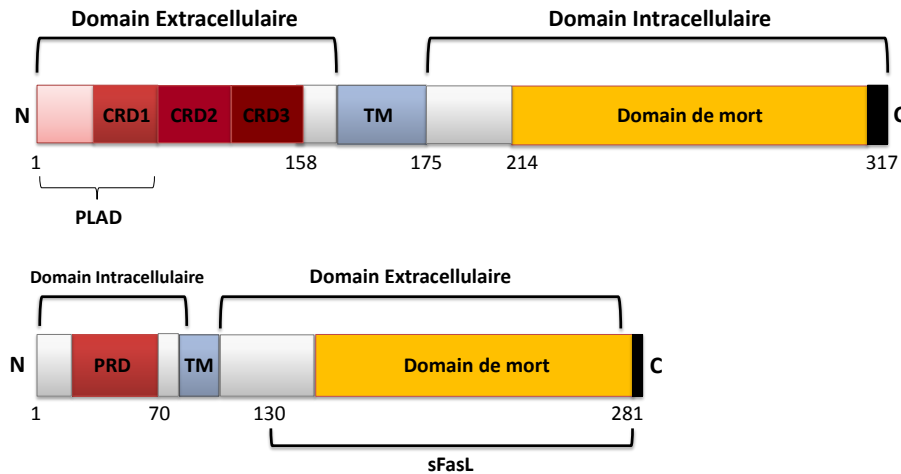


FIGURE 1.3 – Structures de Fas (en haut) et FasL (en bas). CRD : Domaine Riche en Cystéine, PRD : Domaine Riche en Proline, TM : Transmembranaire, THD : TNF Homology Domain.

liaison hémophilique, de la protéine adaptatrice FADD (Fas-associated protein with death domain) qui possède une structure homologue DD. L'engagement de FADD avec pro-caspase 8 enclenche la machinerie d'apoptose (Siegel et al., 2000). Le ligand de Fas, FasL (CD95L), est quant à lui une protéine transmembranaire de type II présente sous deux formes : une forme membranaire et une forme soluble résultant du clivage de la forme membranaire par des métalloprotéases (Kayagaki et al., 1995). L'induction de l'apoptose induite par FasL est attribuée principalement à la forme membranaire (Schneider et al., 1998). FasL est constitué d'un domaine transmembranaire et d'un domaine permettant son homotrimérisation, conservé par tous les membres de la famille du TNF (Orlinick et al., 1997).

1.2.2 Expression

Fas est exprimé de manière ubiquitaire, mais dans certaines conditions son expression peut être augmentée physiologiquement. Par exemple, l'expression de Fas à la surface des lymphocytes T est augmentée après leur activation. Fas est également surexprimé à la surface

de lymphocytes infectés par des virus tels que le virus de la leucémie T humaine (HTLV-1), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) ou le virus d'Epstein-Barr (EBV) (Debatin et al., 1994). L'IFN- γ ou des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-1 β peuvent aussi augmenter ou induire l'expression de Fas à la surface cellulaire (Liang, 2010). Par exemple, les progéniteurs hématopoïétiques immatures humains possédant le marqueur cellulaire CD34, expriment très faiblement Fas, mais cette expression augmente graduellement au cours de la différenciation.

FasL, contrairement à son récepteur, sa distribution tissulaire est très limitée. Il est exprimé de manière prédominante à la surface des cellules T activées et des cellules NK activées (Mabrouk et al., 2008; Krammer, 2000; Nagata, 1997). L'expression de novo de FasL est induite lors de l'activation des lymphocytes T de façon antigène spécifique ou non-spécifique. Donc, FasL est impliqué dans la régulation de la réponse immunitaire par un processus nommé AICD (Activated Induced Cell Death). AICD consiste à l'induction de la mort des cellules T activées pour donner la fin à leur réponse contre les pathogènes. Par exemple, les macrophages ou les cellules dendritiques infectés par le virus, sur-expriment FasL, ce qui pourrait être la cause de l'élimination des lymphocytes T CD4⁺ dans la maladie (Badley et al., 1996; Raftery et al., 2001).

En fin, FasL peut être exprimé sous la forme soluble suite au clivage de la forme membranaire par les métalloprotéases (MMPs). Dans différents systèmes cellulaires, les MMPs facilitent la libération des sFasL et diminuent ainsi la quantité de FasL membranaire disponible. FasL soluble peut toujours lier à son récepteur, Fas. Mais les études ont montré que FasL membranaire tue les cellules cibles Fas positives plus efficacement par rapport la forme soluble (Tanaka et al., 1998; Schneider et al., 1998). Une étude récente a utilisé deux lignées de souris, une avec la délétion ciblée de FasL membranaire et l'autre avec la délétion ciblée de la forme soluble de FasL. Les souris sFasL *KO* produisent de FasL membranaire qui ne peut pas être clivé par les métalloprotéases et les souris mFasL *KO* n'ont pas de la forme membranaire mais elles produisent la forme soluble. Leurs résultats indiquent que seulement

la forme membranaire est essentielle pour l'activité cytotoxique des cellules alors que sFasL a principalement des fonctions non-apoptotiques. Ainsi, un excès de sFasL (en l'absence de mFasL) favorise l'auto-immunité et la tumorigenèse (O'Reilly et al., 2009).

On retrouve également FasL de façon constitutive au niveau de sites dits « immuno-privilégiés », tels que les yeux et les testicules (Stuart et al., 1997), le cerveau et le placenta, où la réponse inflammatoire doit être physiologiquement très étroitement contrôlée. De plus, FasL a été détecté à la surface de cellules tumorales. Dans ce contexte, il participerait à l'échappement de la tumeur au système immunitaire en induisant l'apoptose des lymphocytes T cytotoxiques via Fas. Il n'existe cependant pas d'études claires démontrant l'importance de ce modèle de « contre-attaque Fas » in vivo (Restifo, 2000; Igney and Krammer, 2002).

1.2.3 La voie de signalisation d'apoptose par Fas/FasL

Le processus d'apoptose aboutit à l'activation des caspases, une famille de protéases à cystéine aspartate-spécifique, qui clivent les protéines essentielles cellulaires. L'activation des caspases peut être atteinte par deux voies de signalisation apoptotiques distinctes mais convergentes, la voie extrinsèque et la voie intrinsèque.

L'induction de l'apoptose par la voie Fas/FasL s'effectue en plusieurs étapes successives qui ont été étudiées par plusieurs équipes comme l'équipe du Dr. Marcus E. Peter (Algeciras-Schimnich et al., 2002). Dans un premier temps, la stimulation de FasL conduit à la formation rapide de micro agrégats du récepteur. Dans un second temps, la protéine adaptatrice FADD (Fas-Associated Death Domain) est recrutée via une interaction homotypique entre le domaine de mort de Fas et un domaine de mort homologue situé au niveau de la partie C-terminale de FADD (Chinnaiyan et al., 1995). De plus, FADD contient dans sa partie N-terminale un second domaine appelé « domaine effecteur de mort » (DED : Death Effector Domain) d'environ 80 acides aminés. Le DED de FADD, en interagissant avec les deux DED présents dans le prodomaine des procaspases initiateuses -8 ou -10, permet le recrutement de ces procaspases initiateuses (Boldin et al., 1996; Kischkel et al., 2001; Tibbetts et al., 2003).

Le complexe multi protéique ainsi formé est appelé « complexe de signalisation induisant la mort » ou DISC (Death Inducing Signaling Complex), qui, comme son nom l'indique, initie le signal de mort (Figure 1.4).

La formation du DISC est un processus actif impliquant une réorganisation des microfilaments d'actine (Algeciras-Schimnich et al., 2002). L'étape suivante, plus tardive, consiste en la formation d'agrégats plus importants (le « clustering » de Fas). L'interaction de Fas avec son ligand n'est pas suffisante pour induire son « clustering ». Ce phénomène est un processus actif qui dépend des caspases initiateuses pré-activées par le DISC, en particulier la caspase-8 (Algeciras-Schimnich et al., 2002). Ce rapprochement et la forte concentration locale en procaspase-8 (p55/p53) au niveau du DISC permettent son activation par clivage auto- et trans-protéolytique. En fonction de l'étendue de la formation du DISC, deux principaux types de signalisation de Fas ont été décrits permettant de distinguer les cellules dites de « type I » comme les thymocytes, des cellules dites de « type II » comme les hépatocytes (Barnhart et al., 2003; Scaffidi et al., 1998; Hao and Mak, 2010).

Dans les cellules de « type I », l'engagement de Fas conduit à la formation efficace du DISC qui induit l'activation en importante quantité de la caspase 8 qui va permettre l'activation directe des pro-caspases effectrices, notamment de la procaspase-3 qui va elle-même induire l'apoptose de la cellule cible en clivant ses différents substrats de mort. En revanche, dans les cellules de « type II », la formation du DISC est faible et conduit à une faible quantité de caspase-8 activée qui ne permet pas une activation directe de la procaspase-3 et nécessite une boucle d'amplification passant par la mitochondrie. Cette activation de la voie mitochondriale est initiée par le clivage de Bid en tBid par la caspase-8 qui va alors migrer au niveau de la membrane mitochondriale externe, et en coopération avec Bax et Bak, induire la libération des différents facteurs apoptogéniques de la mitochondrie. Ainsi, les cellules de type II, contrairement aux cellules de « type I », sont sensibles à la surexpression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 tels que Bcl-2 lui-même et Bcl-XL (Scaffidi et al., 1999). Le cytochrome c libéré de la mitochondrie forme l'apoptosome en coopération avec Apaf-1

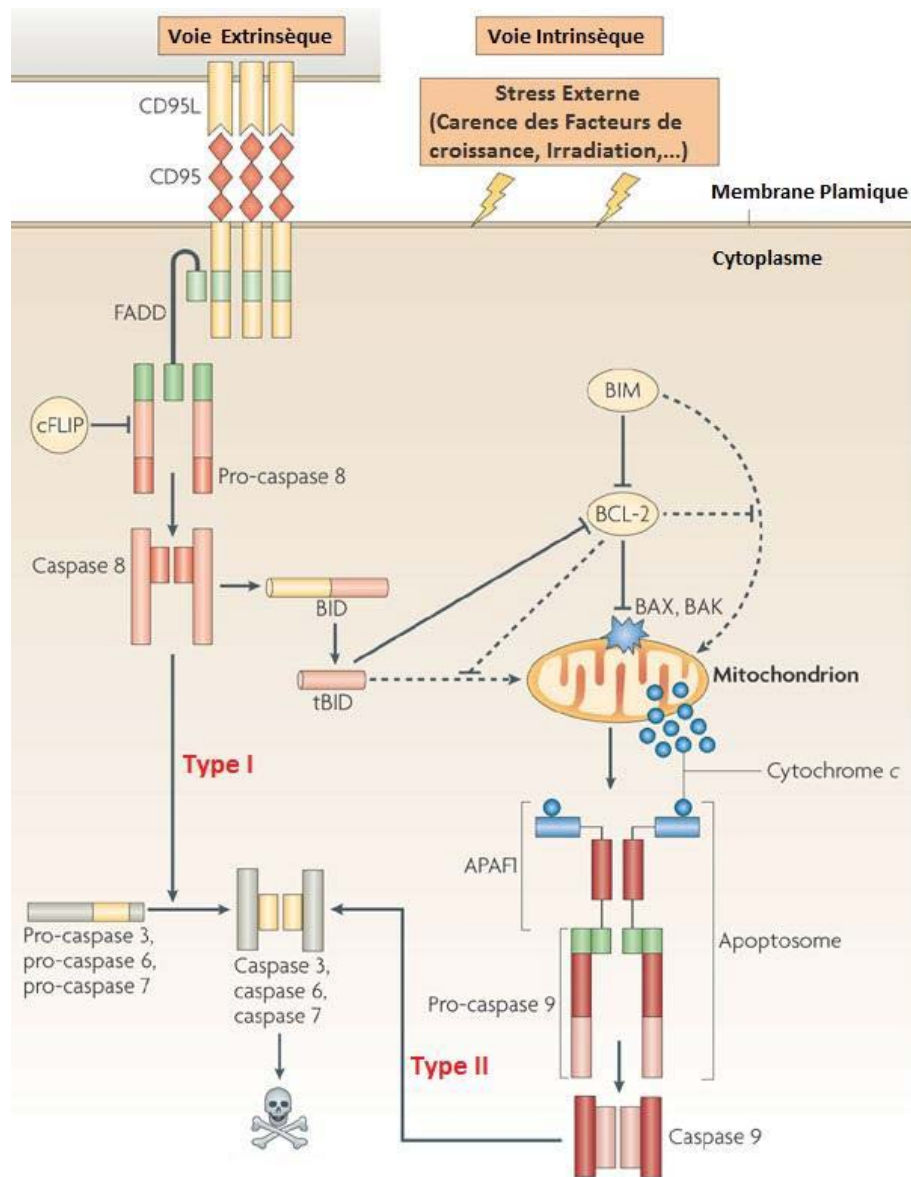


FIGURE 1.4 – Les voies extrinsèques et intrinsèques conduisent à l'apoptose. D'après Bouillet and O'Reilly (2009).

et du dATP pour induire l'activation de la procaspase-9 qui, par la suite, active la caspase-3. Les autres facteurs libérés par la mitochondrie notamment Smac/Diablo et HtrA2/Omi participent aussi indirectement à l'activation de la caspase-3 en inhibant les IAPs, inhibiteurs de l'activité des caspases effectrices (Wei et al., 2008). Enfin, les facteurs AIF et EndoG sont aussi libérées et participent à l'apoptose de la cellule cible.

D'autre part, le DISC de Fas permet aussi le recrutement d'autres protéines, notamment la protéine FLIP (FLICE or Caspase 8 Inhibitory Protein) qui inhibe l'activation de la procaspase-8 (Shu et al., 1997). Yeh et al. (2000) ont générés des souris c-FLIP déficientes et ils ont montré un double rôle de cette molécule. Premièrement, ils ont montré que les embryons c-FLIP^{-/-}, avec un phénotype très similaire des souris CASP8^{-/-} et FADD^{-/-}, ne peuvent pas survivre au delà de 10ème jour d'embryogénèse. Donc, C-FLIP coopère avec FADD et caspase-8 au cours du développement embryonique. Pourtant, les fibroblastes embryonnaires de ces souris c-FLIP^{-/-}, au contraire des souris CASP8^{-/-} et FADD^{-/-}, sont très sensibles à la voie d'apoptose induite par Fas/FasL, ce qui suggère un rôle cytoprotection de C-FLIP contre l'apoptose induite par la voie Fas/FasL.

1.2.4 Rôles physiologique de la signalisation de la voie Fas et FasL

1.2.4.1 Rôle de Fas/FasL dans la tolérance périphérique et l'homéostasie des cellules immunes.

L'importance de la voie de signalisation Fas/FasL dans le contrôle de système immunitaire a été mise en valeur après avoir découvert que les allèles *lpr* et *gld* codent pour les gènes Fas et FasL respectivement. En effet, Les mutations murines, *lpr* (lymphoprolifération) et *gld* (syndrome lymphoprolifératif généralisée), sont des mutations récessives naturelles (Cohen and Eisenberg, 1991). Les souris qui portent ces allèles *lpr* et *gld*, à l'état homozygote, (*Fas*^{*lpr/lpr*} et *FasL*^{*gld/gld*}) (Watanabe-Fukunaga et al., 1992; Takahashi et al., 1994) développent une lymphadénopathie et une splénomégalie en accumulant une population inhabituelle des cellules

T (Thy-1⁺CD4⁻CD8⁻CD3⁺B220⁺), avec des manifestations auto-immunes (Rieux-Laucat et al., 1995; Fisher et al., 1995).

Chez l'homme, un défaut dans la voie de signalisation Fas/ FasL conduit au syndrome ALPS (Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome), caractérisé par une lymphoprolifération et une accumulation des cellules Thy-1⁺CD4⁻CD8⁻CD3⁺B220⁺. 70% des patients atteints d'ALPS ont une mutation germinale sur le gène Fas à l'état hétérozygote. D'autres mutations comme des mutations germinales sur CASP10 ou FASL peuvent conduire également à ALPS (Madkaikar et al., 2011).

L'identification des gènes Fas et FasL a conduit à la génération des souris Knock Out. Adachi et al. (1993) ont généré les souris *Fas KO* qui sont caractérisées par le développement d'une lymphadénopathie et une splénomégalie beaucoup plus prononcée par rapport les souris porteuses de la mutation « Leaky- lpr ». De plus, Wu et al. (1993) ont montré lorsque Fas est exprimé par les lymphocytes de souris lpr, en tant qu'un transgène, le phénotype lymphoprolifératif disparaît (Wu et al., 1993), confirmant que Fas joue un rôle dans la mort cellulaire programmée des lymphocytes T. Par la suite, les souris *Fasl KO* ont été générées. Le phénotype de ces souris est similaire avec celui des souris *Fas KO*, ce qui confirme que contrairement aux autres membres de la famille TNF, FasL est la ligand exclusif de Fas. Ces souris développent une splénomégalie et une lymphadénopathie associées à une production d'auto-anticorps et l'infiltration fréquente des lymphocytes dans la foie, les glandes salivaires et le rein. Ce phénotype conduit à la mort prématurée de ces souris. De plus, les auteurs ont montré que l'allèle gld a conservé une faible activité pour le récepteur Fas, suggérant que l'allèle gld est également "leaky" (Karray et al., 2004).

Par la suite, pour mieux caractériser les bases cellulaire de ce phénotype, les gènes *Fas* et *Fasl* sont invalidés de façon conditionnelle (système Cre-LoxP) sur les cellules T et B. Hao et al. (2004) ont développé des souris Fas déficientes dans les cellules T et B. Ils ont montré que la Perte de Fas sur les cellules B, T ainsi que les cellules présentatrices d'antigène, a

entraîné une lymphadénopathie, une hyper gamma globulinémie et la production d'auto-anticorps (Hao et al., 2004, 2008). Toutes ces anomalies développées chez ces animaux, sont dans une mesure, considérablement plus modérées par rapport aux animaux ayant le gène *Fas* invalidé dans tous les tissus.

De façon très intéressante, Stranges et al. (2007) ont montré que la perte de Fas sur les cellules dendritiques suscite aussi certaines caractéristiques de l'auto immunité tels que l'hyperplasie lymphoïde et la production d'auto-anticorps.

Mabrouk et al. (2008) ont généré les souris ayant le gène *Fasl* spécifiquement invalidé dans les cellules T et B et les cellules myéloïdes. Ils ont montré que l'homéostasie des cellules T, B et les cellules présentatrice d'antigènes, DC, est dépendante de la voie Fas/FasL. En effet, invalidation de *Fasl* dans les cellules T, *T-Fasl*^{-/-}, conduit à une accumulation des cellules B et DC, ce qui souligne l'importance de l'expression de FasL par les cellules T pour éliminer les cellules CPA auto réactives afin de prévenir les maladies auto-immunes (Mabrouk et al., 2008). Par ailleurs, ils ont montré que la délétion de *Fasl* sur les cellules myéloïdes ne conduit pas à des manifestations auto-immunes.

1.2.4.2 Rôle de voie Fas/FasL dans la cytotoxicité par les cellules T et NK.

Les lymphocytes cytotoxiques, CD8⁺ et aussi une partie des lymphocytes CD4⁺ expriment FasL à leur surface. La voie Fas/FasL, en parallèle de la voie intrinsèque, est responsable de l'activité cytotoxique par les cellules T et les NK. Bien que FasL normalement est impliqué dans l'élimination des cellules infectées par virus ou les cellules en excès, une augmentation anormale de FasL peut conduire aux certaines problème immunopathologiques. Par exemple, il a été montré que la maladie GvH (Graft-versus-Host) peut être empêchée par un traitement avec l'anticorps neutralisant de FasL et TNF- α (Hattori et al., 1998). Par ailleurs, FasL a un rôle indispensable pour induire l'apoptose dans les progéniteurs hématopoïétiques au cours de l'infection CMV (cytomégalovirus) (Mori et al., 1997).

1.2.4.3 Les rôles non-apoptotiques de la voie Fas/FasL.

En plus de rôle majeur de voie Fas/FasL dans l'apoptose, leurs fonctions non-apoptotiques ne sont pas négligeables. Par exemple, Il a été montré que la délétion de Fas sur les cellules T provoque aussi une lymphopénie chez les souris (Hao et al., 2004), ce qui souligne le rôle de Fas dans la survie et la prolifération des cellules T.

L'activité non-apoptotique de la voie Fas/FasL se passe par certains composants de DISC, comme FADD, Caspase-8 et c-FLIP. Ce fut d'abord découvert quand l'équipe de Winoto a montré que chez les souris déficientes en FADD, non seulement la voie d'apoptose via FasL est bloquée, mais aussi l'activation et la prolifération des cellules T sont perturbées (Zhang et al., 1998). Les études sur les souris portant les délétions ciblées de Caspase-8, ont montré que Caspase-8 est aussi essentiel pour les activités non-apoptotiques observées (Kang et al., 2004).

Le rôle pro-inflammatoire de FasL est moins connu et semble lié à un pouvoir chimio-attractant de FasL, impliquées dans la réponse inflammatoire comme les polynucléaires neutrophiles (Seino et al., 1998). Pourtant le/les mécanismes moléculaires qui induit l'inflammation par FasL reste inconnu. Letellier et al. ont montré que la voie Fas/FasL est impliquée dans le recrutement des cellules myéloïdes vers le site d'inflammation via la voie de signalisation kinase SyK . En effet, Ils ont montré que lors d'une lésion dans le système nerveux central, l'expression de FasL sur les cellules myéloïdes est augmentée. Cette augmentation conduit à une activation de la voie PI3K-AKT et une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoire, ce qui entraîne une meilleure récupération après blessure (Letellier et al., 2010).

La voie Fas/FasL a des activités non-apoptotiques, non seulement sur les cellules du système immunitaire, mais sur d'autres types cellulaire. Fas est très fortement exprimé constitutivement dans les cellules du foie (hépatocytes). En effet l'anticorps anti-CD95 (Jo2) provoque une apoptose massive des cellules du foie, donc Fas est important pour induire l'apoptose

des hépatocytes. Cependant, Fas est impliqué dans la régénération de foie après l'hépatectomie partielle (Desbarats and Newell, 2000). En effet, l'injection de l'anticorps Jo2 aux souris partiellement hépatectomisés accélère effectivement la régénération du foie. En plus, la caspase-8 (Ben Moshe et al., 2007) et FADD (Schuchmann et al., 2005) sont également nécessaires pour la régénération du foie. Les dommages au foie sont associés à l'activation des voies de signalisation anti-apoptotiques (Akt, STAT3 et NF κ B) qui protègent contre la mort cellulaire induite par Fas et peuvent donc aider à changer des signaux Fas à commutation principalement de pro-apoptotique à non apoptotique. Il existe différentes explications pour cette commutation entre la signalisation pro-apoptotique ou non-apoptotique de la voie Fas/FasL, par exemple le rôle de c-FLIP ou les modifications post-traductionnelles de Fas. En conclusion, il est important de bien connaître les composants qui relient cette voie aux voies non-apoptotiques, parce que ceux-ci peuvent fournir de nouvelles cibles pour traiter des maladies tels que le cancer ou les maladies inflammatoires, pour lesquels l'activité non-apoptotique de Fas/FasL semble être essentielle.

1.2.4.4 Fas/FasL et la tumeur.

L'expression de FasL a été observée dans différents types tumoraux, comme des carcinomes colorectaux (O'Connell et al., 1996), hépatocellulaires (Strand et al., 1996), ou des mélanomes (Hahne et al., 1996). Le rôle de cette expression est controversé. Certaines études ont montré que cette expression pourrait induire le recrutement des polynucléaire et une réponse anti tumorale (Maher et al., 2002). D'autres études montrent que FasL, par différents mécanismes, aide les cellules tumorales à échapper de système immunitaire. Ces stratégies permettent la délétion des lymphocytes T spécifiques de la tumeur, conduisant à un état dit de "tolérance périphérique". Le premier de ces mécanismes, et le plus fréquemment décrit, repose sur l'expression par les cellules tumorales de FasL et est plus connu sous le nom de "modèle de contre-attaque". Selon ce modèle, de nombreuses tumeurs exprimeraient FasL

dont des lymphomes, des mélanomes, des carcinomes hépatocellulaires, gastriques ou pulmonaires, et seraient capables d'induire l'apoptose des lymphocytes infiltrant la tumeur, via le récepteur Fas qu'ils expriment suite à leur activation (Igney and Krammer, 2005). De plus, il a été reporté que des cellules de mélanomes sécrétaient des microvésicules exprimant FasL et capables d'induire l'apoptose de cellules Jurkat (Andreola et al., 2002). Néanmoins, ce modèle de contre-attaque est sujet à une très importante controverse suite à de nombreux travaux contradictoires faisant douter de la relevance in vivo de ce modèle (Igney and Krammer, 2005). De plus, de nombreuses études réalisées avec des anticorps anti-FasL non spécifiques sont à interpréter avec beaucoup de précautions.

Le second mécanisme pouvant induire la délétion des lymphocytes T anti tumoraux par la tumeur, repose sur le phénomène de mort cellulaire induite par l'activation ou AICD. En effet, suite à leur activation, les cellules expriment fortement FasL pouvant ainsi induire leur propre mort (Suicide) ou la mort des cellules T environnantes (Fratricide) (Khong and Restifo, 2002; Molldrem et al., 2003; Prado-Garcia et al., 2012). Il semble donc que la stimulation chronique des lymphocytes T anti tumoraux par les cellules tumorales, sur-exprimant de surcroît les TAA, puisse aboutir à la délétion de ces effecteurs par AICD. Un exemple clair de ce phénomène a été montré, chez des patients atteints de leucémie myéloïde chronique, une délétion sélective de CTL de haute avidité spécifiques d'antigène tumoral induite par la tumeur par le phénomène d'AICD (Molldrem et al., 2003). Dans le chapitre suivant, je vais détailler le concept d'échappement et les différents mécanismes responsables dans ce phénomène.

1.3 Echappement des cancers aux réponses immunitaires

1.3.1 Théorie de l'« immunoediting »

La théorie de l'immunoediting des cancers, a été émise par Schreiber et ses collaborateurs dans le but d'expliquer le dynamisme qui existe entre le système immunitaire et le système tumoral, en soulignant le fait que le phénotype immunogène d'une tumeur est constamment façonné par les contraintes immunologiques environnantes, même après l'émergence de variantes résistants (Dunn et al., 2002; Khong and Restifo, 2002). En effet, le système immunitaire, à ses dépens, façonne la tumeur génétiquement instable et notamment les métastases. Cette hypothèse suggère trois phases distinctes dans l'évolution d'une tumeur : une phase d'élimination, une phase d'équilibre et une phase d'échappement (Figure 1.5).

1.3.1.1 La phase d'élimination

Théoriquement, la phase d'élimination correspond au concept d'immuno surveillance anti tumorale proprement dit, selon lequel les cellules néoplasiques nouvellement formées ou encore les cellules cancéreuses qui ont réussi à se disséminer dans d'autres sites, sont systématiquement détruites par le système immunitaire. Celui-ci agit ainsi comme un supprimeur de tumeur extrinsèque protégeant les hôtes immunocompétents du développement de néoplasie et de la formation de métastases.

1.3.1.2 La phase d'équilibre

La seconde phase, qui peut être relativement longue, correspond à un équilibre dynamique entre les effecteurs immuns et les variantes tumorales ayant survécu à la phase d'élimination. En effet, les cellules effectrices exercent une pression de sélection suffisante pour contenir la croissance d'une tumeur cliniquement indétectable, mais néanmoins insuffisante pour l'éradication totale de cellules tumorales génétiquement instables. Pendant cette phase, la tumeur est ainsi maintenue dans un état d'équilibre entre l'élimination et l'échappement. C'est aussi

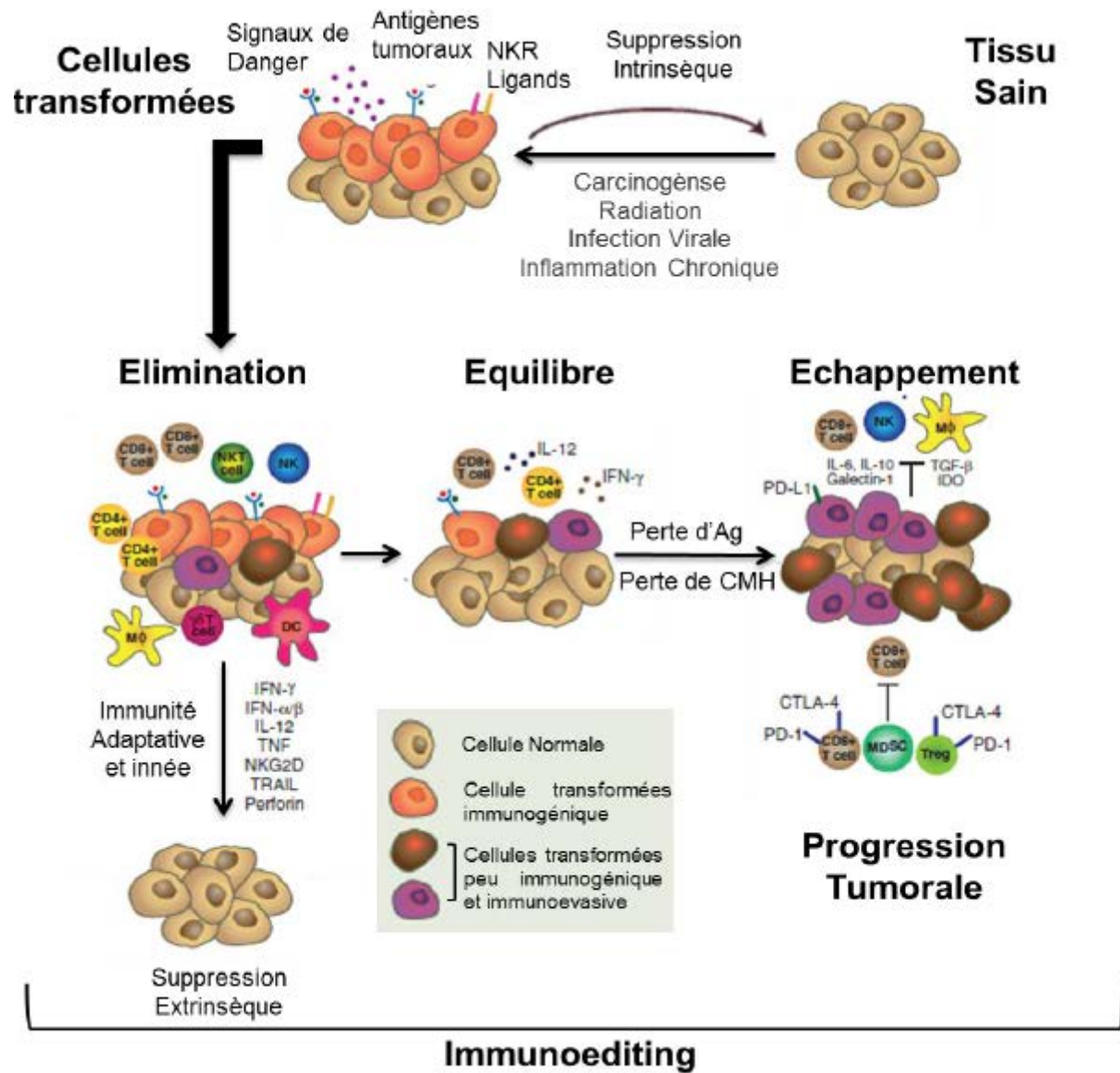


FIGURE 1.5 – Trois phases d'immunoediting du cancer. D'après Vesely et al. (2011).

au cours de cette phase que les contraintes exercées par le système immunitaire sculptent constamment le phénotype immunogène d'une tumeur. La preuve expérimentale de la phase d'équilibre a été rapportée par l'équipe de Robert Schreiber qui a injecté aux souris du méthylcholanthrène (MCA), un puissant carcinogène conduisant au développement de sarcomes dans 20% des animaux (Koebel et al., 2007). Pour les animaux restants ne présentant pas de tumeur décelable, la déplétion des lymphocytes T $CD4^+$ ou $CD8^+$ ou encore l'administration d'anticorps bloquant l'IFN- γ ou l'IL-12, cytokines impliquées entre autre dans l'immunité adaptative, induit le développement de tumeurs. En revanche, la déplétion en cellules NK ne montre aucun effet (Koebel et al., 2007). Ces résultats suggèrent que les cellules cancéreuses sont bien présentes, leur développement étant bloqué par le système immunitaire et plus particulièrement par l'immunité adaptative. Ces résultats ont été confirmés dans des souris ayant un déficit de l'immunité adaptative (invalidées pour Rag-1 ou -2) qui développent pour une majorité d'entre elles des sarcomes. Ces résultats mettent l'accent sur le rôle des cellules T et de l'IFN- γ dans cette phase d'équilibre dans ce modèle de sarcome induit par le carcinogène MCA (Aguirre-Ghiso, 2007).

Dans cette phase, une étude a été identifiée la présence de micro-masses tumorales de quelques millimètres aux sites d'injection du carcinogène chez les souris immunocompétentes dans un état d'équilibre puisque leur volume reste stable pendant des mois. Dans un modèle des souris transgéniques pour l'expression d'oncogène RET humain et d'un antigène chimère homme/souris de CMH (AAD), Eyles et al. (2010) ont montré que la déplétion des lymphocytes T $CD8^+$ accélère considérablement le prolongement de lésions métastatiques à des organes viscéraux, ce qui indique que le système immunitaire était une barrière importante contre la diffusion des cellules tumorales pour établir des métastases. De façon intéressante, il semble que ces cellules T $CD8^+$ n'éliminent pas les cellules tumorales par cytotoxicité, mais, en produisant d'IFN- γ inhibent leur prolifération et leur dissémination (Eyles et al., 2010).

1.3.1.3 La phase d'échappement

La troisième phase est dite d'échappement. Au cours de cette phase, les variantes tumorales résistantes sélectionnées durant la phase d'équilibre vont pouvoir croître dans un environnement immunologiquement intact. Cette brèche dans le système immunitaire se produit sans doute lorsque les changements génétiques et épigénétiques ont conféré à ces variantes tumorales une certaine résistance, suffisante, pour échapper à la détection et à l'élimination. Une conséquence importante de ce concept d'immunoediting est l'immunorésistance intrinsèque de la plupart des tumeurs se développant chez un individu immunocompétent en particulier des métastases. Les seules tumeurs parvenant à se développer et devenant détectables cliniquement ne peuvent être que celles ayant acquis des caractéristiques leur permettant d'échapper à l'immuno surveillance. Ces mécanismes d'échappement seront abordés dans la section suivante. Enfin, les deux premières phases de ce processus conduisant à un « immunoediting » du cancer représentent des objectifs potentiels pour l'immunothérapie : l'élimination de la tumeur ou le maintien d'un état d'équilibre.

1.3.2 Les mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire

Il est maintenant bien établi depuis les travaux de Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2000) que six caractéristiques intrinsèques aux cellules déterminent l'apparition de tumeurs. Les cellules cancéreuses assurent ainsi leur propre production de facteurs de croissance, ignorent les signaux inhibiteurs, échappent à la mort cellulaire avec un potentiel réplicatif illimité, favorisent la néo angiogenèse et enfin envahissent les tissus avoisinants. Schreiber et ses collègues ont mis en avant une septième fonction essentielle à la croissance tumorale : l'échappement à l'immunosurveillance. Cette dernière caractéristique peut ainsi conceptuellement se définir à l'interface entre les caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales et le microenvironnement tumoral (Dunn et al., 2004; Smyth et al., 2006). Comme montré dans

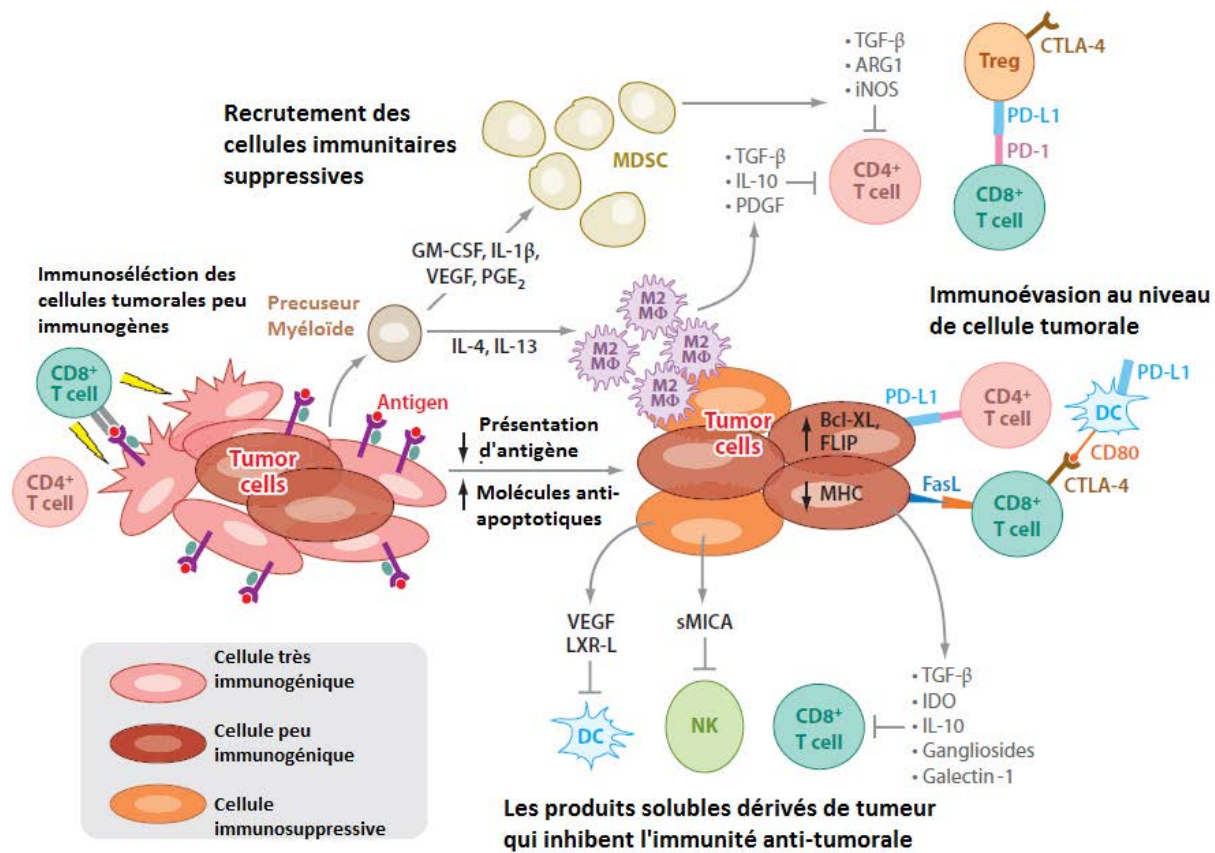


FIGURE 1.6 – Les mécanismes de l'échappement de tumeur. D'après Vesely et al. (2011).

le Figure 1.6, de nombreux travaux ont mis en évidence les différentes stratégies permettant à la tumeur d'échapper ou d'interférer avec la réponse immunitaire anti-tumorale en particulier au niveau des métastases. Les mécanismes d'échappement peuvent être classés en plusieurs catégories, selon qu'ils soient intrinsèques, comme une diminution de la présentation d'antigène par MHC, sur expression des molécules anti-apoptotiques (c-FLIP et BCL-XL), ou extrinsèques, comme expression des molécules inhibiteurs à leur surface comme PD-L1 et FasL qui, respectivement, inhibe et tue les cellules T effectrices. En plus, les cellules tumorales peuvent sécréter les facteurs immunosuppresseur (TGF- β , IL-10, IDO) (Vesely et al., 2011).

1.3.2.1 Echappement à la reconnaissance : Altération de la présentation antigénique

La présentation antigénique par les molécules HLA est cruciale à la fois durant l'activation de la réponse T et durant la phase effectrice de la réponse immune adaptative. Des altérations de l'apprêtement et de la présentation du peptide antigénique ont été fréquemment rapportées dans de nombreuses tumeurs. En effet, la présentation antigénique au niveau des cellules tumorales peut être altérée partiellement ou totalement en conséquence de mutations et/ou délétions d'un ou plusieurs gènes codant pour la machinerie d'apprêtement du peptide. La perte complète des molécules HLA est ainsi un phénomène courant dans de nombreuses tumeurs murines et humaines (Kamphausen et al., 2010; Seliger et al., 2002). La perte totale de molécules de classe I du CMH est associée avec des mutations ou la délétion de l'expression de la $\beta 2m$ entraînant un défaut d'assemblage de ces molécules (Restifo et al. 1996). Des pertes sélectives d'un haplotype, d'un locus ou d'un allèle HLA donné ont également été décrites (Khong and Restifo, 2002).

D'autres mécanismes d'échappement à la reconnaissance ont été décrits, et correspondent à la perte d'expression des molécules TAP-1 et TAP-2 impliquées dans le transport du peptide du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique. Cette perte des molécules TAP empêche ainsi le chargement des peptides antigéniques sur les molécules de classe I du CMH, entraînant une absence totale de l'expression de ces dernières (Lankat-Buttgereit and Tampé, 2002). De même, il a été suggéré que la perte d'expression des sous-unités LMP-2 et LMP-7 du protéasome altère la présentation antigénique au niveau de certaines tumeurs (Shen et al., 2007), ainsi que ERAP1 (Kamphausen et al., 2010).

Enfin, la perte d'expression d'antigènes tumoraux a été décrite comme un mécanisme majeur d'échappement tumoral à la réponse immunitaire T. Ce phénomène a été particulièrement bien démontré à partir d'une étude de métastases récurrentes chez des patients atteints de mélanome et traités par un transfert adoptif de cellules T spécifiques de MART-1. Chez trois des cinq patients inclus dans cette étude, les cellules des métastases récurrentes

ont perdu l'expression de MART-1, alors que l'expression d'autres antigènes comme gp100 ou la tyrosinase est restée normale (Yee et al., 2002).

1.3.2.2 Echappement à la lyse : Résistance à l'apoptose.

La susceptibilité de la cellule tumorale à la lyse par les effecteurs cytotoxiques constitue inéluctablement un élément déterminant qui conditionne l'efficacité de la réponse anti tumorale. Plusieurs mécanismes de résistance aux fonctions cytotoxiques des CTL et des cellules NK, impliquant la voie Perforine/Granzymes et la voie des récepteurs à domaine de mort, ont ainsi été décrits (Gati et al., 2001).

1.3.2.2.a Résistance à l'apoptose initiée par les récepteurs à domaine de mort.

Cette voie utilise les récepteurs à domaine de mort dont l'interaction avec leurs ligands respectifs s'accompagne d'un recrutement de protéines adaptatrices et, selon le type cellulaire, de l'activation de la voie des caspases ou de la voie intrinsèque induite par la mitochondrie. La résistance à cette voie des récepteurs à domaine de mort est ainsi très complexe et multiparamétrique, impliquant ainsi de nombreux déterminants membranaires, cytoplasmiques et nucléaires. Globalement la voie des récepteurs à domaine de mort utilise une signalisation similaire. La voie impliquant le récepteur Fas a été sans aucun doute la plus étudiée et une résistance à l'apoptose induite par cette voie a été mise en évidence dans un grand nombre de modèles tumoraux. Différents mécanismes ont été décrits permettant d'expliquer cette résistance.

- (i) Défaut d'expression et/ou de liaison au ligand : En premier lieu, on peut distinguer une résistance due à un défaut d'expression du récepteur lui-même, ou à un défaut de liaison de son ligand. En effet, l'expression des récepteurs à domaine de mort varie en fonction du type cellulaire, et il a été montré que cette expression était fréquemment diminuée ou même totalement absente dans de nombreux types de tumeurs. Ainsi, des mutations du gène CD95 ont été identifiées dans une grande variété de tumeurs de

type hématologique ou solide (Maeda et al., 1999; Wohlfart et al., 2004; Landowski et al., 1997). Des défauts d'expression de Fas peuvent aussi impliquer des modifications épigénétiques comme l'hyper méthylation d'îlots CpG au niveau de leurs promoteurs respectifs comme il a été décrit dans des neuroblastes ou des carcinomes du colon (Maecker et al., 2002). De plus, il a été démontré que certains oncogènes pouvaient réprimer l'expression de Fas. En effet, Ras ou c-jun en coopération avec STAT3 sont capables d'inhiber l'expression de Fas (Ivanov et al., 2003; Peli et al., 1999).

De plus, des niveaux élevés de récepteurs FasL solubles, qui peut diminuer la voie d'apoptose Fas/FasL, ont été retrouvés dans les sérums de patients atteints de lymphomes T ou de tumeurs non hématopoïétiques (Hohlbaum et al., 2000; Midis et al., 1996; Ugurel et al., 2001; Andrikoula et al., 2009). Le récepteur à TRAIL DcR1 a été lui aussi retrouvé amplifié dans des carcinomes gastriques (Sheikh et al., 1999).

- (ii) Défaut de transduction de signal : En second lieu, on peut distinguer une résistance à la voie des récepteurs à domaine de mort dépendante d'une altération de la cascade de transduction du signal conduisant à l'apoptose proprement dite. Là encore, de nombreux mécanismes semblent être impliqués en fonction des différentes étapes de cette cascade. Des mutations inactivant la protéine adaptatrice FADD ont ainsi été observées dans des cancers bronchiques, et le gène codant la pro-caspase 8 est fréquemment inactivé par délétion ou hyper méthylation de ses séquences régulatrices (Fulda et al., 2001; Hopkins-Donaldson et al., 2003; Teitz et al., 2000). Un autre mécanisme est l'inhibition de l'activation de la procaspase-8 au sein du DISC par la protéine c-FLIP. L'expression de c-FLIP a été ainsi retrouvée dans de nombreuses cellules tumorales et corrèle avec leur résistance à Fas et à TRAIL ainsi qu'avec un échappement à la réponse immune (Medema et al., 2001). PEA-15 est une autre protéine contenant un domaine de mort qui bloque l'apoptose induite par FasL, TRAIL et TNF- α en empêchant l'interaction entre FADD et la procaspase-8 (Hao et al., 2001). PEA-15 a été impliquée dans la résistance de gliomes à TRAIL (Xiao et al., 2002).

(iii) La famille BCL-2 : D'autres mécanismes potentiels d'échappement à la réponse immunitaire existent. Le rapport entre membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 influence aussi la sensibilité des cellules tumorales à la voie des récepteurs à domaine de mort, du moins pour les cellules de type II. La sur-expression de Bcl-2 et Bcl-XL, qui sont anti-apoptotiques, est ainsi fréquemment retrouvée dans les tumeurs (Igney and Krammer, 2002). De la même manière, certains membres de la famille des IAPs comme cIAP1, cIAP2, XIAP et la Survivine sont sur-exprimés dans certains cancers et inhibent l'apoptose induite par les récepteurs à domaine de mort en inhibant l'activation des procaspases effectrices -3 et -7 et en bloquant l'activation de la procaspase-9 (Fulda et al., 2004).

1.3.2.2.b Résistance à la mort induite par perforine/granzyme. Plusieurs mécanismes de résistance à la lyse induite par la voie Perforine/Granzymes ont été décrits dans différents modèles tumoraux. Il s'agit de mécanismes qui sont capables d'interférer d'une part avec la polarisation ou l'exocytose des granules cytotoxiques, et d'autre part avec la signalisation pro-apoptotique de cette voie de cytotoxicité. Par exemple, des travaux dans un modèle de tumeurs murines transplantables ont mis en évidence l'altération des capacités lytiques des lymphocytes T (TIL) fraîchement isolés à partir de ces tumeurs due à une absence de relocalisation de la synapse immunologique et par conséquent à une absence de dégranulation. Un défaut de liaison de la Perforine à la surface de ces cellules tumorales a été mis en évidence dans un modèle de résistance des cellules de leucémies myéloïdes aiguës à la lyse NK (Lehmann et al., 2000). Dans d'autres modèles tumoraux humains et murins, ont été montré que les cellules tumorales échappent à la mort induite par la voie Perforine/Granzymes en exprimant respectivement les Serpines PI9 et SPI6, inhibiteurs cellulaires du Granzyme B. En effet, l'expression de ces inhibiteurs constitue un mécanisme d'échappement à la lyse induite par les CTL aussi bien in vitro qu'in vivo (Medema et al., 2001).

1.3.2.3 Délétion des lymphocytes T

L'autre mécanisme permettant aux cellules tumorales d'échapper à la réponse immunitaire correspond à des stratégies permettant la délétion des lymphocytes T spécifiques de la tumeur, comme décrit précédemment, par une expression de FasL sur les cellules tumorales et induction d'apoptose sur les cellules T.

D'autres mécanismes entraînant également la délétion des lymphocytes T spécifiques de tumeur ont été décrits, comme l'expression par les cellules tumorales de la molécule B7-H1/PD-L1 qui ciblerait le récepteur PD-1 à la surface des cellules T activées et induirait leur apoptose (Blank and Mackensen, 2007). Récemment, un nouveau membre de la famille de B7, B7-H4 a été identifié dans plusieurs types de cancers. Il a été montré que cette molécule est capable d'inhiber la croissance et la cytotoxicité des cellules T en arrêtant le cycle cellulaire (Sica et al., 2003; Sun et al., 2006b; Cheng et al., 2009). Un autre ligand exprimé par les cellules tumorales, RCAS1 (Receptor-binding Cancer Antigen expressed on SiSo cells), a été décrit comme pouvant induire l'apoptose des cellules T et des cellules NK via RCAS1/RCAS1R (Sonda et al., 2011; Takahashi et al., 2001). L'expression de RCAS1 permet aux cellules tumorales d'induire un arrêt de la prolifération des lymphocytes T et leur entrée en apoptose en déclenchant le relargage du cytochrome c et en activant le clivage de la procaspase-3 (Nishinakagawa et al., 2010).

1.3.2.4 Production des facteurs immunosuppresseurs

Le déclenchement d'une réponse immunitaire efficace peut être également inhibé par des facteurs immunosuppresseurs sécrétés dans le microenvironnement par les cellules cancéreuses elles-mêmes, les effecteurs du système immunitaire mais aussi par les autres composants du stroma tumoral.

1.3.2.4.a TGF- β . De nombreux travaux ont ainsi montré que le TGF- β est sécrété par de nombreuses tumeurs humaines (Fujita et al., 2009) et présente de multiples propriétés

immunosuppressives, notamment celle d'inhiber la différenciation, la prolifération et l'activation des cellules T. Il a d'ailleurs été démontré *in vivo*, dans un modèle murin, que l'inhibition sélective de la voie de signalisation du TGF- β dans les cellules T était nécessaire pour permettre l'éradication des tumeurs sécrétant cette cytokine (Gorelik and Flavell, 2001). Par ailleurs, la sécrétion de TGF- β par les cellules T apoptotiques a été détectée contribuant au milieu immunosuppresseur (Chen et al., 2001). De fortes concentrations de TGF- β sont aussi fréquemment trouvées chez les patients atteints de cancer et sont associées à la progression de la maladie et aux mauvaises réponses à l'immunothérapie (Nicolini and Carpi, 2009; Elliott and Blobe, 2005). En outre, les études montrent que le TGF- β permet le recrutement des cellules T régulatrices (Treg) et leur activation en induisant l'expression du facteur de transcription FoxP3 (Li et al., 2006). Cependant, le TGF- β peut aussi induire l'activation du système immunitaire. En effet, une étude récente a montré que le TGF- β permet l'activation des lymphocytes T CD8⁺ grâce à l'induction de l'expression du CD103, ce qui augmente l'adhésion des cellules T sur les cellules tumorales (Le Floch et al., 2007).

1.3.2.4.b IL-10. Un autre prototype de cytokine immunosuppressive est l'IL-10, également sécrétée par de nombreuses cellules tumorales. L'IL-10 inhibe la réponse anti-tumorale en agissant sur plusieurs fronts. Par exemple, les travaux ont montré que l'IL-10 est également capable de bloquer le recrutement des DC en réponse à une vaccination basée sur l'utilisation du facteur GM-CSF (Qin et al., 1997). L'IL-10 augmente aussi l'apoptose spontanée des DC ainsi que leur susceptibilité à la lyse induite par les cellules NK autologues (Ludewig et al., 1995; Carbone et al., 1999; Terrazzano and Carbone, 2012). Par ailleurs, l'IL-10 peut orienter le phénotype des macrophages vers un phénotype M2 régulateur. De plus, l'IL-10 peut protéger les cellules tumorales à la lyse induite par les CTL autologues en diminuant l'expression des molécules de CMH-I et -II et de ICAM-1 (Yue et al., 1997). La perte d'expression des molécules du CMH-I par l'IL-10 a été associée à la diminution d'expression des molécules TAP-1 et TAP-2 dans les cellules tumorales autologues (Salazar-Onfray et al., 1997; Zeidler

et al., 1997; Serrano et al., 2011).

1.3.2.4.c VEGF. Il a aussi été démontré que la molécule VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) pourrait avoir, outre ses capacités pro-angiogéniques, un rôle immunosuppresseur, notamment en bloquant la différenciation et la maturation des DC et en inhibant la prolifération des cellules T (Ohm et al., 2003; Ni et al., 2012). En plus, la production de VEGF par les cellules tumorales, conduit également à une expansion de la population des cellules myéloïdes suppressives (MDSC). L'analyse immunohistologique des tissus de carcinomes gastriques a révélé une corrélation inverse entre la densité des DC et l'expression de VEGF (Wang and Oliver, 2010) et elle est associée à un mauvais pronostic (Saito et al., 1998). Les patients atteints de cancer du poumon, du sein, de la tête, et du cou, montrent une diminution du nombre de DC matures et de leur fonction, associée à une augmentation de la concentration plasmique de VEGF (Almand et al., 2000). De plus, cette cytokine est induite dans des conditions hypoxiques, caractéristique important de l'environnement tumoral (Liu et al., 1996).

1.3.2.4.d IL-6 et M-CSF. L'IL-6 est une cytokine pléiotropique qui possède un large spectre d'action dans diverses conditions pathologiques et qui bloque la différenciation des DC. M-CSF, produit par les cellules tumorales (Menke et al., 2012) et les cellules myéloïdes présents dans le microenvironnement tumoral, est capable d'favoriser la différenciation des macrophages par une augmentation de l'expression du récepteur au M-CSF à la surface des monocytes (Menetrier-Caux et al., 1998). Comme pour l'IL-10, la forte concentration d'IL-6 dans le sérum des patients atteints de mélanome métastatique a été associée à un mauvais pronostic et à la résistance au traitement par l'IL-2 (Tartour et al., 1994).

1.3.2.4.e IDO. Le rôle biologique d'IDO dans l'induction de la tolérance tumorale est encore sujet à de vives investigations (Katz et al., 2008; Löb et al., 2009). La molécule IDO est exprimée par de multiples types cellulaires en réponse à une inflammation. Cependant,

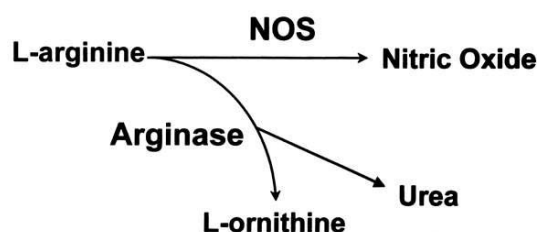


FIGURE 1.7 – Le métabolisme de L-arginine dans les macrophages.

IDO est majoritairement exprimée par les cellules stromas (les cellules endothéliales, les DC et les macrophages). Le mécanisme d'action immunosuppresseur de cette enzyme de la voie kynurénine, se fait via une réduction locale de la concentration de tryptophane, en inhibant la prolifération des lymphocytes T et des cellules NK (Fallarino et al., 2002; Frumento et al., 2002; Chiesa et al., 2006).

1.3.2.4.f iNOS et NO. iNOS est une des trois enzymes responsables de la synthèse du monoxyde d'azote (*NO*), à partir de l'oxydation de L-arginine. La voie métabolique L-Arg est montrée dans la Figure 1.7. L-arginine est métabolisé par deux enzymes : 1) l'Oxyde Nitrique Synthase (NOS), qui s'oxyde L-Arg et produit *NO* et 2) Arginase, qui convertit la L-Arg en urée et L-ornithine (Bogdan, 2001; Wu et al., 2009). iNOS est exprimé par les tumeurs ainsi que par d'autres éléments du stroma comme les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques. Les études récentes ont corrélé l'expression d'iNOS à un mauvais pronostic clinique dans les mélanomes humains, ce qui suggère que cette molécule pourrait être une cible thérapeutique intéressante (Ekmekcioglu et al., 2006; Grimm et al., 2008). En plus de son rôle non négligeable dans la croissance tumorale et la formation des métastases en induisant les facteur d'angiogenèse (Gallo et al., 1998), il est également capable d'inhiber fortement la réponse de type T et NK au site tumoral (Al-Sarireh and Eremin, 2000; Siveen and Kuttan, 2009).

1.3.2.4.g Les prostaglandines. Les prostaglandines, notamment la prostaglandine de type E2 (PGE2), sont des molécules produites par de nombreux types cellulaires notamment par les monocytes/macrophages et également sécrétées par les tissus cancéreux. Ils peuvent affecter la réponse immunitaire de l'hôte, en inhibant la prolifération, la cytolyse et la production d'anticorps par les lymphocytes (Chouaib and Bertoglio, 1988; Harris et al., 2002). L'augmentation de l'expression de COX-2 (Cyclooxygenase-2, qui contrôle la synthèse des prostaglandines) a été décrite dans de nombreux cancers (mélanome, cerveau, tête et cou, hépatocellulaire) et a été associée à un mauvais pronostic pour les patients (Grimm et al., 2008; Iwamoto et al., 2006).

1.3.3 Immunosuppression et induction de tolérance

Durant les 30 dernières années la majorité des études sur le cancer se sont focalisées sur les cellules tumorales afin de déterminer les fonctions des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur ainsi que les différentes voies de signalisation qui régulent la prolifération, la survie ou la mort cellulaire. Ces études ont apporté beaucoup à la compréhension des mécanismes de transformation cellulaire mais elles ont largement ignoré le fait que les cancers sont des entités cellulaires hétérogènes dont le développement et la survie dépend des interactions réciproques entre les cellules initiatrices génétiquement altérées et le microenvironnement cellulaire dans lequel elles vivent.

Ainsi, ces dernières années d'intenses recherches ont été réalisées afin de mieux caractériser ce microenvironnement cellulaire composé en majorité de fibroblastes, de cellules immunitaires, de cellules endothéliales et de cellules épithéliales et de comprendre comment celui-ci favorise la croissance tumorale. Les études qui se sont intéressées au rôle de ces différentes cellules dans le contexte de l'immunité anti tumorale indiquent que de nombreux types cellulaires immunes modifiés ou recrutés par les tumeurs peuvent altérer les réponses immunitaires anti tumorales pour participer à l'établissement de l'état de tolérance fréquemment observé dans les cancers. Comme montré dans le Figure 1.8, les cellules tumorales exercent

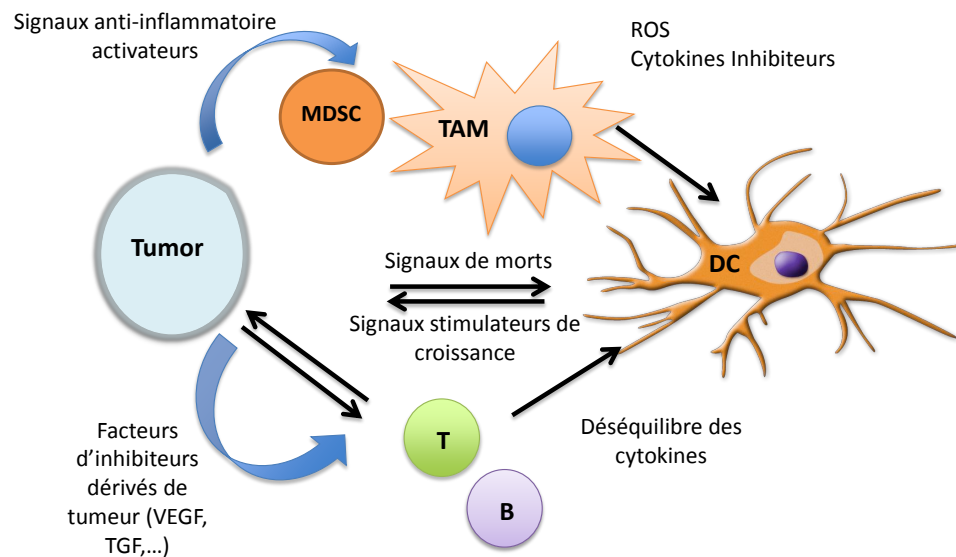


FIGURE 1.8 – Les interactions entre les cellules de système immunitaire et les cellules tumorales dans le microenvironnement tumoral.

des effets suppressives sur les cellules immunes par une induction des signaux de morts. En même temps, les macrophages TAM (Tumor Associated Macrophages) ou les MDSC (Myeloid Derived Suppressive Cells) ou T régulatrices sécrètent des molécules et des cytokines inhibitrices comme ROS, IL-10 ou TGF- β . Les cellules dendritiques qui sont dans le microenvironnement tumoral n'arrivent pas à se différencier vers les cellules présentatrice d'antigène et expriment les marqueurs de phénotype immature. Les lymphocytes sont non-fonctionnels et le déséquilibre des cytokines favorise la réponse Th2.

1.3.3.1 Les lymphocytes T $CD4^+CD25^+$ régulateurs

Il a été montré qu'une fraction des lymphocytes T amplifiés au niveau de la tumeur ou présents dans le sang périphérique des patients présentaient la capacité de réguler négativement la réponse immune anti-tumorale. Il s'agit d'une population des lymphocytes T $CD4^+CD25^+$ qui montrent des activités suppressives sur d'autres populations des cellules T et qui ont initialement été identifiés par le groupe de Sakaguchi (Takahashi et al., 1998).

Ils interviennent dans la prévention physiologique des maladies auto-immunes en régulant l'homéostasie des lymphocytes T (Sakaguchi et al., 2008). Cette population lymphocytaire qui représente 3% des lymphocytes T $CD4^+$, se caractérise par l'expression du facteur de transcription FoxP3, qui contrôle le développement et les fonctions de ces cellules, par l'expression à leur surface des molécules LAG (lymphocyte activation gene)-3, CTLA-4, et GITR (glucocorticoid-induced TNF receptor) et par la sécrétion des cytokines immunosuppressives telles que le TGF- β et l'IL-10 (Wang et al., 2007).

L'identification des lymphocytes T régulateurs et l'amélioration des marqueurs permettant de les discriminer, ont conduit de nombreux groupes à s'intéresser au rôle de ces cellules dans les cancers. Ils ont permis de démontrer la présence d'un nombre accru de Treg dans le sang circulant ainsi que dans le microenvironnement tumoral de patients atteints de cancers d'origines diverses chez lesquels ces cellules peuvent représenter une fraction importante des TIL (Zou, 2006). L'isolation de ces cellules a permis de confirmer que ces cellules présentent des propriétés immunosuppressives (Curiel et al., 2004).

Ces cellules inhibent, après contact cellulaire, l'activation et la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ ainsi que la production d'IL-2 par différents mécanismes. Comme montré dans le Figure 1.9, les cytokines telles que l'IL-10 et le TGF- β semblent être impliquées dans l'inhibition des réponses immunitaires anti tumorales par les Treg comme le soulignent plusieurs études qui décrivent la production d'IL-10 et de TGF- β par les Treg issus différents types de tumeurs humaines (Strauss et al., 2007; Hilchey et al., 2007).

Les Tregs peuvent également exercer leurs fonctions suppressives en induisant l'apoptose des cellules effectrices comme DC et les cellules T effectrices, via l'action des granzyme A et B (Gondek et al., 2005; Boissonnas et al., 2010). Il a été récemment décrit que les cellules Treg peuvent induire l'apoptose des cellules T $CD4^+$ en déprivant le milieu en cytokines (IL-2 et IL-7) (Pandiyani et al., 2011). De plus, La modulation des fonctions des DC est également un mécanisme clef permettant aux Treg d'inhiber les réponses anti tumorales. En effet, les Treg peuvent influencer sur les capacités activatrices des DC en diminuant l'expression des molécules

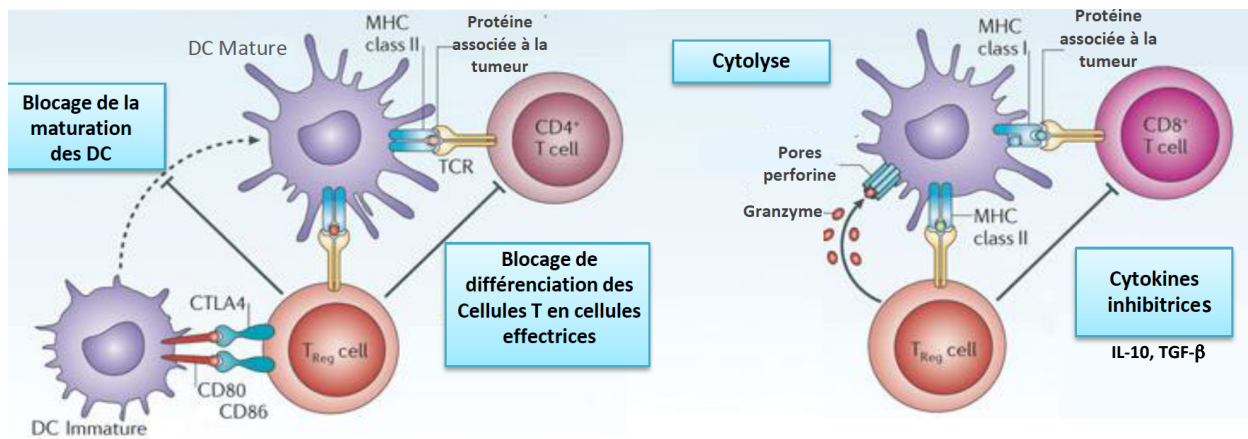


FIGURE 1.9 – Les mécanismes d'action des cellules T régulatrices. D'après Campbell and Koch (2011).

de Co stimulation CD80 et CD86 et stimuler leur différenciation en DC tolérogènes (Hubert et al., 2007). Ainsi, il a été démontré que les Treg peuvent induire l'expression d'IDO dans les DC par des interactions entre CTLA-4 et CD80 ou CD86 (Onodera et al., 2009) suggérant un rôle probable de ces cellules dans l'accumulation des DC IDO⁺ dans les ganglions drainant les tumeurs (Munn et al., 2007) (Figure 1.9).

1.3.3.2 Les macrophages

Le microenvironnement tumoral consiste aux cellules néoplasiques, les cellules de stromas et les cellules hématopoïétiques. Les interactions entre les différents types cellulaires dans ce microenvironnement, régulent l'inflammation, la progression tumorale, la métastase et l'angiogenèse (Sinha et al., 2007; Murdoch et al., 2008). Dans ce contexte, la plasticité de la fonction des macrophages est bien décrite. Il y a des évidences pour le rôle essentiel des macrophages classiques dans l'immuno surveillance anti-tumorale et la prévention de la croissance des cellules transformées in vitro (Klimp et al., 2002). En effet, les macrophages exercent un rôle anti-tumoral dans l'éradication des cellules tumorales dans les phases précoces (Romieu-Mourez et al., 2006). Cependant, d'autres études ont montré que la déplétion des macrophages n'augmente pas la susceptibilité au cancer et peut même être bénéfique pour la hôte (Lin and Pollard, 2007). Ainsi, le rôle des macrophages dépendrait de leur phénotype. Mais au cours de la progression tumorale, les agents produits par le microenvironnement tumoral, changent le phénotype des macrophages en macrophages anti-inflammatoires et pro-tumoraux. Ces macrophages sont appelés TAM ou les macrophages associés à la tumeur, et il semble que les TAM sont impliqués dans le cross-talk avec des cellules tumorales et d'autres cellules du microenvironnement tumoral (Mantovani et al., 1992; Sica et al., 2000; Hagemann et al., 2004; Fleming and Mosser, 2011). Ces conclusions sont fondées non seulement sur les études d'association, mais aussi sur des expériences montrant que la délétion des macrophages, ou l'inhibition de leur infiltration dans les tumeurs, inhibe la croissance et les métastases (Lin and Pollard, 2007; Ch'ng et al., 2013). Durant ce chapitre, dans un premier temps, je décrirai :

- (i) Monocytes : Les cellules d'origines des macrophages
- (ii) Hétérogénéité des monocytes
- (iii) Différenciation des monocytes en macrophages
- (iv) Polarisation des macrophages et leurs phénotypes

Par la suite, je focaliserai sur les macrophages associés aux tumeurs et leur rôle dans l'immunobiologie des tumeurs.

1.3.3.2.a Les monocytes. Chez les mammifères, la plupart des effecteurs de système immunitaire se différencient à partir des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes dans la moelle osseuse, que par la suite se différencient en précurseurs myéloïdes ou lymphoïdes. Les étapes de différenciation des monocytes sont essentiellement dépendantes du facteur de croissance M-CSF (Macrophage-colony stimulating factor ou CSF-1). Les monocytes, macrophages, cellules dendritiques et leurs précurseurs partagent d'ailleurs le récepteur au M-CSF (CSF-1R) comme caractéristique (Auffray et al., 2009). Les monocytes vont alors sortir de la moelle osseuse pour entrer dans la circulation sanguine.

Les monocytes représentent environ 10% des leucocytes circulant chez l'homme et 4% des leucocytes chez la souris. Les monocytes circulent dans le sang entre 1 et 3 jours avant de migrer dans les tissus en réponse des chimiokines et se différencier vers différents types cellulaires comme les macrophages et les cellules dendritiques (Serbina and Pamer, 2006).

Plusieurs facteurs de croissance et cytokines sont nécessaires au contrôle du développement et à l'homéostasie des macrophages et des DC (les cellules spécialisées à présenter les antigènes aux lymphocytes T naïfs). Les produits pro-inflammatoires, métaboliques et immunitaires peuvent susciter une augmentation du recrutement des monocytes aux sites périphériques, où la différenciation en macrophages et en DC aura lieu, ce qui contribue à la défense de l'hôte, et le remodelage tissulaire et la réparation. Les études, en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques pour les différents récepteurs de surface cellulaire et les antigènes de différenciation, ont montré qu'il existe une forte hétérogénéité phénotypique de cette population. Bien qu'il soit clair que les monocytes sont des précurseurs des macrophages et des DC, ce développement et la voie de différenciation est encore relativement peu étudiés *in vivo*. Cependant, l'identification d'hétérogénéité entre les monocytes de sang périphériques - d'abord, chez l'homme, et plus récemment, chez la souris - a donné un aperçu

puissant dans la nature d'hétérogénéité des cellules myéloïdes in vivo (Steinman and Idoyaga, 2010).

1.3.3.2.b Hétérogénéité des monocytes. L'identification des sous-populations des monocytes est rendue possible grâce à la disponibilité des anticorps monoclonaux appropriés. Tous les monocytes murins expriment CD115 (CSF-1R) et CD11b. Les monocytes de souris sont subdivisés en deux sous-populations distinctes basées sur l'expression différentielle de Ly6C, CCR2, CD62L et le récepteur 1 de CX3C (CX3CR1).

Comme indiqué dans la Figure 1.10, suite à la libération des monocytes Ly6C^+ de la moelle osseuse dans la circulation sanguine, ils se distinguent par le niveau d'expression du marqueur Ly6C (Ly6C^+ , Ly6C^{med} et Ly6C^-). La première sous-population (Ly6C^+), dites la population « inflammatoire », se caractérise par une forte expression de CCR2, le récepteur à la chemine CCL2 (MCP1) et CD62L, mais une faible expression de CX3CR1 (Geissmann et al., 2010). La majorité de cette population lors d'une inflammation va se différencier en macrophages qui sont importants pour l'élimination des pathogènes et la résolution de l'inflammation (Gordon and Taylor, 2005).

Une deuxième sous-population des monocytes, qui est minoritaire (5%) , exprime un niveau intermédiaire de Ly6C (Ly6C^{med}) et se distingue par l'expression des différents récepteurs des chimiokines (CCR7, CCR8)(Sunderkötter et al., 2004). Lors d'inflammation, ces monocytes vont être recrutés vers le tissu enflammé et sur-expriment le marqueur CD11c et MHC II en migrant vers les ganglions lymphatiques où ils favorisent la prolifération des cellules T et vont se différencier vers les DC (Geissmann et al., 2003).

En fin, la dernière sous-population des monocytes qui sont Ly6C^- , dites la population « résidente », est caractérisée par une forte expression de CX3CR1 mais $\text{CCR}^- \text{CD62L}^-$. Les monocytes CX3CR1^+ circulant ont une durée de vie plus longue par rapport aux monocytes inflammatoires et ce sont ces cellules qui se différencient en DC et macrophages résidentiels (Figure 1.10).

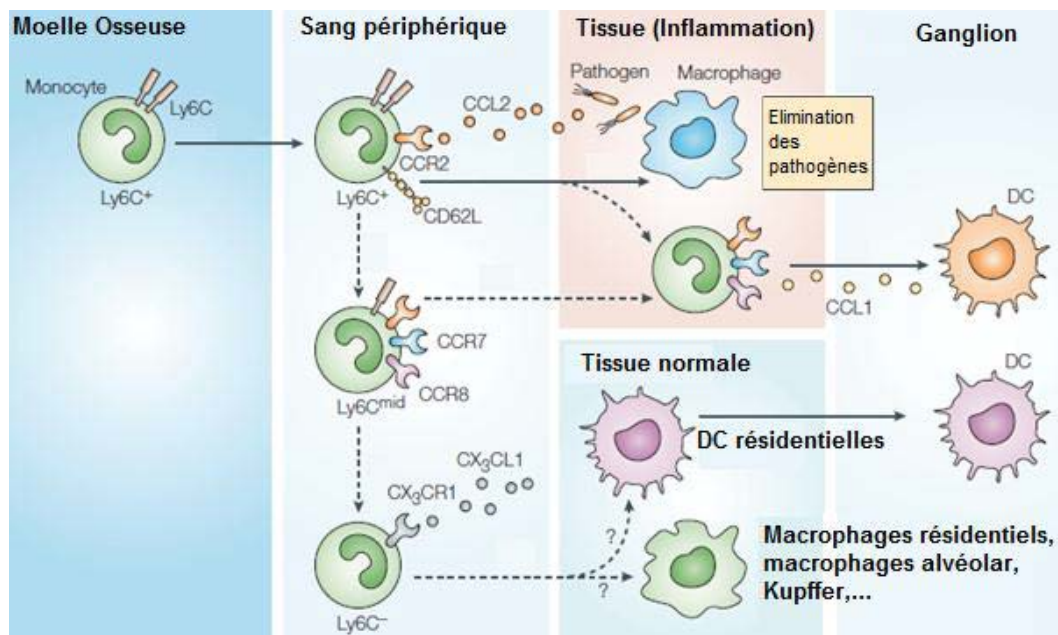


FIGURE 1.10 – Développement des sous-populations monocytaires chez la souris. D'après Gordon and Taylor (2005).

Chez l'homme aussi, les monocytes circulant sont divisés en deux sous-populations basés sur l'expression différentielle de CD14 (un co-récepteur aux lipopolysaccharides (LPS)) et CD16 (Le récepteur d'immunoglobuline-FcγRIII) (Passlick et al., 1989). La première sous-population qui correspond aux cellules $CCR2^+Ly6C^+$ chez la souris, sont les cellules $CD14^{High}CD16^-$, qui représente 80-90% des monocytes circulants. Ces cellules sont de grande taille ($18\ \mu m$) au contraire de la deuxième sous-population $CD14^{low}CD16^+$ qui sont plus petites ($14\ \mu m$). Les monocytes $CD16^+$ présente une forte capacité de phagocytose et de production de cytokines pro-inflammatoires (Tumor Necrosis Factor (TNF)- α et interleukine IL-6 et IL-1) (Auffray et al., 2009; Grage-Griebenow et al., 2001; Geissmann et al., 2010).

1.3.3.2.c La différenciation des monocytes en macrophages. Les macrophages se différencient à partir des monocytes en présence de facteurs de croissance et de leurs récepteurs spécifiques. Ils migrent vers les sites locaux de blessures et infections, ce qui contribue

à l'inflammation aiguë et chronique, localement et systémique (Geissmann et al., 2010). Les macrophages diffèrent morphologiquement et phénotypiquement dans les organes tels que la foie, la rate, les poumons, l'intestin et le cerveau.

La différenciation est sous le contrôle des facteurs de croissance, GM-CSF et M-CSF. L'équilibre entre ces deux facteurs, les oriente vers les différents phénotypes. Au cours de ce processus, les monocytes sont exposés aux différentes cytokines comme IFN- γ ou IL-4. Après une stimulation par les différents signaux environnementaux, les macrophages atteignent à leur phénotype mature.

La lignée des macrophages, en plus de leur rôle essentiel dans le système de l'immunité innée, la phagocytose et l'élimination des pathogènes, peuvent être des cellules régulatrices ou effectrices des réponses humorales ou cellulaires (Mantovani et al., 2007) et sont impliqués dans la réparation tissulaire, le remodelage, l'inflammation et le cancer.

1.3.3.2.d Polarisation des macrophages. Les macrophages ont une plasticité remarquable qui leur permet de répondre efficacement aux signaux de l'environnement et de modifier leur phénotype et leur physiologie qui peut être nettement altérée par les réponses immunitaire innée et adaptative. En effet, depuis les travaux de Mackaness (1969) dans les années de 1970s, nous avons appris que les changements dans la physiologie des macrophages en réponse à des signaux environnementaux peuvent leur fournir une activité antimicrobienne accrue. Cependant, les signaux environnementaux n'induisent toujours pas de modifications qui augmentent la fonction des macrophages immunitaires. À la fois des réponses immunitaires innées et adaptatives peuvent donner lieu à des macrophages qui sont plus sensibles aux infections pathogènes, mais moins équipés pour produire les cytokines qui augmentent la réponse immunitaire. En générale, la production des cytokines pro et anti-inflammatoires est la clé de la polarisation des macrophages. À l'image de la nomenclature appliquée pour la polarisation des cellules T type 1 et type 2 (TH1 et TH2), nous distinguons deux populations majoritaires pour les macrophages : Les macrophages « Classiques » ou M1 et les

macrophages M2 comme détaillé ci-dessous.

1.3.3.2.d.i Les macrophages M1. Les cellules TH1, en produisant de l'IFN- γ , peuvent conduire à la polarisation des macrophages vers le phénotype classique ou M1. Ces cellules sont caractérisées par leur capacité à sécréter des grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires (tels que l'IL-12, IL-23 et TNF), les intermédiaires réactifs de nitrogène et des intermédiaires réactifs de l'oxygène, une forte expression du complexe majeur d'histocompatibilité classe II (CMH II) et des molécules de co-stimulation (Biswas and Mantovani, 2010).

Les macrophages M1, lors qu'ils sont activés par la voie TLR, suite à une infection, produisent TNF- α et IFN- γ (Figure 1.11), qui est également produit par les cellules TH1 et NK au cours de la réponse. Cette IFN- γ favorise la production du monoxyde d'azote (*NO*) et des produits oxygénés (ROS) qui sont produits par l'activité d'iNOS. L'activation d'iNOS semble être la conséquence de la fixation et la coopération entre STAT-1 et NF κ B, sur le promoteur d'iNOS.

La production de *NO* et ROS est la voie majeure utilisée par les macrophages pour leur activité microbicide. Les dérivés oxygénés (ROS) sont produits au cours de différentes voies métaboliques et par différents enzymes comme NAPDH oxydase, en utilisant l'oxygène moléculaire pour produire une grande quantité d'anion super oxyde. *NO* comme décrit précédemment, est produit en catabolisant L-arginine par l'activité enzymatique d'iNOS (Figure 1.7).

Le rôle majeur des macrophages M1 dans la réponse innée consiste à éliminer les pathogènes intracellulaire. En effet, les souris déficientes en IFN- γ , sont plus susceptibles aux différentes infections virales ou bactériennes (Filipe-Santos et al., 2006). Ces macrophages sont des sources importantes des chimiokines CXCL9 et CXCL10, nécessaires au recrutement des cellules TH1 et les cellules NK et ainsi l'amplification de la réponse de type 1 (Mantovani et al., 2004).

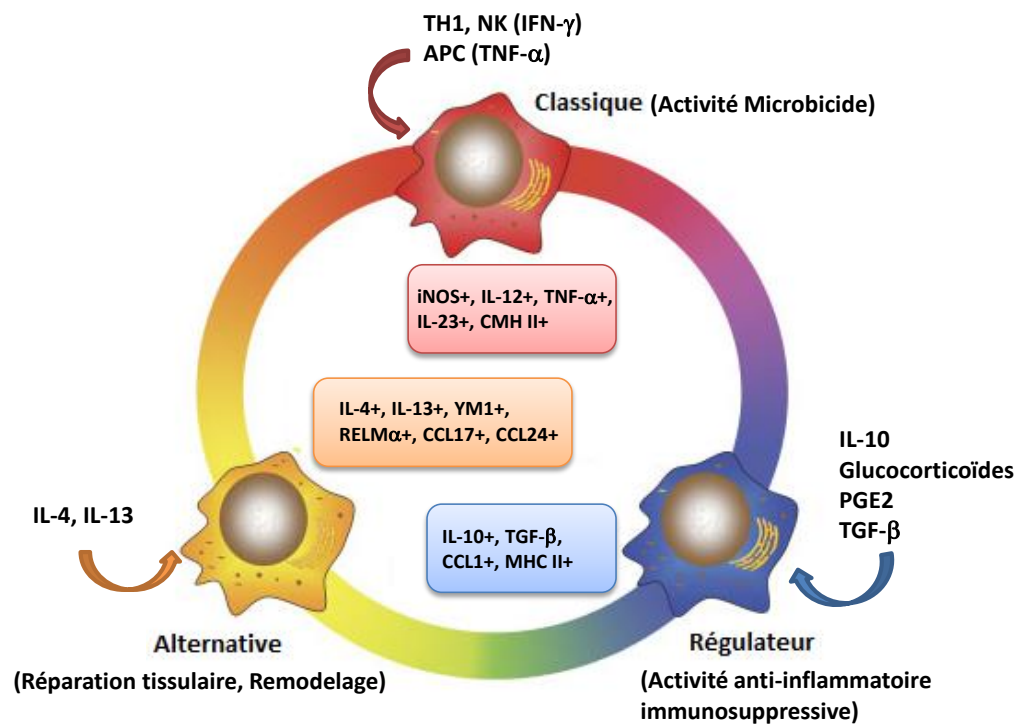


FIGURE 1.11 – Les trois phénotypes des macrophages : M1 (Classique), M2-like (Alternative) et Régulateurs. D'après Fleming and Mosser (2011).

Les macrophages M1 sont des cellules efficaces pour la présentation de l'antigène, et elles exercent une forte activité tumoricide via une expression de cytokines comme l'IL-12, l'IL-1, IL-6. Bien que les macrophages M1 sont des composants nécessaires, mais leur activation doit être étroitement contrôlée ; car les cytokines pro-inflammatoires produites et les médiateurs activés par ces cellules peuvent provoquer les maladies auto-immunes. En effet, la production des cytokines pro-inflammatoires peut être associée au développement et l'expansion de cellules TH17 (Bettelli et al., 2006). Ces cellules produisent d'IL-17, une cytokine associée à un grand niveau de recrutement des leucocytes polynucléaires (PMN) dans les tissus, ce qui peut contribuer aux pathologies auto-immunes (Kolls and Lindén, 2004).

1.3.3.2.d.ii Les macrophages M2. Dans les années 1990, Simon Gordon (Stein et al., 1992) et ses collègues ont démontré que l'exposition des macrophages aux cytokines TH2, IL-4 /IL-13, donnait naissance à une population de cellules qui était fonctionnellement et biochimiquement distinctes des macrophages classiques. Ces macrophages sont appelés « alternative » et ils jouent un rôle important dans l'élimination des parasites helminthes (Hesse et al., 2001). En effet, les différents signaux d'activation des macrophages M2 définissent leurs caractéristiques fonctionnelles. IL existe deux classifications selon les auteurs. En 2004, Mantovani et al. (2004) proposa une nomenclature qui permet de subdiviser les macrophages « alternatives » en trois sous populations M2a, M2b et M2c selon les différents signaux d'activation. La sous-population M2a est induit par les cytokines IL-4 et IL-13 ; les complexes immuns associés aux ligands des TLR ou du IL-1R aboutissent à une polarisation M2b et en fin, les macrophages M2c ou les macrophages anti-inflammatoires sont polarisés par IL-10 (Mantovani et al., 2004).

En 2008, Mosser and Edwards (2008) proposa une autre classification selon les fonctions développées (M2 Like et M2 régulateurs). Ces deux approches ont permis de mieux caractériser le phénotype des macrophages et de mettre en valeur leur rôle dans les réponses

immunitaires et dans l'homéostasie.

En générale, Les macrophages M2 sont caractérisés par une faible production des cytokines pro-inflammatoires comme IL-12, IL-23, IL-1, TNF et IL-6 et une forte production des cytokines anti-inflammatoires comme IL-4, IL-10. Je vais détailler les deux sous-populations des macrophages ci-dessous (Figure 1.11).

- (i) Macrophages M2-Like ou alternatives : Lors d'une lésion tissulaire et l'induction de la réponse TH2, une des premières cytokines présentes est l'IL-4, qui est produit principalement par les cellules T, les basophiles et parfois par les granulocytes (Gallagher et al., 2007; Brandt et al., 2000). Cette production d'IL-4 et aussi IL-13, peut convertir les macrophages résidentiels en macrophages M2-Like. Récemment, il a été montré qu'IL-33, une cytokine de la famille IL-1, amplifie la polarisation induite par l'IL-13 sur les macrophages alvéolaires vers un phénotype M2-like, caractérisé par une augmentation d'YM1, RELM α , arginase 1, CCL24 et CCL17, conduisant à une éosinophilie pulmonaire et de l'inflammation (Kurowska-Stolarska et al., 2009; Hazlett et al., 2010). La forte production d'IL-4 par ces macrophages, induit une activité d'arginase, qui inhibe la production de *NO*, et permet de produire l'ornithine, un précurseur de polyamine et de collagène. Par conséquent, ces macrophages sont impliqués dans la production de matrix extracellulaire et la réparation tissulaire (Gallagher et al., 2007). Ainsi, les macrophages induits par IL-4/IL-13 sont importants dans la réparation tissulaire, l'élimination parasitaire et donc indispensable pour l'homéostasie tissulaire (Fleming and Mosser, 2011).
- (ii) Macrophages Régulateurs : Une autre population des macrophages appelés des macrophages régulateurs, sont souvent induits par les complexes immuns, les glucocorticoïdes et les cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 et TGF- β (Mosser, 2003). A l'inverse des macrophages M2-Like, les M2 régulateurs, n'expriment pas YM1 ou RELM α (Fleming and Mosser, 2011). Ces macrophages induisent la réponse TH2 de deux façons. Ces macrophages peuvent induire le recrutement des lymphocytes T de type TH2 via la

production de CCL1 (Sironi et al., 2006). Par ailleurs, ils peuvent, en tant que cellules présentatrices antigènes, orienter les réponses des cellules T vers la sécrétion d'IL-4 et les convertir en TH2 (Anderson and Mosser, 2002).

Mosser propose qu'une des fonctions des macrophages régulateurs est la modulation des réponses inflammatoires par le biais de production d'IL-10, limitant ainsi les dommages des tissus et en inhibant la production des cytokines pro-inflammatoires. Il faut souligner, toutefois, que si le rôle des macrophages régulateurs semble être de limiter les dommages des tissus, ces cellules ne semblent pas participer activement à la réparation (Edwards et al., 2006; Fleming and Mosser, 2011). Les macrophages TAM sont des macrophages régulateurs présents dans le microenvironnement tumoral et qui sont induits par différents éléments présents.

1.3.3.2.e Différenciation intra-tumorale des TAM. Plusieurs études épidémiologiques et cliniques ont démontré qu'il existe un lien entre les maladies inflammatoires chroniques et le risque d'apparition de cancer (Blaser et al., 1995; Shacter and Weitzman, 2002; Kuper et al., 2000). Les macrophages M1 connus pour jouer un rôle clef dans ce type de pathologies inflammatoires chroniques pourraient activement participer au processus de tumorigénèse notamment par la libération de médiateurs cytotoxiques comme les ROS ou le *NO* et de cytokines comme le $\text{TNF-}\alpha$, l'IL- 1β ou l'IL-6 (Coussens and Werb, 2002). Lorsque l'inflammation persiste, les macrophages M1 changent leur phénotype vers les TAM. Les macrophages TAM isolés à partir des différentes tumeurs murines et tumeurs des patients atteints de cancer, expriment des niveaux faibles de récepteurs de chimiokines inflammatoires et en particulier CCR2, ce qui pourrait être un mécanisme de rétention des macrophages au niveau de site tumoral (Sica et al., 2000).

L'IL-10, ainsi que $\text{TGF-}\beta$, est produit par différents types de cellules tumorales et par les TAM. En effet, il a été démontré dans divers modèles de tumeurs d'origine humaine ou murine que les TAM produisent peu d'IL-12 et des quantités importantes d'IL-10, expriment

faiblement l'enzyme iNOS et présentent des capacités de présentation d'antigène réduites. Les TAM présentent également un défaut de production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α en réponse au LPS. IL-10 favorise la différenciation des monocytes en macrophages matures et bloque leur différenciation vers les cellules dendritiques (Allavena and Mantovani, 2012). L'effet de l'IL-10 sur la différenciation des monocytes peut être un déterminant important de la proportion relative des TAM par rapport aux DC dans le microenvironnement tumoral (Kambayashi et al., 1995; Sica et al., 2000; Kurahara et al., 2011).

1.3.3.2.f Rôle des TAM dans la progression tumorale. Au cours de la progression tumorale, les TAM interviennent à différents processus dans la progression tumorale. Allavena and Mantovani (2012) présentent ces différents processus (Figure 1.12). Tout d'abord, par rapport les macrophages M1, les TAM produisent moins de TNF, IL-1, *NO* et ils sont essentiellement des producteurs d'un certain nombre de facteurs de croissances qui peuvent stimuler la croissance et la mobilité des cellules tumorales comme le FGF, l'HGF, les ligands de la famille des récepteurs à EGF (Epidermal Growth Factor) et le TGF- β . Ainsi, le pourcentage de TAM dans la masse tumorale est corrélé au potentiel métastatique de la tumeur dans divers types de cancers, ce qui suggère que les TAM jouent un rôle dans la dissémination des cellules cancéreuses.

Par ailleurs, les TAM sont impliqués dans la progression des métastases par une sécrétion des métalloprotéases, les chimiokines comme CSF-1. Dans un modèle de tumeur mammaire spontanée, la mutation du gène codant pour CSF-1 n'influe pas sur la cinétique d'apparition de la tumeur, mais en diminuant la densité et la maturation des TAM, inhibe la vascularisation et donc, permettrait de diminuer sa progression et son pouvoir métastatique, en diminuant la densité de TAM.

En plus, la production d'IL-10, de TGF- β ou de PGE2 par les TAM accumulés au niveau

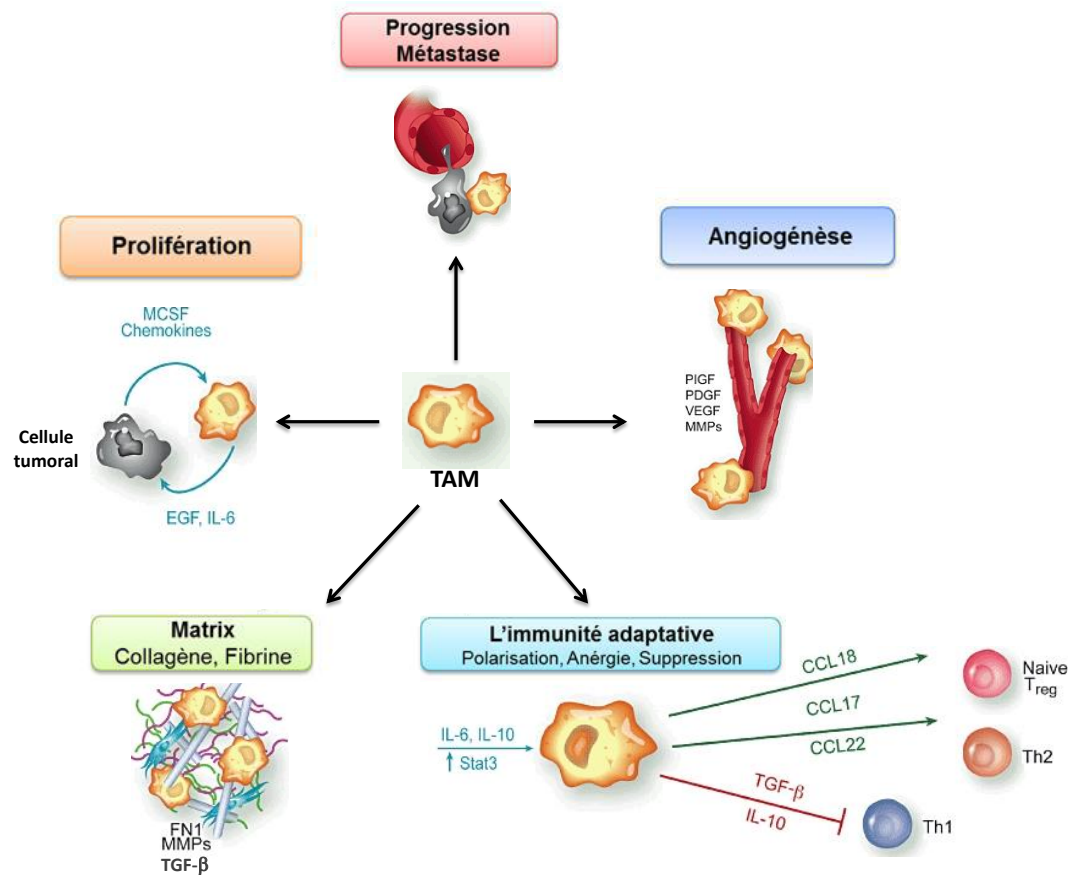


FIGURE 1.12 – Le rôle des TAM dans l’immunobiologie des tumeurs. D’après Allavena and Mantovani (2012).

de site tumoral, pourrait participer à l’établissement d’un microenvironnement immunosuppresseur néfaste à l’activité anti tumorale des NK et des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques. Par ailleurs, les TAM peuvent favoriser la conversion de lymphocytes T effecteurs en T régulateurs et en effet, dans les cancers ovariens il a été démontré que la production de CCL22 par les TAM était en partie responsable de l’accumulation des lymphocytes T régulateurs dans le stroma pro tumoral (Balkwill, 2004; Mantovani et al., 2004).

Le rôle ancestral des macrophages dans le remodelage des tissus et la réparation, se traduit par les TAM en produisant des enzymes et des inhibiteurs qui régulent la digestion

de la matrix extracellulaire, comme MMPs et plasmine.

En fin, Les TAM sont impliqué également dans l'angiogenèse en produisant un certain nombre de facteurs pro angiogéniques comme CXCL8, VEGF, FGF-2 et Platelet derived growth factor B (PDGF-B) qui, en activant le développement vasculaire de la tumeur, peuvent stimuler la croissance tumorale. Ainsi, des niveaux élevés de TAM sont corrélés à l'augmentation de l'angiogenèse dans de nombreux cancers (Leek et al., 1996; Lewis et al., 2000; Dineen et al., 2008).

1.3.3.3 Les cellules suppressives myéloïdes (MDSC)

1.3.3.3.a Définition et caractérisation. Les cellules myéloïdes suppressives ont été décrites Il y a plus de 20 ans chez les patients atteints de cancer (Young et al., 1987; Buesow et al., 1984), mais leur rôle dans la réponse tumorale a seulement récemment mieux analysé. Plusieurs études ont montré que la présence de ces cellules dans l'environnement est corrélée avec la progression tumorale. En effet, la déplétion des MDSC dans les souris porteuses de tumeurs permettait de restaurer les réponses de lymphocytes T CD8⁺ anti tumoraux (Bronte et al., 1998). D'autres études ont par la suite confirmé la capacité des MDSC issues de souris porteuses de tumeur à inhiber la prolifération et la production d'IFN- γ des lymphocytes T CD8⁺ activés par leur antigène spécifique in vitro et in vivo (Serafini et al., 2006). De façon intéressante, il a été montré, dans plusieurs modèles tumoraux, que dans le microenvironnement tumoral, les cellules T de type TH2, avec une forte production d'IL-10, IL-4 et TGF- β , favorisent l'accumulation des MDSC et donc favorisent la progression tumorale. En effet, la balance entre les cellules TH1 et TH2, régule la programmation des cellules myéloïdes avec une activité anti- versus pro- tumorale (DeNardo et al., 2010, 2009; Lengagne et al., 2011).

Les MDSC forment une population hétérogène de progéniteurs des cellules myéloïdes et de cellules myéloïdes immatures (IMC). Ces cellules représentent 20 à 30% des cellules de la moelle osseuse, environ 3% à 5% des cellules de la rate naïve, mais sont absentes dans les

autres organes lymphoïdes secondaires chez les souris naïves (Serafini et al., 2006). Dans une souris naïve, les IMC générés dans la moelle osseuse vont rapidement se différencier en granulocytes matures, macrophages ou cellules dendritiques (DC) et elles ne montrent aucunes propriétés régulatrices (Kusmartsev and Gabrilovich, 2005). En revanche, dans des conditions pathologiques, comme le cancer, les maladies infectieuses, la septicémie, les traumatismes, la greffe de moelle osseuse et les maladies auto-immunes, un blocage partiel de la différenciation de ces cellules (dont le ou les mécanismes demeurent incertain) vers les cellules myéloïdes matures, conduit à l'accumulation de ces cellules. L'accumulation des MDSC est induite par différents facteurs de croissance (GM-CSF, M-CSF) et des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β , IL-13 et autres). Plusieurs facteurs de transcription ont été impliqués dans l'expansion des MDSC, y compris STAT3, CEBP α , etc. (Condamine and Gabrilovich, 2011). Cependant, le mécanisme de blocage de la différenciation des MDSC vers les macrophages et DC reste incertain.

Les MDSC ont une forte capacité à supprimer la réponse lymphocytaire T. En plus de leurs effets inhibiteurs sur les réponses immunitaires adaptatives, les MDSC sont également des régulateurs de la réponse de l'immunité innée notamment les macrophages, en modulant la production des cytokines (Sinha et al., 2007). Les fonctions non immunologiques de MDSC ont également été décrites, telles que la promotion de l'angiogenèse tumorale et les métastases.

Chez la souris, les MDSC sont caractérisés par la co-expression de Gr1 et de l'intégrine α m CD11b. Ces cellules Gr1⁺CD11b⁺ sont subdivisées en deux sous-populations : les MDSC de type monocytaires (M-MDSC) et les MDSC de type granulocytaires (PMN-MDSC) (Youn et al., 2008; Movahedi et al., 2008; Peranzoni et al., 2010). Les M-MDSC ont une faible intensité d'expression de Gr1 et sont CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻. Les PMN-MDSC ont une forte intensité d'expression de Gr1 et sont CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁺. Les deux sous-populations inhibent la réponse T de façon antigène spécifique ou non-spécifique selon leur source.

Chez l'homme, une expansion similaire de cellules myéloïdes immatures est définies

qui sont des cellules $CD33^+CD11b^+CD14^-$, dans le cas de divers cancers (Almand et al., 2000). Chez l'homme, les M-MDSC sont définies comme des cellules $CD14^+HLA-DR^{low}$ ou $CD11b^+CD14^-CD33^+CD15^+$, alors que les PMN-MDSC sont définis comme $CD11b^+CD14^-CD33^+CD15^+$ (Nagaraj and Gabrilovich, 2010).

1.3.3.3.b Mécanismes d'immunosuppression par les MDSC. Les MDSC utilisent différents mécanismes d'immunosuppression via un contact cellulaire et la production de médiateurs solubles. Les principaux mécanismes utilisés par les MDSC pour induire une suppression de la réponse T anti-tumoral sont détaillés ci-dessous.

1.3.3.3.b.i Arginase 1 et iNOS. Historiquement, l'activité suppressive de MDSC a été associée au métabolisme de la L-arginine. Comme décrit précédemment, L-arginine est le substrat de deux enzymes, iNOS (qui génère du *NO*) et l'arginase 1 (qui convertit la L-arginine en urée et L-ornithine). Les MDSC expriment des niveaux élevés d'arginase 1 et iNOS, et un rôle direct de ces deux enzymes dans l'inhibition de la fonction des cellules T est bien établi (Bronte and Zanovello, 2005; Rodríguez and Ochoa, 2008). Des études ont montré que l'arginase en catabolisant L-arginine en L-ornithine, appauvrit le milieu extracellulaire en cet acide aminé essentiel à la prolifération et aux fonctions des lymphocytes T. Ce mécanisme d'appauvrissement en L-arginine par les MDSC, qui a été démontré comme étant à l'origine d'une diminution de l'expression de la chaîne ζ du TCR dans un modèle murin de cancer du poumon, pourrait donc représenter un mécanisme majeur de tolérance chez les patients atteint de cancer (Rodriguez et al., 2002). L'autre produit catabolisé à partir de L-arginine, *NO*, par son enzyme iNOS, supprime les fonctions des cellules T par différents mécanismes qui impliquent l'inhibition de la voie JAK3 et STAT5 en cellules T (Bingisser et al., 1998), l'inhibition de l'expression de CMH classe II (Harari and Liao, 2004) et l'induction d'apoptose des cellules T (Rivoltini et al., 2002).

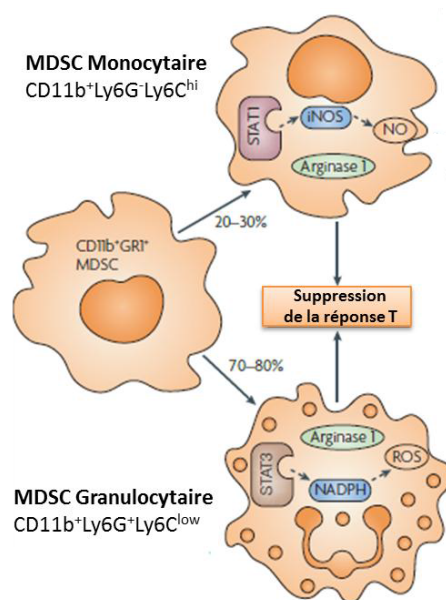


FIGURE 1.13 – Les mécanismes de suppression induits par les différentes sous-populations des MDSC. D'après Gabrilovich and Nagaraj (2009).

1.3.3.3.b.ii ROS (Reactive Oxygen Species). Un autre facteur important qui contribue à l'activité suppressive des MDSC est ROS. L'augmentation de la production de ROS a émergé comme l'une des principales caractéristiques des MDSC chez les souris porteuses de tumeur et aussi des patients atteints de cancer (Kusmartsev and Gabrilovich, 2003; Agostinelli and Seiler, 2006). Les études montrent que plusieurs facteurs dérivées de tumeurs, tels que TGF- β , IL-3, IL-6, IL-10 et GM-CSF, peuvent induire la production de ROS par les MDSC (Sauer et al., 2001).

Des données récentes indiquent que les différentes sous-populations des MDSC pourraient utiliser différents mécanismes pour supprimer la prolifération des cellules T. Le Figure 1.13 récapitule le ou les mécanismes utilisés par chaque sous-population des MDSC. La sous-population granulocytaire ou PMN-MDSC produit des niveaux élevés de ROS et de faibles niveaux de NO. Inversement, la sous-population monocytaire ou M-MDSC produit de faibles niveaux de ROS et des niveaux élevés de NO. Les deux sous-populations expriment arginase

1 (Youn et al., 2008) (Figure 1.13).

La recherche sur les cellules myéloïdes suppressives révèle plusieurs questions, dont leur réponse n'a pas été trouvée à ce jour. Les rôles des sous populations MDSC dans la suppression de la réponse T ou les mécanismes moléculaires responsables de blocage partiel de leur différenciation vers les macrophages et DC, restent à élucider.

Chapitre 2

Objectifs des Travaux

Durant les 30 dernières années, la plupart des études sur le cancer a été focalisées sur les cellules tumorales afin de déterminer les fonctions des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur ainsi que les différentes voies de signalisation qui régulent la prolifération, la survie ou la mort cellulaire. Ces études ont apporté beaucoup à la compréhension des mécanismes de transformation cellulaire mais elles ont largement ignoré le fait qu'au cours du processus de progression tumorale, les cellules tumorales établissent des interactions réciproques avec des cellules immunes. Les études montrent que les cellules immunitaires présentes dans le microenvironnement tumoral, peuvent altérer la réponse anti-tumorale, comme les cellules myéloïdes suppressives ou les macrophages.

Fas et son ligand, FasL, les membres de la superfamille des TNFR et TNF respectivement, sont exprimés par les cellules du système immunitaire mais également par différents autres tissus normaux et tumoraux. Le rôle initial de la voie Fas/FasL est l'induction d'apoptose qui est indispensable pour le maintien de l'homéostasie des cellules immunitaires et de la tolérance périphérique. À ce jour, il y a de plus en plus des études qui ont attribué un rôle pro-inflammatoire au FasL dans les différents modèles, comme la prolifération des cellules T ou l'activation de $\text{NF}\kappa\text{B}$.

Mon projet de thèse consiste à étudier le rôle de FasL sur les cellules myéloïdes dans différentes conditions pathologiques comme cancer et l'inflammation. Les objectifs de mon travail sont :

- (I) Identifier le rôle de FasL sur l'homéostasie de différentes population des cellules myéloïdes
- (II) Etudier l'implication de FasL dans la réponse anti-tumorale (cas de carcinome de poumon LL2) et disséquer les mécanismes associés de ce rôle
- (III) Etudier le rôle de FasL dans un modèle d'inflammation murin (Injection de thioglycolate 3%)

Chapitre 3

Résultats

3.1 La déficience en FasL n’affecte pas la différenciation et la maturation des cellules myéloïdes

La déficience de FasL ou de son récepteur est caractérisée par l’accumulation des cellules hématopoïétiques en périphérie. Dans le compartiment lymphoïde, cette accumulation se caractérise par une amplification des lymphocytes B et T et l’émergence de la population anormale de lymphocytes T qui sont $CD3^+CD4^-CD8^-$ (Steinberg et al., 1980; Adachi et al., 1993; Karray et al., 2004). Par contre, nos connaissances sur le rôle de FasL dans l’homéostasie des différentes populations de cellules myéloïdes sont fragmentaires. Nous avons donc examiné, par cytométrie en flux, la répartition des populations myéloïdes dans la moelle osseuse et dans les organes lymphoïdes périphériques (Rate et Sang) des souris *Fasl KO* et leurs contrôles, les souris ayant le gène *Fasl* bordé de deux sites loxP (souris *Fasl^{fl/fl}*).

3.1.1 Répartition cellulaire dans la moelle osseuse.

Les cellules myéloïdes sont préparées à partir des fémurs de souris adultes (7-8 semaines d’âge) et marquées avec des anticorps spécifiques de chaque population cellulaire. Les résultats de la Figure 3.1A montrent trois populations. Une population majeure de cellules $Gr1^+CD11b^+$, qui sont des cellules immatures et qui se différencient en périphérie en neutrophiles, macrophages et cellules dendritiques. Parmi ces cellules, on distingue une sous population majeure (50%) caractérisée par l’expression de $Gr1^{high}Ly6G^+$ (les progéniteurs des neutrophiles) et une sous population mineure qui est $Gr1^{low}Ly6C^+CD115^+$ (Figure 3.1B). Les deux autres populations sont des monocytes, $Ly6C^+$ (5%) et les macrophages $F480^+$ (20%). Le pourcentage et le nombre absolu (Figure 3.1C) de ces différentes populations sont identiques chez les souris *Fasl KO* et les souris *Fasl^{fl/fl}*, soulignant que la signalisation Fas/FasL n’a aucun rôle dans l’hématopoïèse des cellules myéloïdes au niveau central.

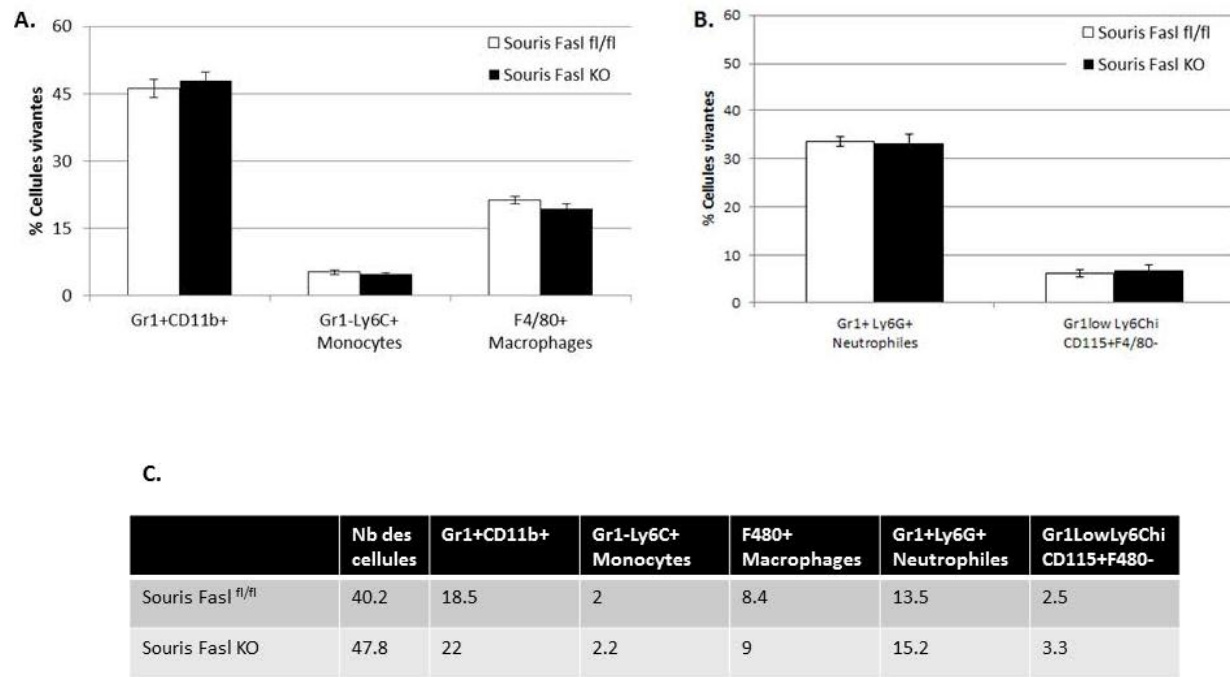


FIGURE 3.1 – L'homéostasie des cellules dans la moelle osseuse est indépendante de FasL. A. Analyse par cytométrie en flux des cellules myéloïdes dans la moelle osseuse des souris naïves *FasL* KO (noir) et *FasL^{fl/fl}* (blanc). B. Les sous-populations des cellules Gr1⁺CD11b⁺. Les pourcentages ont été déterminés au sein des cellules vivantes. C. La répartition des cellules myéloïdes en nombre absolu (Millions). Les données sont issues de 3 expériences indépendantes (n=8).

3.1.2 Différenciation et maturation des cellules myéloïdes

Nous avons examiné par la suite la différenciation des cellules de la moelle osseuse en monocytes et macrophages chez les souris *Fasl* *KO* et les souris *Fasl*^{*fl/fl*}. Cette différenciation est dépendante de GM-CSF et de M-CSF qui sont produits par différents types cellulaires dont les cellules T activées, les fibroblastes et certaines cellules tumorales (Falk et al., 1988). Nous avons ainsi mis en culture les cellules de la moelle osseuse provenant de souris *Fasl* *KO* et de souris *Fasl*^{*fl/fl*} en présence de M-CSF (5 ng/ml) ou de GM-CSF (5 ng/ml) pendant 7 jours. Au terme de cette période, nous avons, d'une part, examiné la répartition des différentes populations cellulaires sur la base de l'expression de Ly6C, F480 et CD115, et d'autre part, induit la maturation de ces cellules en présence d'IL-4 ou de LPS pendant 48h. Comme indiqué dans la Figure 3.2A, nous distinguons une population de monocytes définie par l'expression de Ly6C et une population des macrophages matures (CD115⁺F480⁺). La population monocyttaire est subdivisée en deux sous populations : Ly6C⁺CD115⁻ et Ly6C^{high}CD115⁺. Cette répartition phénotypique est identique en présence de M-CSF ou de GM-CSF, mais à des proportions différentes. En effet, en présence de GM-CSF, nous observons 30% de cellules Ly6C⁺CD115⁻ contre 11% de cellules Ly6C⁺CD115⁺ (Figure 3.2B). Alors qu'en présence de M-CSF la population monocyttaire Ly6C⁺ est répartie en 50% de cellules CD115⁺ et 50% de cellules CD115⁻ (Figure 3.2C). Nos résultats montrent que la différenciation des cellules myéloïdes est similaire chez les souris *Fasl* *KO* et les souris *Fasl*^{*fl/fl*} indiquant que FasL n'a pas de rôle dans la différenciation des cellules myéloïdes.

Afin de déterminer si l'expression de FasL affecte la maturation des cellules myéloïdes, nous avons traité ces cellules différenciées par LPS (10 ng/ml) et IL-4 (10 ng/ml), qui sont impliqués dans la polarisation des macrophages vers le phénotype M1 et M2 respectivement (Mosser and Edwards, 2008). Le phénotype et la polarisation de ces cellules ont été définis après 48h de culture par l'analyse de l'expression de marqueurs membranaires, la production d'IL-12, la production de *NO* et l'activité arginase. Le traitement par LPS des cellules myéloïdes FasL⁺ et FasL déficientes différenciées en présence de M-CSF ou GM-CSF aboutit

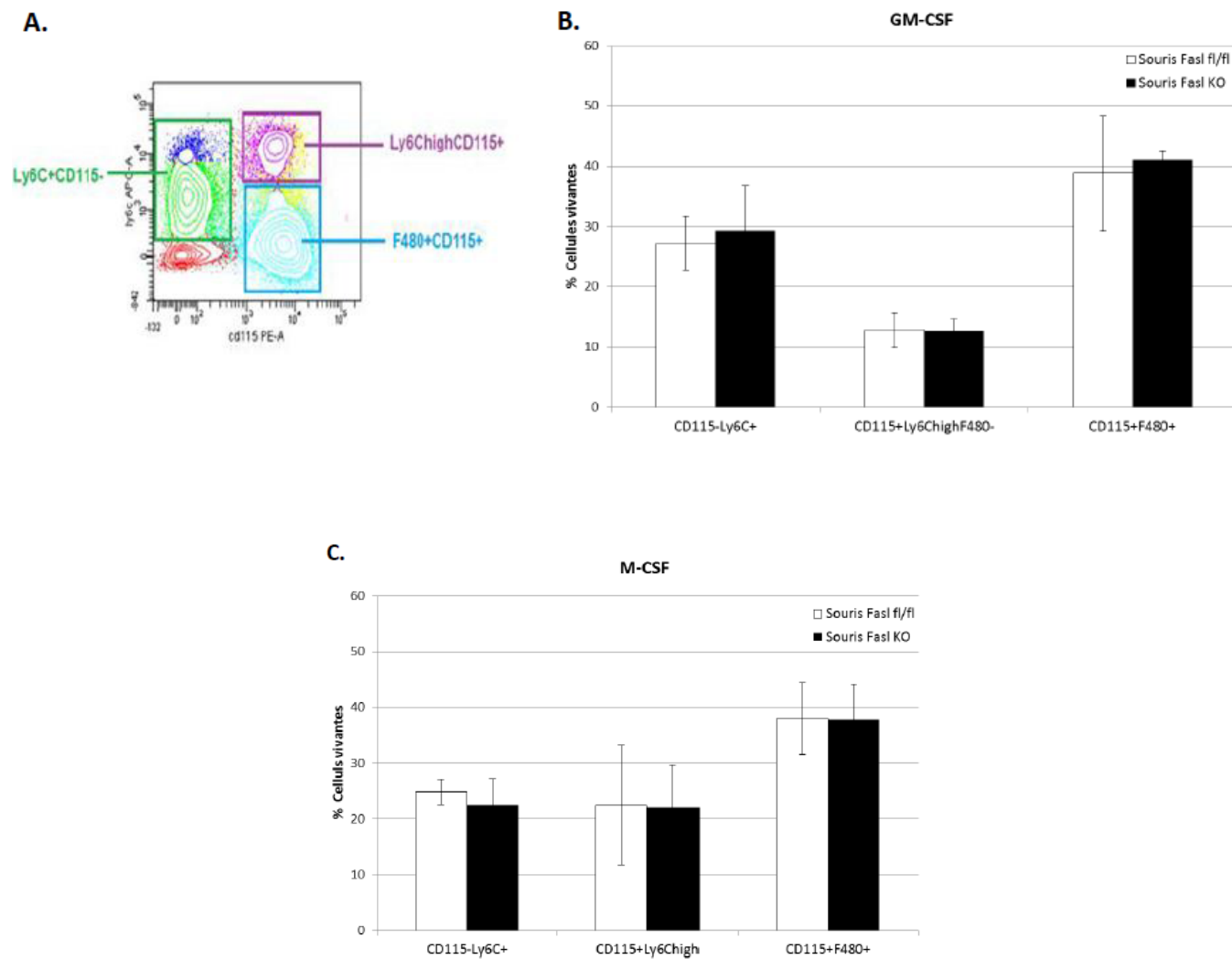


FIGURE 3.2 – La différenciation des macrophages est indépendante de FasL. Les cellules de moelle osseuse des souris *FasL^{fl/fl}* et *FasL KO* cultivées en présence de GM-CSF (5 ng/ml) ou de M-CSF (5 ng/ml) pendant 7 jours. A. Dot-plot identifiant les 3 sous-populations. B-C. Pourcentage de ces populations en présence de GM-CSF (5 ng/ml) ou M-CSF (5 ng/ml). Les pourcentages ont été déterminés au sein des cellules vivantes. Les données sont issues de 2 expériences indépendantes.

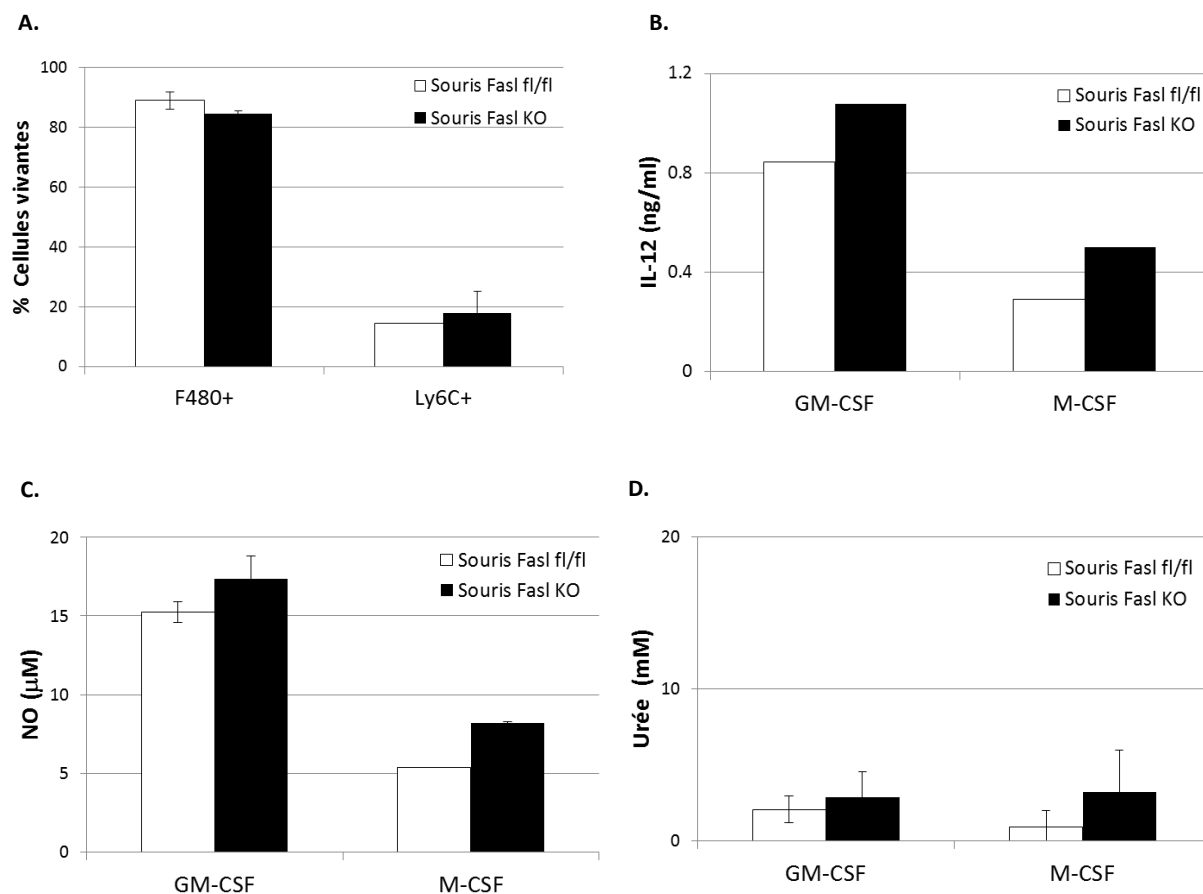


FIGURE 3.3 – Maturation des macrophages in vitro en présence de LPS n'est pas régulée par FasL. A. Analyse par cytométrie en flux des populations des macrophages différenciés par GM-CSF ou M-CSF (7 Jours) et traités pendant 48h avec LPS (10 ng/ml). Les pourcentages ont été déterminés au sein des cellules vivantes. B. La production d'IL-12 par ELISA. C. La production de NO réalisé par Greiss reagent. D. Mesure d'activité arginase. Les données sont issues de 2 expériences indépendantes.

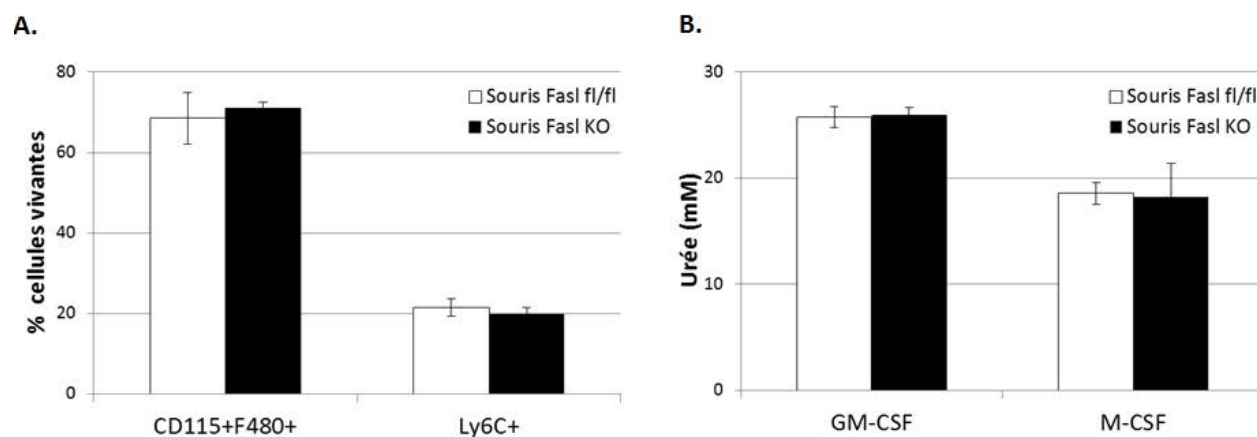


FIGURE 3.4 – Maturation des macrophages in vitro en présence d’IL-4 n’est pas régulée par FasL. A. Analyse par cytométrie en flux des populations des macrophages différenciés par GM-CSF ou M-CSF (7 Jours) et traités pendant 48h avec IL-4 (10 ng/ml). Les pourcentages ont été déterminés au sein des cellules vivantes. B. Mesure de l’activité arginase des cellules traitées par IL-4. Les données sont issues de 2 expériences indépendantes.

à leur maturation en macrophages $F4/80^+$ principalement (Figure 3.3A). Ces macrophages montrent une forte production d’IL-12 et *NO* et une faible activité arginase (Figure 3.3B-D). Ce phénotype caractérise les macrophages de type M1 et il est plus prononcé lorsque les cellules myéloïdes sont différenciées en présence de GM-CSF.

Le traitement par IL-4 des cellules myéloïdes $FasL^+$ et *FasL* déficientes différenciées en présence de GM-CSF ou M-CSF aboutit aussi à la maturation de cellules en macrophages $F4/80^+$. Mais à l’inverse du traitement par LPS, ces macrophages sont toutes $CD115^+$ (Figure 3.4A), expriment une forte activité arginase (Figure 3.4B) et ne produisent pas d’IL-12 ni du *NO*. Ce profil des macrophages relève d’un phénotype de type M2.

Dans cette maturation, nous n’observons aucune différence entre les souris *FasL^{fl/fl}* et les souris *FasL KO* démontrant que FasL n’intervient pas dans l’orientation des macrophages in vitro. En conclusion l’ensemble de ces résultats montre que FasL n’intervient ni dans le processus de différenciation ni de maturation et d’orientation des macrophages in vitro.

3.2 L'homéostasie des cellules myéloïdes en périphérie est régulée par la voie de Fas/FasL

Les travaux antérieurs de l'équipe ont montré que l'homéostasie des cellules dendritiques est altérée lorsque le gène *Fasl* est invalidé dans les cellules T (Mabrouk et al., 2008). Nous avons alors examiné de façon fine et détaillée le rôle de FasL sur l'homéostasie des autres populations de cellules myéloïdes. Pour cela, nous avons examiné par cytométrie en flux la répartition des cellules myéloïdes dans la rate et dans la circulation sanguine chez les souris *Fasl KO* et les souris *Fasl^{fl/fl}* adultes en utilisant les mêmes marqueurs précédemment décrits.

3.2.1 Répartition des différentes populations myéloïdes dans le sang

Les différentes populations des cellules myéloïdes se différencient à partir des progénitures communes de la moelle osseuse et circulent via le sang vers les organes lymphoïdes périphériques pour aboutir à leur maturation en neutrophiles, macrophages ou les cellules dendritiques. Dans le sang des souris naïves, nous distinguons une population granulocytaire majeure $\text{Gr1}^+\text{CD11b}^+$, une population monocyttaire Ly6C^+ et des macrophages F480^+ (Figure 3.5A). Chez les souris *Fasl KO*, les trois populations des cellules myéloïdes sont significativement augmentées en comparaison avec les souris *Fasl^{fl/fl}* de même âge (Par exemple; en moyenne 9% des cellules $\text{Gr1}^+\text{CD11b}^+$ chez les souris *Fasl^{fl/fl}* et 14% chez les souris *Fasl KO*; P-value <0,05). La caractérisation fine de la population $\text{Gr1}^+\text{CD11b}^+$ révèle une subdivision en deux sous populations : les neutrophiles Ly6G^+ et une population monocyttaire $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ qui exprime aussi CD115 (Figure 3.5B). Cette subdivision démontre que la signalisation de FasL régule principalement l'homéostasie des neutrophiles.

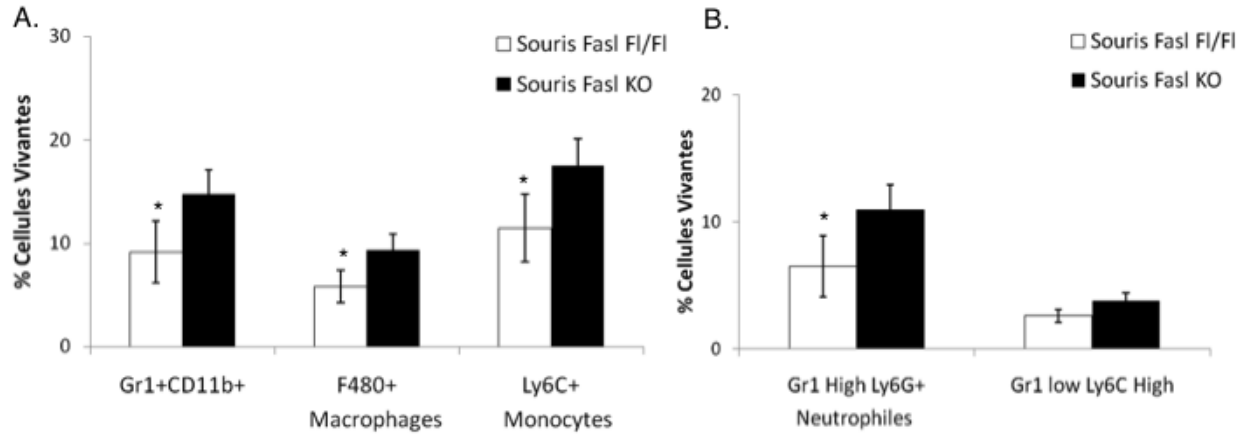


FIGURE 3.5 – L'homéostasie des cellules myéloïdes dans le sang est régulée par FasL. A. Analyse par cytométrie en flux des cellules myéloïdes des souris naïves *FasL KO* (noir) et *FasL^{fl/fl}* (blanc). B. Sous-populations des cellules Gr1⁺CD11b⁺. Les pourcentages ont été déterminés au sein des cellules vivantes. Les données sont issues de 3 expériences indépendantes (n=8). Le test statistique utilisé est "Student T-test" (*, $P - value < 0.05$)

3.2.2 Répartition des différentes populations myéloïdes dans la rate

Dans la rate de souris naïves *FasL KO* et des souris *FasL^{fl/fl}*, on retrouve les mêmes populations de cellules myéloïdes que dans le sang : une population granulocytaire Gr1⁺CD11b⁺, des macrophages F480⁺ et des monocytes Ly6C simples positives (Ly6C⁺). Parmi ces trois populations, seulement les pourcentages des granulocytes Gr1⁺CD11b⁺ et des monocytes Ly6C⁺ sont significativement augmentés dans les rates des souris *FasL KO* en comparaison avec les souris *FasL^{fl/fl}* (Figure 3.6A). Chez les souris *FasL KO*, l'augmentation du pourcentage de la population Gr1⁺CD11b⁺ (6% contre 3.4% chez les souris *FasL^{fl/fl}*) se traduit par une augmentation de la sous population monocyttaire Gr1⁺Ly6C^{high} (Figure 3.6B).

L'analyse détaillée des macrophages a montré que la majorité des macrophages expriment CD115 (Donnés non-montrés). Aucune différence significative n'a observée dans le pourcentage de la population des macrophages F480⁺ entre les souris *FasL KO* et les souris *FasL^{fl/fl}* ;

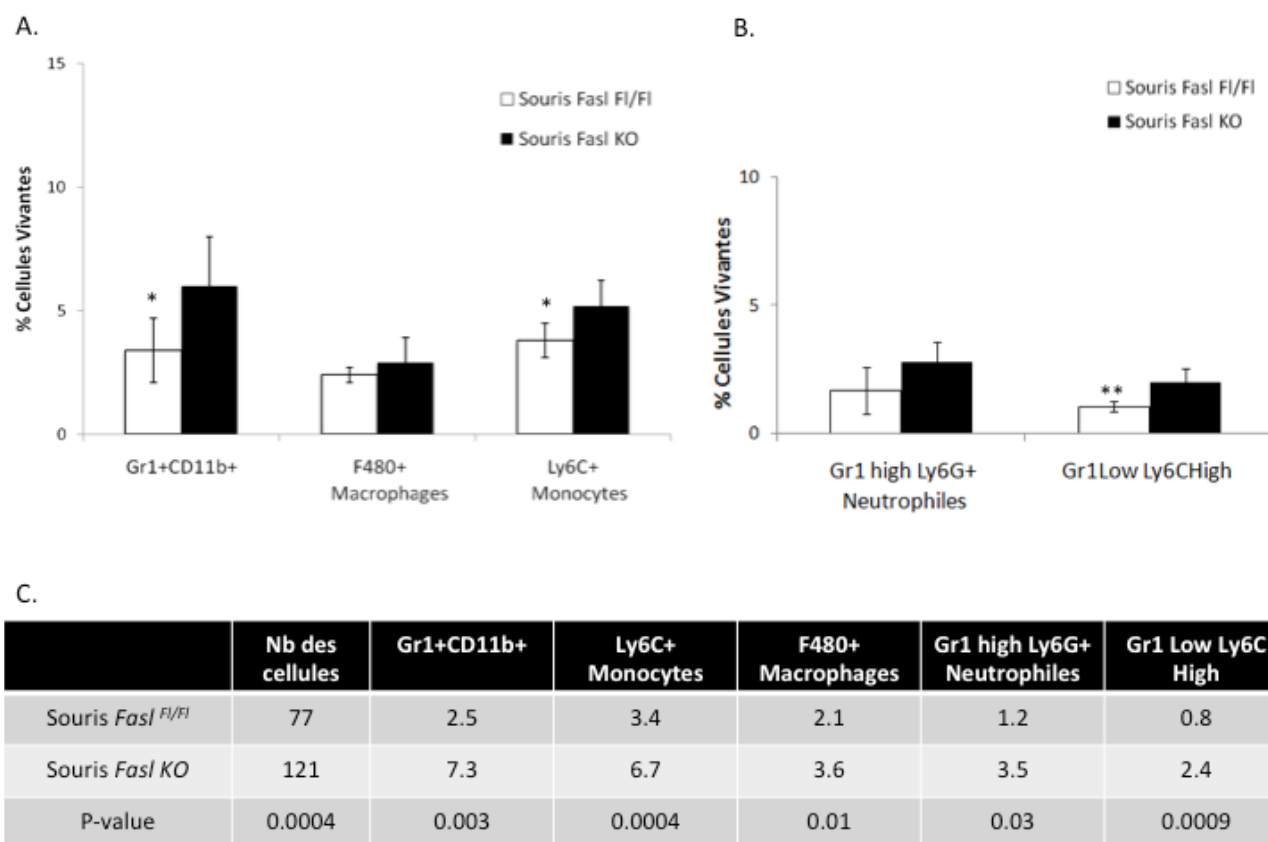


FIGURE 3.6 – L'homéostasie des cellules myéloïdes dans la rate est régulée par FasL. A. Analyse par cytométrie en flux des différentes populations de cellules myéloïdes dans la rate de souris *FasL*^{FI/FI} (blanc) et *FasL*^{KO} (noir). B. Les sous-populations des cellules Gr1⁺CD11b⁺. C. Nombre absolu des différentes populations (en millions de cellules). Les pourcentages ont été déterminés au sein des cellules vivantes. Les données sont issues de 3 expériences indépendantes (n=8). Le test statistique utilisé est "Student T-test" (*, $P - value < 0.05$; **, $P - value < 0.005$)

pourtant, comme montré dans la figure 3.6C, cette différence est significative quand le pourcentage est reporté au nombre total des splénocytes. Les souris *Fasl KO* montrent une splénomégalie en comparant avec les souris *Fasl^{fl/fl}* et donc, d'une façon générale, le nombre total de toutes les sous populations des cellules myéloïdes identifiées dans la rate est amplifié chez les souris *Fasl KO* par rapport aux souris *Fasl^{fl/fl}*.

En conclusion, FasL est crucial pour l'homéostasie des cellules myéloïdes en périphérie, notamment les cellules Gr1⁺CD11b⁺. Mais, de façon intéressante, cette homéostasie dépendante de FasL n'affecte pas les mêmes populations dans la rate et dans le sang.

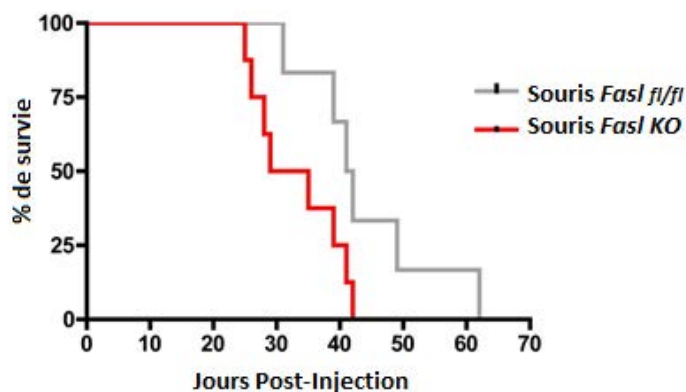


FIGURE 3.7 – La survie des souris porteuses de tumeur est affectée par la présence de FasL. Les courbes de survie des souris *FasL KO* et les souris *FasL^{fl/fl}* sont représentées (n=10). 200,000 cellules tumorales de carcinome de poumon (LL2) ont été injectées en i.v. à des souris *FasL KO* et *FasL^{fl/fl}* (P-value < 0.05)

3.3 Inefficacité de la réponse anti-tumorale chez les souris *FasL KO*

Il est important de souligner que l'accumulation des cellules hématopoïétiques chez les souris *FasL KO* ne conduit pas, même à un âge tardif, au développement de tumeurs spontanées (Karray et al., 2004). Nous avons donc examiné la conséquence de cette homéostasie dépendante de FasL sur les réponses anti tumorales en analysant la survie des souris transplantées par des cellules de carcinome de poumon LL2. Pour cela, nous avons injecté par voie intraveineuse des cellules LL2 (200,000 cellules) à des souris *FasL KO* et des souris *FasL^{fl/fl}* (n=10 par génotype) et avons contrôlé la survie des souris sur une période de 2-3 mois. Les résultats présentés dans la Figure 3.7 montrent que la mortalité des souris *FasL KO* débute à J22 post injection alors que celle des souris *FasL^{fl/fl}* commence plus tardivement à J30. Cette mortalité précoce se traduit par une réduction significative de la survie des souris *FasL KO* en comparaison avec les souris *FasL^{fl/fl}* (P-value < 0.05). Ce résultat démontre le rôle de FasL dans le contrôle des réponses anti tumorales in vivo.

3.3.1 Répartition des cellules immunitaires dans la rate

Afin de déterminer les bases cellulaires de l'inefficacité de la réponse anti tumorale dépendante de FasL, Nous avons choisi un mode d'injection de cellules tumorales en sous cutanée et une cinétique à J21-23 post injection pour différentes raisons, notamment une raison d'ordre pratique. Le choix de la cinétique est basée sur les données de la Figure 3.7. À cette cinétique, nous observons un début de mortalité des souris *Fasl KO* qui est corrélée avec un début d'apparition des nodules dans les poumons. Lorsque les cellules tumorales sont injectées en sous-cutanée, le volume tumoral atteint à J21-23 est de 500-600 mm³ pour les deux génotypes de souris. Pour des raisons d'éthique, nous avons conservé cette cinétique même si nous n'observons pas d'un contrôle de la croissance tumorale dépendant de FasL.

Nous avons alors examiné par cytométrie de flux la répartition des différentes populations myéloïdes dans nos souris mobilisées par la tumeur LL2. Ainsi, nous distinguons trois populations majeures : une population Gr1⁺, les macrophages F480⁺ et les monocytes Ly6C⁺Gr1⁻ (Figure 3.8A). En pourcentage et en nombre, les populations Gr1⁺ et macrophages F480⁺ sont sensiblement identiques entre les deux génotypes. Par contre, la population Gr1⁻Ly6C⁺ est significativement augmentée dans la rate des souris *Fasl KO* par rapport aux souris *Fasl^{fl/fl}*. Par ailleurs, une caractérisation fine de la population Gr1⁺ a révélé une différence de répartition entre les populations granulocytaires et monocytaires. En effet, la rate des souris *Fasl^{fl/fl}* se caractérise par une amplification significative en nombre et en pourcentage des cellules Gr1^{high}Ly6G⁺Ly6C^{low}, alors que la rate des souris *Fasl KO* se caractérise par une augmentation significative de la population Gr1^{low}Ly6G⁻Ly6C^{high} (Figure 3.8B,C).

Les cellules Gr1⁺ sont des cellules immatures qui dans une situation physiologique se différencient en macrophages et en cellules dendritiques. Mais dans des situations pathologiques, la différenciation de ces cellules est bloquée et s'accumulent dans les organes périphériques et l'infiltrat tumoral. Ces cellules se divisent en deux sous-populations granulocytaire (PMN-MDSC) et monocytaires (M-MDSC)(Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Bronte and Zanovello,

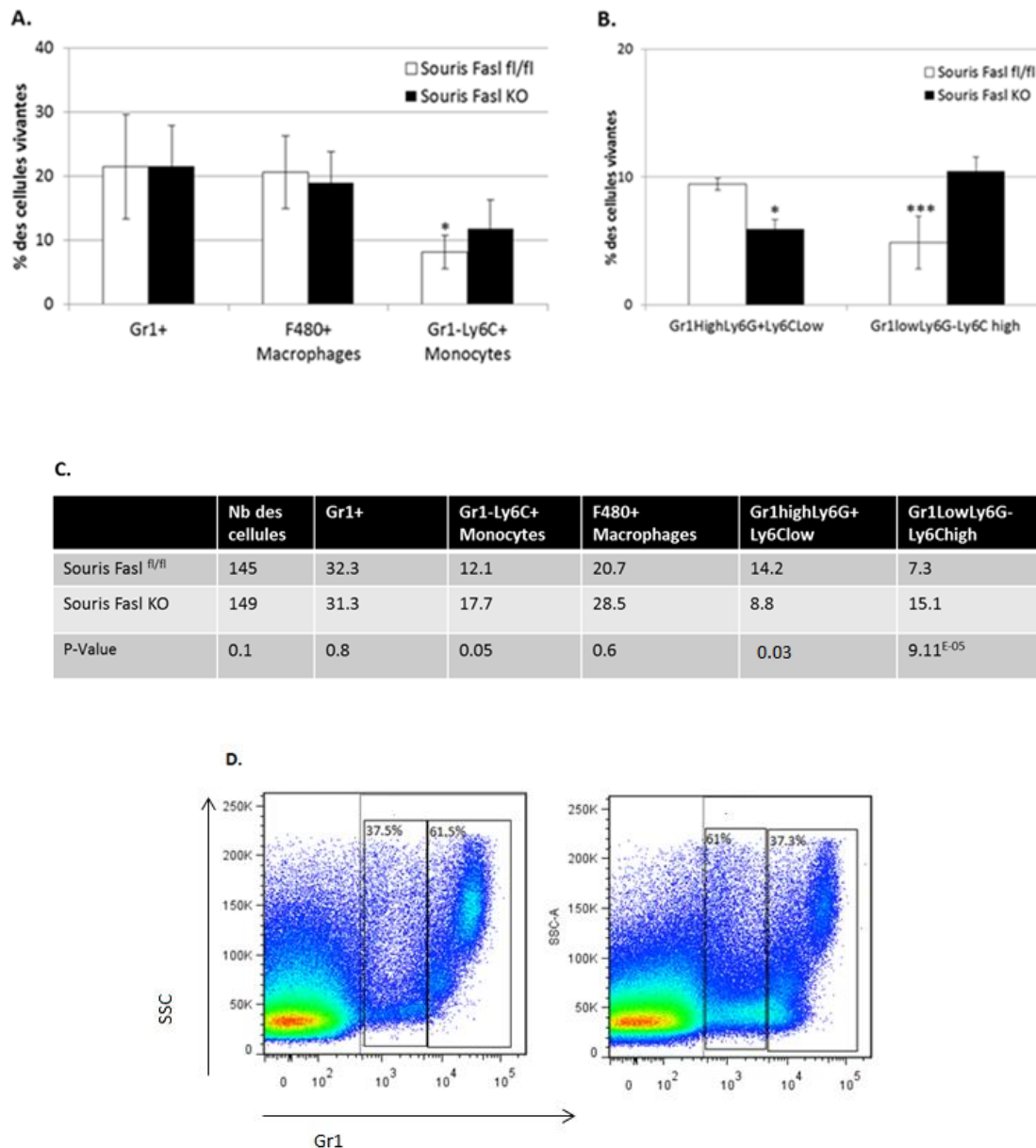


FIGURE 3.8 – FasL régule la répartition des sous-populations des cellules Gr1⁺ dans la rate des souris porteuses de tumeur. A. Analyse par cytométrie en flux des différentes populations de cellules myéloïdes dans la rate de souris *FasL^{fl/fl}* (blanc) et *FasL KO* (noir) porteuses de tumeur LL2 à J21-J23 post-injection. B. Sous-populations des cellules Gr1⁺. C. La répartition des cellules myéloïdes en nombre absolu (en millions de cellules). D. La répartition relative des sous-populations des cellules Gr1⁺ *FasL^{fl/fl}* (Gauche) et *FasL KO* (Droite). Les pourcentages ont été déterminés au sein des cellules vivantes. Les données sont issues de 3 expériences indépendantes (n=15). Le test statistique utilisé est "Student T-test" (*, $P - value < 0.05$; ***, $P - value < 0.0005$)

2005; Rodríguez and Ochoa, 2008). La population PMN-MDSC exprime des niveaux fort de Gr1 (Gr1^{high}) et elles sont Ly6G⁺Ly6C^{low}. M-MDSC sont Gr1^{low}Ly6G⁻Ly6C^{high} (Youn et al., 2013).

Nos données et celles de la littérature (Youn et al., 2013; Movahedi et al., 2008) montrent que, chez une souris sauvage porteuse de tumeur, dans la population Gr1 totale, la proportion en Gr1^{high} (PMN-MDSC) et Gr1^{low} (M-MDSC) est de 60-70% et 30-40% respectivement. De façon intéressante, chez les souris *Fasl KO*, ce rapport est inversé (37% PMN-MDSC contre 61% M-MDSC—Figure 3.8D). Ce résultat intéressant, suggérerait une implication de FasL dans la répartition des sous-populations des cellules Gr1⁺ en faveur des populations granulocytaire.

La répartition des cellules CD4⁺ dans la rate, entre les deux génotypes, reste sensiblement identique. La caractérisation plus détaillée nous a montré une amplification significative des cellules T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ chez les souris *Fasl KO* porteuses de tumeur (Figure 3.9A), alors que chez les souris naïves, la répartition de ces cellules est identique entre les deux génotypes (Figure 3.9B). Cette amplification pourrait contribuer à une immunosuppression plus prononcée chez les souris *Fasl KO* porteuses de tumeur.

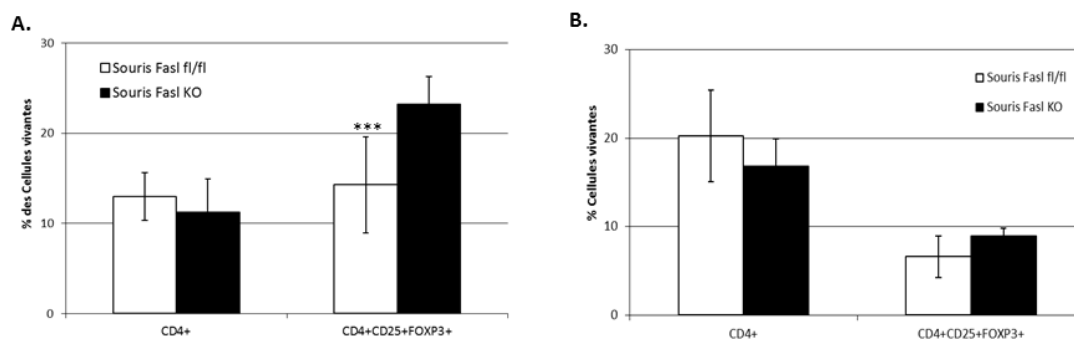


FIGURE 3.9 – Induction des cellules T $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ dans la rate des souris FasL déficientes porteuses de tumeur. A. La répartition des cellules T $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ dans la rate des souris *FasL^{fl/fl}* (blanc) et *FasL KO* porteuses de tumeur. C. La répartition des cellules T $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ dans la rate des souris naïves *FasL^{fl/fl}* et *FasL KO*. Les pourcentages ont été déterminés au sein des cellules vivantes et ciblés dans la population $CD4^+CD25^+$. Les données sont issues de 2 expériences indépendantes ($n=9$). Le test statistique utilisé est "Student T-test" (***, $P - value < 0.0005$).

3.3.2 Répartition des cellules immunitaires dans l'infiltrat tumoral

En parallèle, nous avons examiné la distribution des cellules myéloïdes dans l'infiltrat tumoral de ces souris, particulièrement les cellules $\text{Gr1}^+\text{CD11b}^+$ et les macrophages F480^+ . Nous observons une diminution significative du pourcentage des cellules $\text{Gr1}^+\text{CD11b}^+$ chez les souris *Fasl KO* (26.8% chez les souris *Fasl^{fl/fl}* contre 18.9% chez les souris *Fasl KO* (Figure 3.10A). À l'inverse de la rate, cette diminution correspond principalement à celle des cellules Gr1^{low} qui, comme indiqué dans la Figure 3.10B, sont subdivisées en $\text{F480}^+\text{Ly6C}^+$ (3% chez les souris *Fasl^{fl/fl}* contre 1.9% chez les souris *Fasl KO*) et $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ (6.5% chez les souris *Fasl^{fl/fl}* contre 4% chez les souris *Fasl KO*). La sous population Gr1^{high} représente une population granulocytaire co-exprimant Ly6C et Ly6G (12.7% chez les souris *Fasl^{fl/fl}* contre 9.2% chez les souris *Fasl KO*—Figure 3.10B). Par contre, les macrophages F480 sont significativement augmentés chez les souris *Fasl KO*—13.5% chez les souris *Fasl^{fl/fl}* contre 17.3% chez les souris *Fasl KO*—Figure 3.10A).

À l'inverse des cellules myéloïdes, les cellules lymphoïdes, en l'occurrence les cellules T, leur pourcentage dans l'infiltrat tumoral est très faible chez les deux génotypes (Figure 3.10C). En résumé, nous observons une amplification de la population M-MDSC dans la rate des souris *Fasl KO* et une amplification des macrophages dans l'infiltrat de ces souris, ce qui suggère que les cellules myéloïdes d'origine monocyttaire sont régulées par FasL.

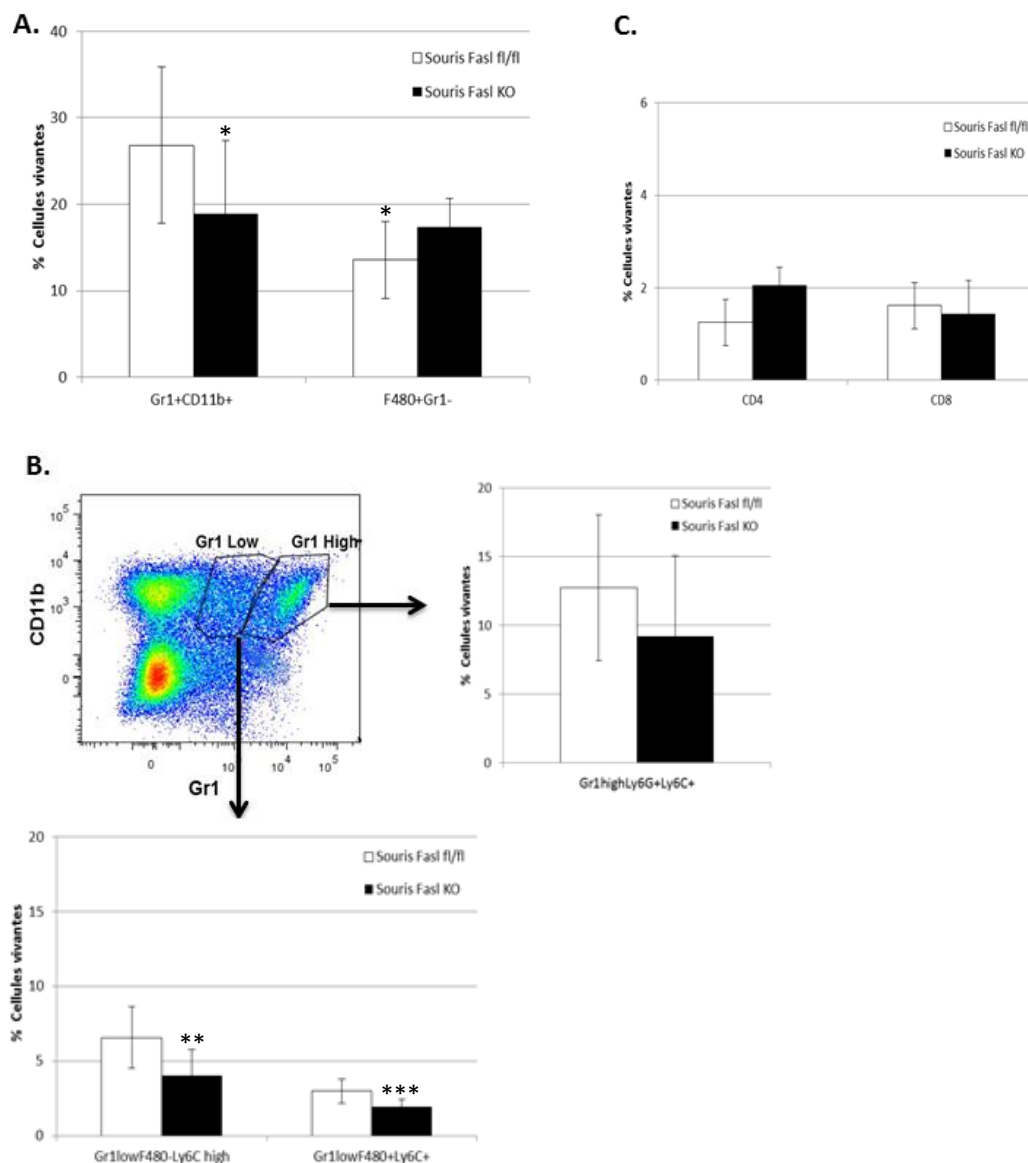


FIGURE 3.10 – Répartition des populations des cellules myéloïdes dans l'infiltrat des souris porteuses de tumeur. A. Analyse par cytométrie en flux des différentes populations de cellules myéloïdes dans l'infiltrat de souris *Fasl*^{fl/fl} (blanc) et *Fasl* KO (noir). B. Les sous-populations des cellules Gr1⁺CD11b⁺. C. La répartition des lymphocytes. Les pourcentages ont été déterminés au sein des cellules vivantes. Les données sont issues de 3 expériences indépendantes (n=15). Le test statistique utilisé est "Student T-test" (*, $P - value < 0.05$; **, $P - value < 0.005$; ***, $P - value < 0.0005$).

3.3.3 Caractérisation fonctionnelle des cellules myéloïdes dans la rate et l'infiltrat.

3.3.3.1 Caractérisation fonctionnelle des cellules Gr1⁺ de la rate

Afin de caractériser les cellules myéloïdes Gr1⁺ sur le plan fonctionnel, nous les avons isolé à partir de splénocytes des souris *Fasl^{fl/fl}* et *Fasl KO* porteuses de tumeur LL2 à J21-J23 post-injection.

3.3.3.1.a Profil génique. Dans un premier temps, nous avons examiné par PCR quantitative en temps réel l'expression des gènes d'IL-10, CCL24, MIP-1 et iNOS relevant de phénotype anti et pro inflammatoire. L'IL-10 est exprimé par des macrophages immunosuppresseurs et les MDSC dans différentes situations inflammatoires. Elle diminue l'activation des cellules présentatrices d'antigènes, la sécrétion de cytokines inflammatoires, dont l'IL-12, et l'expression de molécules de co-stimulation (O'Garra and Murphy, 2009). CCL24 est un chimiokine, secrété principalement par les macrophages M2 et les MDSC, augmente le recrutement des cellules Th2 et les cellules T régulatrices lors d'une réponse pro-tumorale (Biswas and Mantovani, 2010). MIP-1 est une chimiokine pro-inflammatoire produite par les cellules myéloïdes. iNOS qui est exprimé dans les macrophages suite à leur activation par les endotoxines ou les cytokines pro inflammatoires et la production de *NO* aide à l'élimination des pathogènes (Peterson et al., 2005). Les résultats obtenus montrent que les cellules Gr1⁺ issues des souris *Fasl KO* sur-expriment les gènes immunosuppresseurs (IL-10 et CCL24) et sous-expriment MIP-1 et iNOS qui sont des gènes pro-inflammatoires (Figure 3.11). Le profil d'expression de ces gènes suggère un phénotype immunosuppresseur prononcé des cellules myéloïdes Gr1⁺ déficientes en FasL.

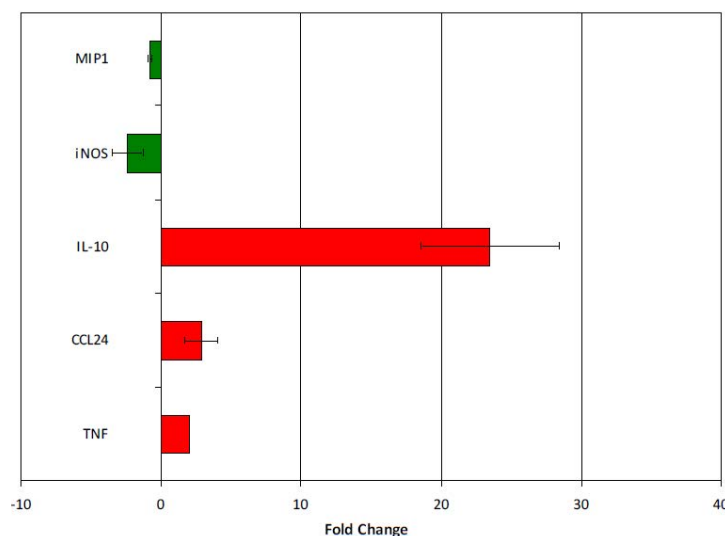


FIGURE 3.11 – Les cellules Gr1^+ FasL déficientes sur expriment les gènes anti-inflammatoires. Profil d’expression des gènes pro et anti-inflammatoires des cellules Gr1^+ *Fasl* KO par rapport aux cellules Gr1^+ *Fasl*^{fl/fl}, triées à partir de la rate des souris *Fasl*^{fl/fl} et *Fasl* KO, analysées par Q-PCR. Les données sont issues de 2 expériences indépendantes.

3.3.3.1.b Activité immunosuppressive des cellules Gr1^+ . L’immunosuppression induite par ces cellules implique différents mécanismes dont la production d’urée, de NO et ROS. Le dosage de NO dans les surnageants de co-cultures de cellules Gr1^+ et splénocytes activés par anti-CD3 montre que ces cellules Gr1^+ sont dépourvue d’activité iNOS. Par ailleurs, la mesure de l’activité arginase de ces cellules, à T0 ou au terme d’une co-culture de trois jours avec des splénocytes activés par anti-CD3, est nulle. Par contre, nous observons une production de ROS par ces cellules (Figure 3.12). Mais, chez les souris *Fasl* KO cette production est nettement plus faible que celle des souris *Fasl*^{fl/fl} (8666 moyenne d’intensité de fluorescence pour les cellules Gr1^+ *Fasl*^{fl/fl} et 2601 pour les cellules Gr1^+ FasL déficientes. Les cellules Gr1^{high} sont décrites comme la principale source de ROS (Youn et al., 2012). Par conséquent, la faible production de ROS par les cellules Gr1^+ FasL déficientes, corrèle bien avec le faible pourcentage de cellules Gr1^{high} observé dans la rate des souris *Fasl* KO porteuses de tumeur.

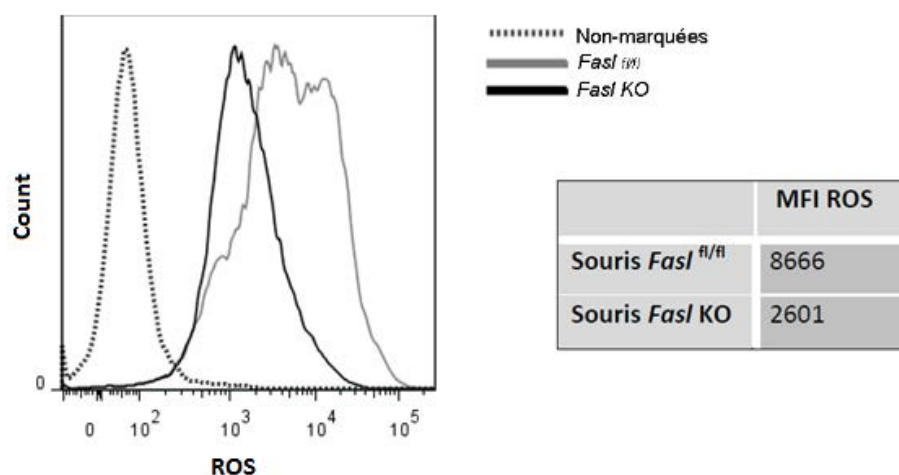


FIGURE 3.12 – Les cellules Gr1^+ issues des souris *FasL* déficientes montrent plus faible activité ROS par rapport aux souris *FasL*^{fl/fl}. L'activité ROS produite par les cellules Gr1^+ triées de la rate des souris porteuses de la tumeur LL2 (J21-23). Les données sont issues de 2 expériences indépendantes.

Afin de tester si cette production de ROS conduit à une fonction immunosuppressive, nous avons mis ces cellules Gr1^+ en culture à différents rapports en présence de splénocytes activés par anti-CD3 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La prolifération des cellules T a été déterminée par un test d'incorporation de BrdU au bout de 3 jours de culture. Comme indiqué sur la Figure 3.13, ces cellules Gr1^+ n'inhibent pas la prolifération des cellules T activées. Cette absence d'inhibition pourrait être associée à la méthode d'activation des cellules T. En effet, certaines données montrent que les cellules Gr1 issues de la rate n'induisent une fonction inhibitrice que lorsque les cellules T sont activées de façon dépendante de l'antigène (Corzo et al., 2010; Movahedi et al., 2008; Youn et al., 2012). Alternativement, la seule production de ROS ne suffit pas à induire une activité suppressive.

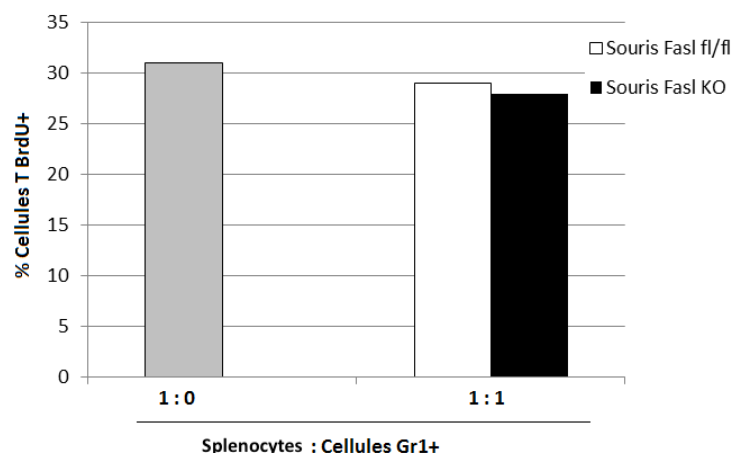


FIGURE 3.13 – Les cellules Gr1⁺ n’inhibent pas la prolifération des splénocytes activées de façon non-spécifique. La prolifération des Splénocytes activées par anti-CD3 (5 μ g/ml) en présence des cellules Gr1⁺ *FasL^{fl/fl}* et *FasL^{-/-}*. Les données sont issues de 2 expériences indépendantes.

3.3.3.2 Caractérisation fonctionnelle des cellules myéloïdes de l’infiltrat

Les infiltrats tumoraux des souris *FasL^{fl/fl}* et *FasL KO* sont enrichis en macrophages Gr1⁻F480⁺ et en cellules Gr1⁺. Nous avons alors isolé ces deux populations et analysé leur fonction en mesurant l’activité arginase, l’activité iNOS et leur capacité à inhiber la prolifération des splénocytes activés par anti CD3.

3.3.3.2.a Les cellules Gr1⁺. Les résultats très préliminaires montrent que, inversement à la rate, les cellules Gr1⁺, de l’infiltrat, indépendamment de génotype, sont capables d’inhiber la réponse proliférative des splénocytes activés par anti-CD3 (Figure 3.14).

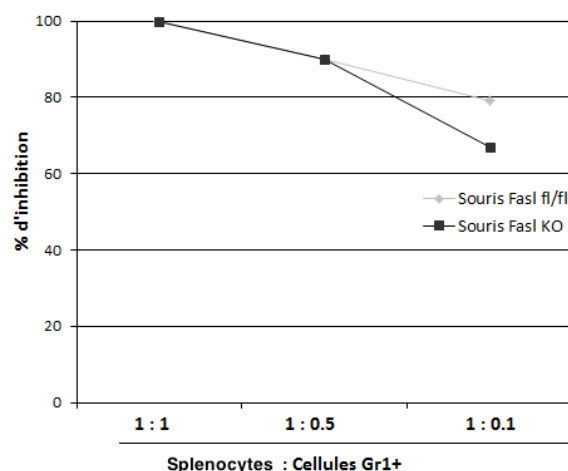


FIGURE 3.14 – Les cellules Gr1⁺ issues l'infiltrat tumoral inhibent la prolifération des splénocytes activées de façon non-spécifique. La prolifération des splénocytes en présence des cellules Gr1⁺ issues de l'infiltrat des souris porteuses de tumeur *FasL^{fl/fl}* et *FasL KO* (MTT).

3.3.3.2.b Les macrophages. Les macrophages F480⁺Gr1⁻ issus de l'infiltrat ont une forte activité arginase qui est similaire pour les deux génotypes (Figure 3.15A). Ces macrophages, indépendamment du génotype, ne produisent pas de *NO*. Mais, lorsqu'ils sont mis en présence de splénocytes activées par anti CD3, ils montrent une activité iNOS par une production de *NO* (Figure 3.15B). Cette double activité enzymatique de ces macrophages est corrélée à leur capacité à inhiber la réponse proliférative des splénocytes activés par anti-CD3 (Figure 3.15C).

L'ensemble de ces données suggère que l'enrichissement de l'environnement tumoral en macrophages immunosuppresseurs pourrait, parmi d'autres mécanismes, contribuer à l'inefficacité de la réponse anti tumorale et la réduction de survie des souris *FasL KO*.

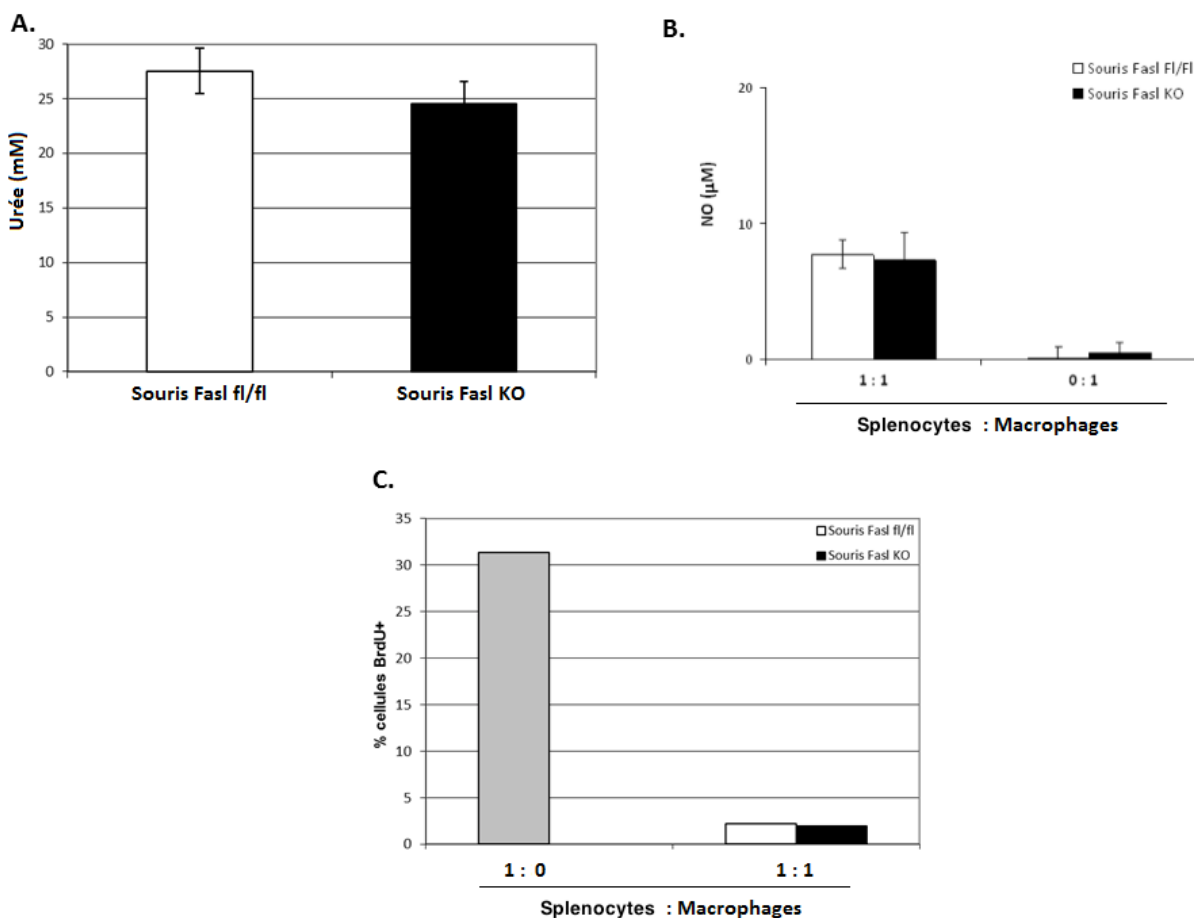


FIGURE 3.15 – Les macrophages d’infiltrat inhibent la prolifération des Splénocytes activées par anti-CD3. A. Mesure d’activité arginase des macrophages isolés à partir de l’infiltrat des souris *Fasl^{fl/fl}* et les souris *Fasl KO*. B. Le test de la production de NO réalisé par Greiss reagent. C. La prolifération des Splénocytes activées par anti-CD3 (5 μg/ml) en présence des macrophages, a été mesurée par le test d’incorporation de BrdU.

3.4 Rôle pro-inflammatoire de FasL dans un modèle d'inflammation expérimentale

Afin de déterminer si l'accumulation des cellules myéloïdes suppressives chez les souris déficientes en FasL est spécifique d'un environnement tumoral ou le reflet d'un état inflammatoire, nous avons étudié le rôle de FasL dans un modèle murin d'inflammation péritonéale induite par le thioglycolate. Le milieu thioglycolate déclenche certaines réactions non enzymatiques entre les protéines et les sucres présents dans le milieu ce qui conduit à la production des « advanced glycation endproducts (AGEs) ». La fixation d'AGE sur son récepteur, qui est exprimé par différents types cellulaires dont les cellules endothéliales, les macrophages et les neutrophiles (Li et al., 1997), conduit à une inflammation (Neeper et al., 1992). L'injection en intra péritonéale d'une solution de thioglycolate à 3% induit, à des cinétiques différentes le recrutement de neutrophiles et macrophages dans le péritoine des souris.

3.4.1 Profil génique des macrophages induit par thioglycolate

L'inflammation induite chez les souris *Fasl KO* et *Fasl^{fl/fl}* trois jours après injection d'une solution de thioglycolate à 3% est caractérisée par un recrutement de cellules CD11b⁺F480⁺. Comme indiqué dans la Figure 3.16A, le nombre total de cellules CD11b⁺F480⁺ recrutées est similaire entre les souris *Fasl KO* et les souris *Fasl^{fl/fl}* (17 million cellules chez les souris *Fasl KO* contre 19.6 millions cellules chez les souris *Fasl^{fl/fl}*). Par la suite, pour une meilleure caractérisation phénotypique de ces cellules, nous avons examiné leur signature génique par un test de Microarray Agilent 56K. Les résultats ont été analysés par des outils bio-informatiques en fixant un « Fold change » supérieur à 2 et la « P-value » inférieure à 0.05. Par cette méthode, nous avons identifié 1875 gènes surexprimés (en rouge) et 1578 gènes sous-exprimés (en vert) dans les souris *Fasl KO* par rapport aux souris *Fasl^{fl/fl}* (Figure 3.16B). Parmi ces gènes différemment exprimés, nous avons sélectionné ceux caractéristiques

de phénotype pro ou anti-inflammatoire identifiés plus haut dans la réponse anti tumorale.

Le panneau de droite de la Figure 3.16B montre la comparaison de l'expression de ces gènes chez les souris *Fasl KO* par rapport aux souris *Fasl^{fl/fl}*. Les macrophages *Fasl KO* sur-expriment les gènes de l'IL-10, de l'Arginase 1, de CCL17 et de CCL24 alors que les gènes MIP-1, iNOS et MMP-8 sont sous-exprimés. Ce profil d'expression génique de ces macrophages est relevant d'un phénotype immunosuppresseur de type M2.

Nous avons confirmé ce profil d'expression sur de nouvelles préparations d'ARN de macrophages péritonéaux induits par le thioglycolate provenant des deux génotypes de souris. De plus, l'analyse de l'expression de nouveaux gènes caractéristiques du phénotype pro inflammatoire a montré que les gènes TNF- α et MIP-1 sont sous-exprimés chez les souris *Fasl KO* (Figure 3.16C). Ces données montrent que dans un modèle d'inflammation induit par thioglycolate les macrophages déficients en FasL expriment un phénotype immunosuppresseur nettement plus prononcé en comparaison avec les macrophages *Fasl^{fl/fl}*.

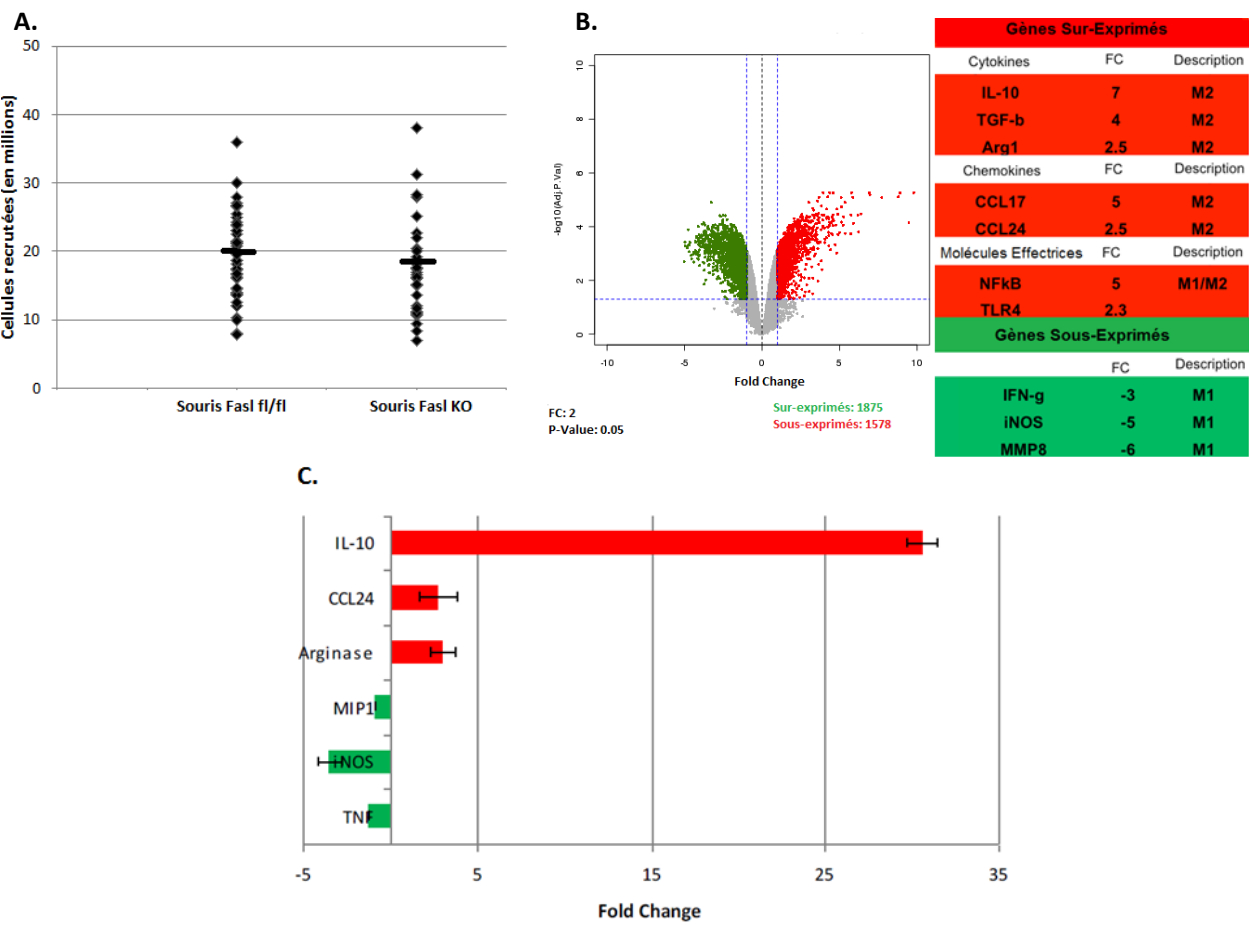


FIGURE 3.16 – Phénotype inflammatoire des macrophages FasL déficients. A. Nombre de cellules recrutées suite à l’injection intra-péritonéale de thioglycolate 3% (n=40; nombre d’expériences > 10). B. Analyse de Microarray des macrophages péritonéaux. Le volcan indique une sur- ou sous- expression des gènes par les macrophages de souris *FasL* KO par rapport aux macrophages de souris *FasL*^{fl/fl}. C. Confirmation de l’expression des gènes caractéristiques des phénotypes pro et anti-inflammatoire des macrophages péritonéaux par Q-PCR.

3.4.2 Caractérisation phénotypique des cellules induites par thioglycolate

Une analyse plus fine du phénotype de ces cellules montre qu'elles sont subdivisées en deux populations ayant une morphologie différente. Une population majeure, de cellules de grande taille (0.2 mm) avec un noyau lobé et un cytoplasme important, est composée de cellules $F480^+$ qui expriment le récepteur au CSF-1 ($CD115$) et le récepteur à l'IL-4 ($F480^+CD115^+IL-4R^+$) (Figure 3.17A). Dans cette population, 30% de ces cellules expriment le marqueur $Ly6C^+$ (Figure 3.17B). Une deuxième population $F480^+Ly6C^+$, mais $CD115^-IL-4R^-$, représente 35% des cellules totaux est composée de cellules de petites tailles avec un gros noyau et un cytoplasme très réduit (Figure 3.17A-B). Ces cellules sont récemment identifiées comme étant des éosinophiles recrutés lors d'une inflammation induite par thioglycolate. Misharin et al. ont montré que les éosinophiles expriment en plus de leur marqueur spécifique (Siglec F) des marqueurs en commun avec des macrophages comme $CD11b$ ou $F480$. La distinction de ces cellules avec les macrophages est basée sur leur intensité d'expression de ces marqueurs. Les éosinophiles sont $SSC^{High}CD11b^{Low}F480^{Low}$, alors que les macrophages péritonéaux sont $CD11b^{High}F480^{Int-High}$ (Misharin et al., 2012). Sur la base de ces études, nous avons considéré que la deuxième population $F480^+$ correspond aux éosinophiles.

Bien que nous n'observons pas de différence sur le nombre total des cellules recrutées entre les deux génotypes de souris, l'analyse de la répartition de ces deux populations sur la base du phénotype décrit plus haut en utilisant un très grand nombre de souris ($n=40$) montre que la proportion de macrophages $F480^+CD115^+IL-4R^+$ est significativement ($P \text{ value} < 0.05$) plus importante chez les souris *Fasl* *KO* en comparaison avec des souris *Fasl*^{*fl/fl*} (Figure 3.18).

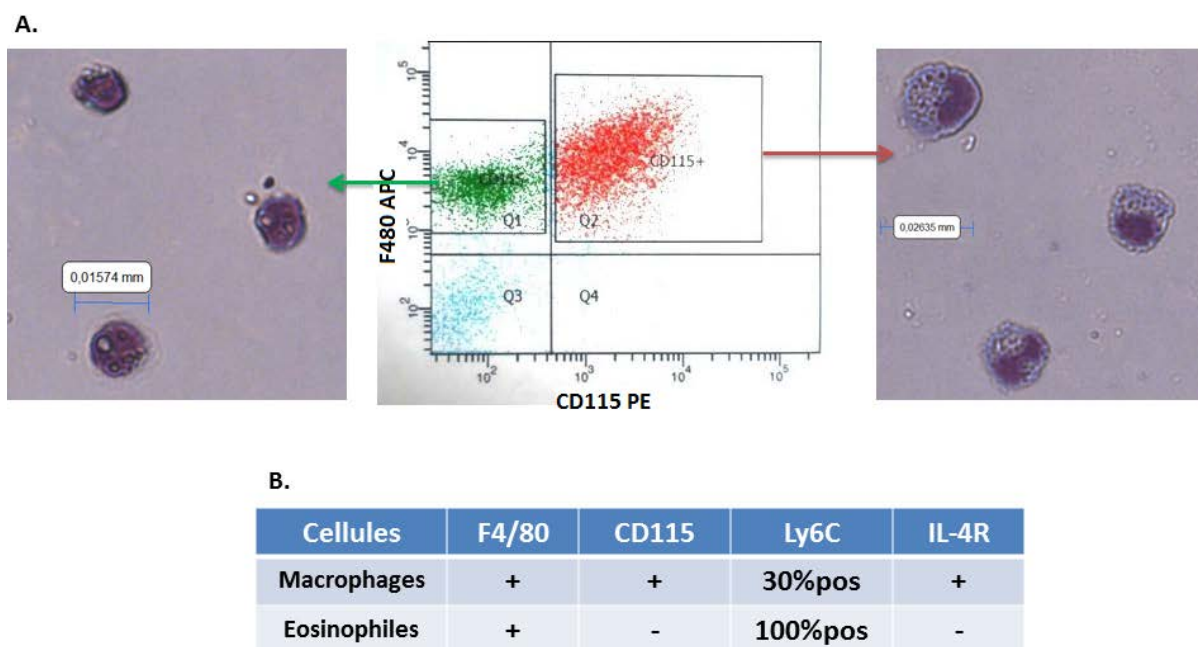


FIGURE 3.17 – Les macrophages recrutés se divisent en deux sous-population, macrophage et éosinophiles. A. Analyse par cytométrie en flux et morphologie des cellules recrutées vers le péritoine à J3 post injection de thioglycolate. Les cellules $F480^{+}CD115^{+}$ et $F480^{+}CD115^{-}$ triées et colorées par Geimsa. B. Le tableau récapitulatif des caractéristiques phénotypiques des macrophages et des éosinophiles. Les pourcentages ont été déterminés au sein des cellules vivantes. Les données sont issues des différentes expériences.

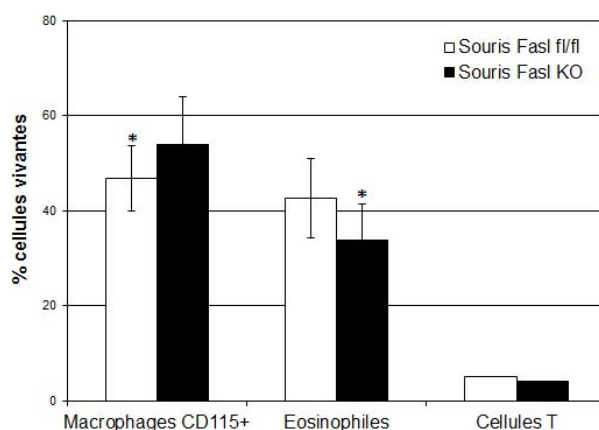


FIGURE 3.18 – Les souris déficientes en FasL accumulent les macrophages $F480^+CD115^+$ à J3 post injection de thioglycolate. L’analyse par cytométrie en flux de phénotype des cellules recrutées vers le péritoine des souris *FasL* $^{fl/fl}$ et *FasL* KO injectées par thioglycolate 3%. Les pourcentages ont été déterminés au sein des cellules vivantes. Les données sont issues à partir de différentes expériences représentant un nombre total de 40 souris par génotype. (*, $P - value < 0.05$)

3.4.3 Caractérisation fonctionnelle des macrophages $F480^+CD115^+$ IL-4R⁺

3.4.3.1 Profil d’expression génique

Afin de mieux caractériser ces macrophages, nous avons examiné leur profil génique par Q-PCR. Pour cela, nous avons trié les macrophages $F480^+CD115^+$ provenant du péritoine de souris *FasL* KO et *FasL* $^{fl/fl}$ traitées par thioglycolate et avons analysé l’expression des gènes CXCL10, iNOS, CCL24, IL-10 et arginase1. Les résultats obtenus montrent que d’une part, les macrophages $F480^+CD115^+IL-4R^+$ ont un phénotype anti-inflammatoire comme le montre la surexpression des gènes IL-10, CCL24 et arginase1 et, d’autre part, le niveau d’expression de ces gènes par les macrophages $F480^+CD115^+IL-4R^+$ déficients en FasL est plus élevé en comparaison aux souris *FasL* $^{fl/fl}$ (Figure 3.19).

Ce profil génique est corrélé par une analyse de l’activité arginase et par la détermination

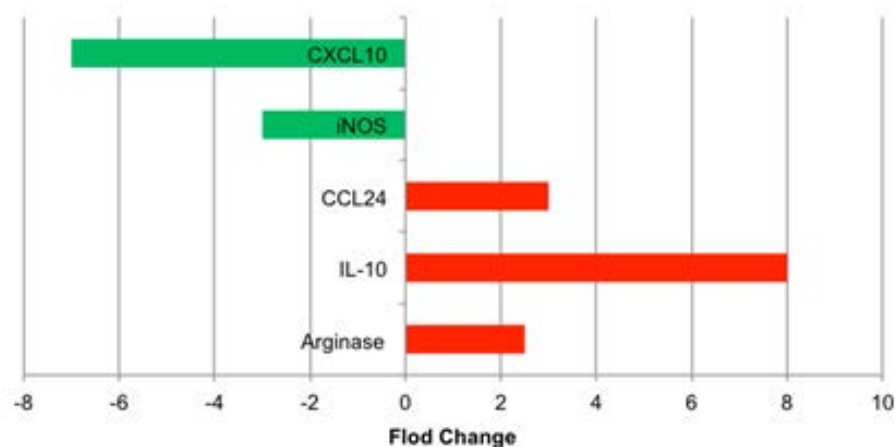


FIGURE 3.19 – Les macrophages $CD115^+$ FasL déficientes montrent un profil génique anti-inflammatoire. Analyse d'expression des gènes caractéristiques des phénotypes pro et anti inflammatoires des macrophages $F480^+CD115^+$ triées issues des souris *FasL* *KO* par rapport les celles issues des souris *FasL*^{fl/fl} par Q-PCR.

de pourcentage macrophages $IL-10^+$. En effet, la figure 3.20 montre que ces macrophages ont une activité enzymatique. Mais, nous ne distinguons pas de différence d'activité entre les deux génotypes. Par contre, lorsque ces cellules sont traitées avec de l'IL-4 (10 ng/ml) pendant 24h, l'activité arginase est particulièrement augmentée lorsque les macrophages sont déficients en FasL (Figure 3.20). Il est important de signaler que les éosinophiles n'ont pas d'activité arginase indiquant que le profil immunosuppresseur des cellules totaux recrutées dans le péritoine (Figure 3.16) correspond à celui des cellules $F480^+CD115^+IL-4R^+$.

Le dosage intracellulaire d'IL-10 a confirmé que la sur expression du gène d'IL-10 observée chez les souris *FasL* *KO* (Figure 3.19) correspond bien à un pourcentage plus élevé de macrophages $IL-10^+$ lors que les cellules sont déficientes en FasL par rapport aux macrophages $FasL^+$ (Figure 3.21).

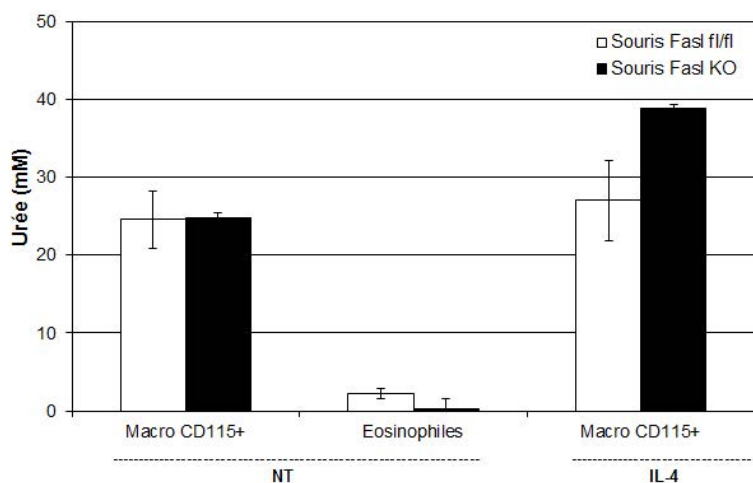


FIGURE 3.20 – Les macrophages $F480^+CD115^+IL-4R^+$ montrent une forte activité arginase. Mesure de la production d'urée par les macrophages $CD115^+$, en présence ou en absence d'IL-4 (10 ng/ml) pendant 24h, et par les éosinophiles. Les données sont issues de 2 expériences différentes.

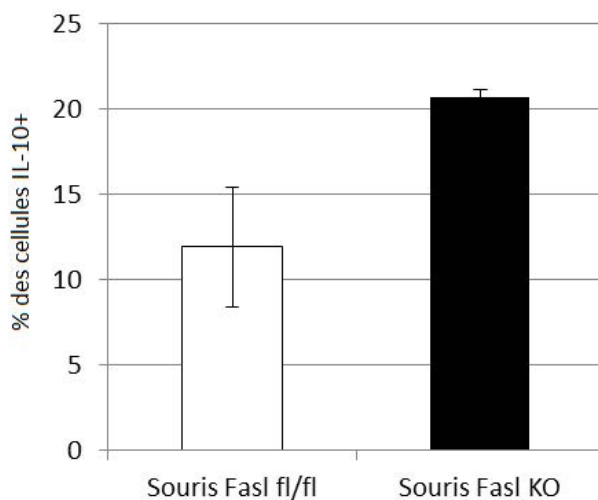


FIGURE 3.21 – Les macrophages $F480^+CD115^+IL-4R^+$ déficientes en FasL expriment fortement d'IL-10. Analyse par cytométrie en flux des macrophages $F480^+CD115^+IL-4R^+IL-10^+$. Les macrophages sont triés et mis en culture pendant 18h (O/N). Les pourcentages ont été déterminés au sein des cellules vivantes $F480^+CD115^+$. Les données sont issues de 2 expériences différentes.

3.4.3.2 Inhibition de la réponse proliférative T par les macrophages F480⁺CD115⁺IL-4R⁺

Afin de vérifier que le phénotype immunosuppresseur des cellules F480⁺CD115⁺IL-4R⁺ est bien associé à une fonction suppressive, nous avons mis en culture des splénocytes activés par anti-CD3 (5 μ g/ml) en absence ou en présence de macrophages F480⁺CD115⁺IL-4R⁺ à différents rapports effecteur/cible. Après 3 jours de culture, la prolifération des cellules T a été déterminée par un test d'incorporation de BrdU. Les résultats de la Figure 3.22A montrent que les macrophages F480⁺CD115⁺IL-4R⁺ à un rapport égal avec les cellules cibles, inhibent la prolifération des cellules T à 90%. Cette inhibition est graduellement diminuée en fonction du rapport effecteur/cible et elle est perceptible même à un faible rapport. Par exemple au rapport 1 : 0.05, ces macrophages sont capables d'inhiber la réponse proliférative à 60%. Cette capacité suppressive est légèrement plus forte, mais pas de façon significative, lorsque les macrophages F480⁺CD115⁺IL-4R⁺ sont déficients en FasL. Cette inhibition de la prolifération des cellules T est corrélée à une diminution de la production d'IFN- γ dans le surnageant de co-culture (Figure 3.22B).

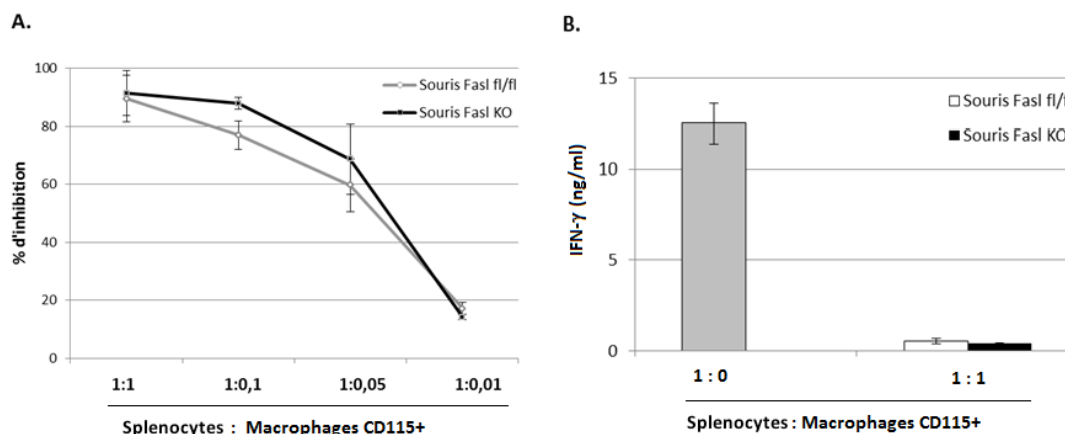


FIGURE 3.22 – Les macrophages CD115⁺ suppriment la prolifération des cellules T activées par anti-CD3. A. Test de prolifération des cellules T par une incorporation de BrdU. Les splénocytes sont activées par anti-CD3 (5 μ g/ml) mises en culture en présence des macrophages F480⁺CD115⁺ à différents rapports. B. La production d'IFN- γ par les Splénocytes activées par anti-CD3 en présence ou absence des macrophages CD115⁺ mesurée par ELISA. Les données sont issues de 3 différentes expériences.

3.4.3.3 Mécanismes d'inhibition de la réponse proliférative exercés par les macrophages F480⁺CD115⁺IL-4R⁺

L'arginase et iNOS sont les deux enzymes principaux qui jouent un rôle dans l'activité immunosuppressive exercée par les macrophages. Nous avons alors examiné ces deux mécanismes à deux cinétiques (une cinétique intermédiaire-36h et au bout de trois jours-72h) de co-culture de macrophages F480⁺CD115⁺IL-4R⁺ et de splénocytes activées par anti-CD3 au rapport 1 :1. Les résultats de la Figure 3.23A montrent qu'à 36h l'activité arginase des cellules en co-culture est identique à celle des macrophages seuls. Par contre, à 72h cette activité arginase est augmentée pour les deux génotypes. Cependant, l'activité arginase des macrophages *FasL^{fl/fl}* est nettement plus importante que celles des macrophages déficients en FasL.

Dans ces mêmes conditions, nous avons également examiné la production de NO qui résulte de l'activité enzymatique d'iNOS. Les résultats de la Figure 3.23B montrent que

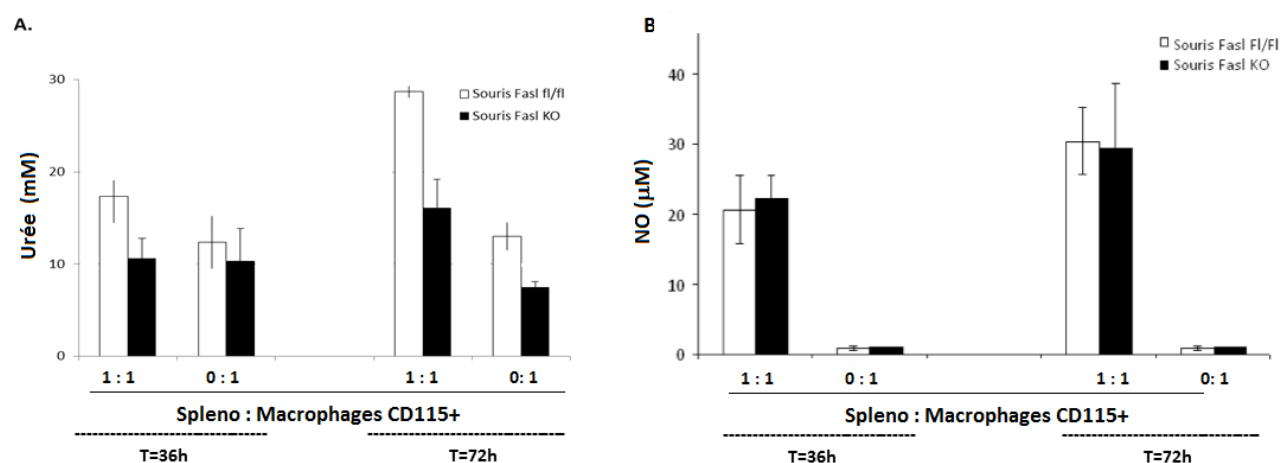


FIGURE 3.23 – Les macrophages CD115⁺ utilisent deux voies iNOS et arginase pour inhiber la prolifération des cellules T. A. Activité arginase des macrophages CD115⁺ seuls ou en présence des splénocytes. La concentration d'urée produite est mesurée et montrée en mM. B. Production de NO des macrophages CD115⁺ en présence ou absence des Splénocytes (deux cinétique T=36h, 72h). Les données sont issues de 2 expériences différentes.

les macrophages seuls ne produisent pas de NO. Mais, lorsqu'ils sont mis en présence de splénocytes activées par anti CD3, nous observons à 36h de culture une production de NO qui est doublée à 72h pour les deux génotypes. Cette production de NO est corrélée avec une levée partielle de l'inhibition de la réponse proliférative des splénocytes en présence de L-NMMA, inhibiteur spécifique de l'activité enzymatique d'iNOS. Ces résultats indiquent que, en plus de la voie arginase, celle de iNOS est également impliquée dans l'inhibition de la réponse proliférative induite par les macrophages F480⁺CD115⁺IL-4R⁺. Mais, l'inhibition de la réponse proliférative en présence de macrophages F480⁺CD115⁺IL-4R⁺ déficients en FasL semble impliquer principalement la voie iNOS. En effet, comme indiqué sur la figure 3.24, en présence de L- NMMA l'inhibition de la réponse proliférative est de 60% et 40% en présence des macrophages sauvages et déficients en FasL respectivement.

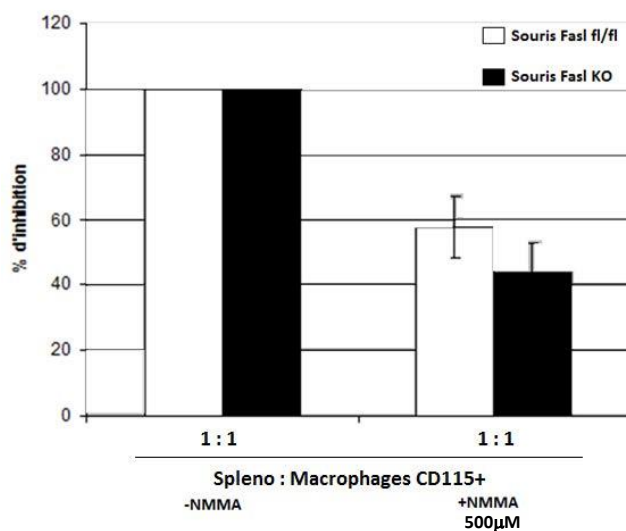


FIGURE 3.24 – L’inhibition de la réponse proliférative par des macrophages CD115⁺ est dépendante de la voie iNOS. Test de prolifération des Splénocytes activées par anti-CD3 en présence des macrophages CD115⁺ +/- de l’inhibiteur de la voie iNOS (NMMA 500 μ M). Les données sont issues de 2 expériences différentes.

3.4.3.4 Amplification de cellules T $CD4^+CD25^+FOXP3^+$

La production d'IL-10 peut avoir des effets sur d'autres types cellulaires, notamment la survie et la fonction des cellules T $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ (Tanikawa et al., 2012; Cao et al., 2010). Nous avons montré dans la Figure 3.21 que les macrophages $F480^+CD115^+IL-4R^+$ triés, sont l'IL-10⁺. Cette expression d'IL-10 est maintenue, voir légèrement augmentée, lors que les macrophages sont en présence des splénocytes (Figure 3.25A). Nous avons alors examiné si cette expression d'IL-10 par les macrophages aurait une conséquence sur la répartition des cellules T activées par anti-CD3 (Figure 3.25B). Comme indiqué dans la Figure 3.25B, dans une culture de splénocytes activés par anti-CD3, les cellules $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ ne représente que 2.5% des cellules totales. Ce pourcentage est augmenté à 5-6% en présence de macrophages $F480^+CD115^+IL-4R^+$. Cette augmentation est légèrement plus élevée lorsque les macrophages sont déficients en FasL.

L'ensemble des résultats de cette partie confirme bien que l'environnement inflammatoire des souris *Fasl KO*, qu'il soit dû à une injection des cellules tumorales, soit dû à une induction d'inflammation, est enrichi par des cellules immunosuppressives ; ce qui suggère un rôle pro-inflammatoire de FasL dans la réponse immunitaire.

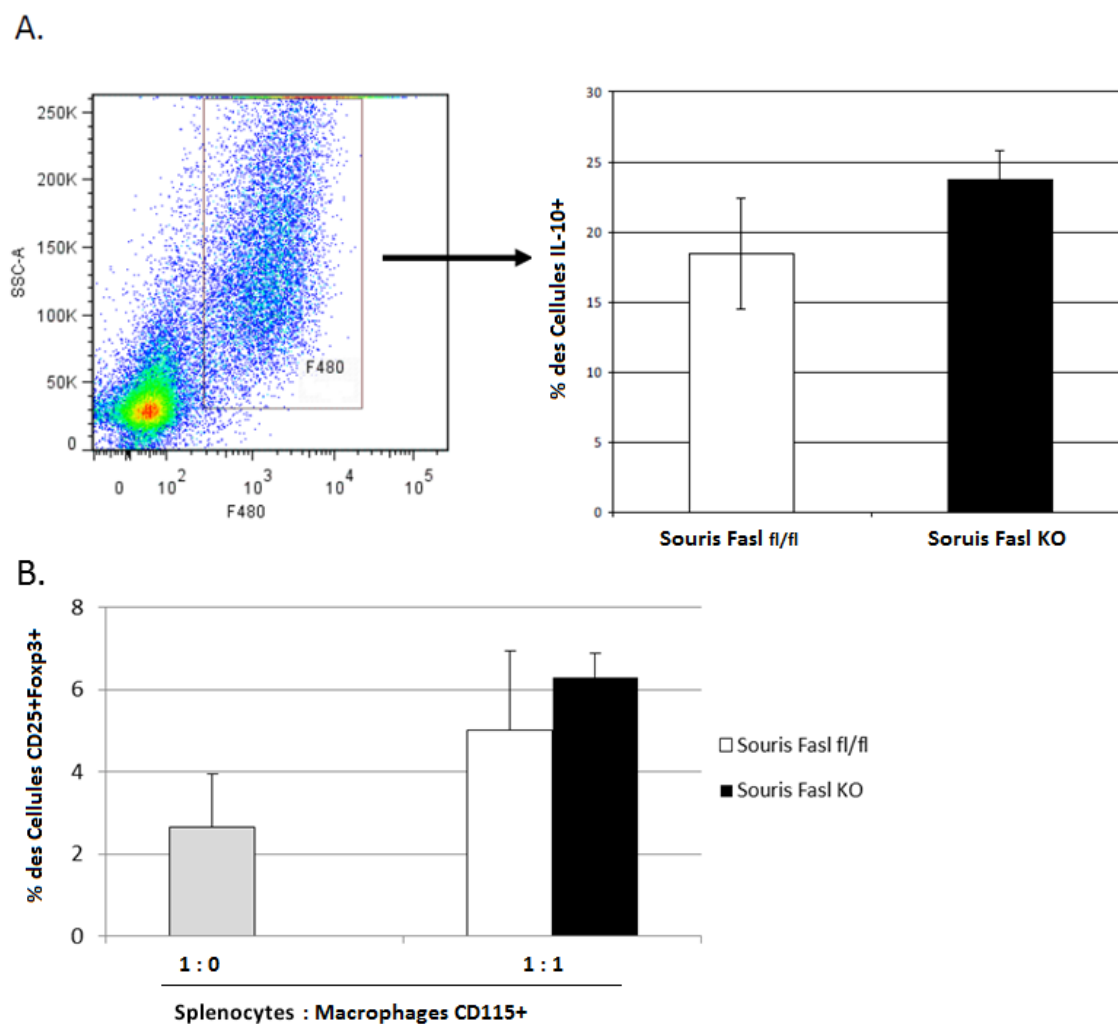


FIGURE 3.25 – Les macrophages $F480^+CD115^+IL-4R^+$ amplifient les cellules T $CD4^+CD25^+FOXP3^+$. A. Analyse ciblée par cytométrie en flux sur les macrophages $F480^+CD115^+IL-4R^+$ triés en présence des splénocytes activées par anti-CD3. B. Analyse par cytométrie en flux sur les splénocytes activées par anti-CD3 en présence des macrophages. Les pourcentages ont été déterminés au sein des cellules vivantes. Les données sont issues de 2 expériences différentes.

Chapitre 4

Discussion

Nos résultats montrent que la survie des souris déficientes en FasL porteuses de tumeur LL2 est nettement diminuée en comparaison avec les souris *Fasl^{fl/fl}*. Chez ces souris *Fasl KO*, nous observons l'enrichissement du microenvironnement tumoral en macrophages immunosuppresseur ce qui pourrait, en absence d'une cytotoxicité des cellules T par la voie Fas-FasL, contribuer à cette réduction de survie. Nous avons également observé que cet enrichissement des macrophages immunosuppresseurs existe dans un environnement inflammatoire induit par une injection de thioglycolate.

4.1 La relevance de la voie Fas/FasL dans l'homéostasie des cellules immunitaires

L'importance de la voie Fas/FasL a été mise en valeur dans l'homéostasie des cellules immunitaires après avoir associé le syndrome lymphoprolifératif, observé chez les patients atteints d'ALPS, aux mutations des gènes *Fas* et *Fasl*. Chez la souris, les allèles *lpr* et *gld*, représentent les mutations naturelles respectives de *Fas* et *Fasl*. Comme chez l'homme, ces souris développent une lymphadénopathie et une splénomégalie associés à des signes auto-immuns.

Les études antérieures de Dr. Karray ont montré que le phénotype lymphoprolifératif et la splénomégalie observés chez les souris *gld*, sont nettement moins importants par rapport aux souris *Fasl^{-/-}*. De plus, les résultats montrent également que chez les souris *gld*, FasL a conservé une activité résiduelle de fixation à son récepteur (Karray et al., 2004). Pour disséquer les bases cellulaires responsables de ce phénotype, l'équipe a généré de nouvelles lignées de souris avec des invalidations ciblées du gène *Fasl* dans les cellules T, dans les cellules B et dans les cellules myéloïdes. Ils ont montré que FasL sur les cellules T régule l'homéostasie des cellules présentatrices antigène, en l'occurrence des cellules B, nécessaire pour la prévention d'auto-immunité. Par ailleurs, ils ont montré que la délétion de *Fasl* dans les cellules B

conduit à la production des auto-anticorps. Par contre, la délétion de *FasL* dans les cellules myéloïdes ne conduit pas à des manifestations auto-immunes (Mabrouk et al., 2008). Ces études confortent les travaux de Stranges et al. (2007) qui ont montré, par une délétion ciblée du gène *Fas* dans les DC, que la voie Fas-FasL est nécessaire pour leur homéostasie et la prévention de l'auto immunité.

Dans ce travail, nous avons examiné d'une façon fine et détaillée, le rôle de la voie Fas/FasL sur l'homéostasie des différentes populations des cellules myéloïdes chez la souris naïve. Nous avons montré que FasL régule différemment cette homéostasie selon le type cellulaire et l'organe lymphoïde. En effet, nous avons montré que FasL régule l'homéostasie des cellules $\text{Gr1}^+\text{CD11b}^+$ en périphérie, mais n'affecte pas les mêmes sous-populations dans le sang et dans la rate. Dans la circulation, la voie Fas-FasL régule l'homéostasie des neutrophiles $\text{Ly6G}^+\text{CD11b}^+$. Par contre, dans la rate cette voie régule l'homéostasie des populations monocytaires (Figure 3.6). Il serait intéressant de déterminer la source de FasL responsable de l'homéostasie de chaque population myéloïde en utilisant les souris avec une délétion ciblée de *FasL* dans d'autres types cellulaires, notamment dans les cellules T ou les cellules myéloïdes.

4.2 Rôle de FasL dans la réponse anti-tumorale

Le rôle de FasL dans la réponse anti-tumorale est complexe. Les études in vitro ont montré que, d'une part, l'expression de FasL sur les lymphocytes T et les cellules NK peut induire l'apoptose des cellules tumorales qui expriment Fas (Krammer, 2000) et d'autre part, l'expression de FasL par les cellules tumorales est considérée comme un des mécanismes d'échappement tumoral du système immunitaire (Igney and Krammer, 2005). L'implication de cette voie dans la réponse anti-tumorale in vivo est très peu étudiée. Nous avons montré dans ce travail que, dans un cas de carcinome de poumon (LL2), la survie des souris déficientes en FasL porteuses de tumeur, est significativement diminuée par rapport aux souris contrôles.

Cette diminution de survie est confirmée par d'autres lignées tumorales, notamment une lignée leucémique (Données non montrées). Ainsi, ce résultat suggère que FasL joue un rôle dans la réponse anti-tumorale. Les résultats préliminaires de l'équipe ont montré que la progression de mélanome B16, chez les souris ayant le gène *Fasl* spécifiquement inactivé dans les lymphocytes T, est ralentie en comparaison avec les souris *Fasl KO*, mais demeure plus importante que la croissance observée chez les souris contrôles. Cette observation suggère que l'expression de FasL par d'autres types cellulaires, comme les cellules myéloïdes, pourrait contribuer à la réponse anti-tumorale.

Les cellules myéloïdes forment une population hétérogène qui peut, selon l'environnement, contribuer à la réponse anti- ou pro-tumorale. Les cellules Gr1⁺ (MDSC) sont une population immature de cellules myéloïdes qui se divisent en deux sous populations granulocytaire et monocyttaire (Youn et al., 2008). Dans une condition pathologique, leur différenciation vers les macrophages, les neutrophiles ou les cellules dendritiques est bloquée et elles acquièrent les caractéristiques immunosuppressives.

Nous nous sommes alors intéressés à examiner si ces cellules, notamment les cellules myéloïdes suppressives et les macrophages, jouent un rôle dans le contrôle de la réponse tumorale chez les souris *Fasl KO*. Nous avons observé une accumulation de la population MDSC monocyttaire et des macrophages, dans la rate et l'infiltrat tumoral des souris *Fasl KO* respectivement. En effet, dans la rate d'une souris porteuse de tumeur, les populations Gr1⁺CD11b⁺ et les macrophages sont amplifiés, par rapport à une souris naïve, mais cette amplification est sensiblement identique entre les deux génotypes (Figure 3.8). Ces résultats contrastent avec ceux de Sinha et al. (2011) qui ont montré que dans la rate d'une souris Balb/C *gld* porteuse de tumeur 4T1, les cellules Gr1⁺CD11b⁺ s'accumulent par rapport à une souris sauvage porteuse de tumeur, suggérant un rôle de FasL dans l'homéostasie des cellules Gr1⁺CD11b⁺. Cette différence pourrait être associée au type de cellules tumorales utilisées ou au fond génétique différent des souris dans chaque étude (Balb/C contre C57Bl/6) ou à la cinétique post injection.

Les cellules myéloïdes sont caractérisées par une forte plasticité selon l'environnement et les différents facteurs présents. Il a été démontré que le phénotype de la sous-population granulocytaire des cellules Gr1^+ , reste constant au cours de la progression tumorale mais le phénotype de la sous-population monocyttaire pourrait commuter. En effet, Youn et al. (2013) ont montré que les M-MDSC provenant de la rate des souris injectées par EL-4, au cours de la progression tumorale, acquièrent la capacité de se différencier vers les PMN-MDSC. Ce processus est dépendant de Rb1, un facteur de transcription impliqué dans la prolifération cellulaire (Giacinti and Giordano, 2006). Une autre étude récente a montré que $\text{TNF-}\alpha$ bloque la différenciation des cellules myéloïdes immatures dans un modèle d'inflammation chronique. Dans cette étude, le nombre des cellules $\text{Gr1}^+\text{CD11b}^+$ est fortement diminué chez les souris déficientes en $\text{TNF-}\alpha$ sans affecter la répartition relative des deux sous populations des MDSC, monocyttaire et granulocytaire (Sade-Feldman et al., 2013). Nos résultats montrent que, à l'inverse du $\text{TNF-}\alpha$, FasL, membre de la même famille que $\text{TNF-}\alpha$, semble réguler la répartition des sous-populations des cellules Gr1^+ . En effet, la figure 3.8 montre que la rate des souris *Fasl* KO porteuses de tumeur est nettement plus enrichie en sous-population monocyttaire $\text{Gr1}^+\text{Ly6C}^{\text{high}}$ par rapport aux souris contrôles. Ce résultat soulève deux hypothèses. La première hypothèse est une sensibilité plus importante des cellules $\text{Gr1}^+\text{Ly6C}^{\text{high}}$ à l'apoptose induite par FasL. La deuxième hypothèse est que FasL favoriserait la différenciation des cellules $\text{Gr1}^+\text{Ly6C}^{\text{high}}$ vers les cellules $\text{Gr1}^{\text{high}}\text{Ly6G}^+$. Il serait ainsi intéressant de trier et séparer ces deux sous-populations et de les faire différencier in vitro.

Les cellules $\text{Gr1}^+\text{CD11b}^+$ sont connues par leur capacité à supprimer la réponse des cellules T. Curieusement, dans notre modèle, ces cellules Gr1^+ isolées à partir de la rate des souris (*Fasl^{fl/fl}*) et *Fasl* KO porteuses de tumeur, ne suppriment pas la réponse des cellules T activées de façon non-spécifique (Figure 3.13). Nous avons vérifié que cette absence d'inhibition de la réponse T n'est pas associée à la mort des cellules Gr1^+ . En effet, même en présence de GM-CSF dans la co-culture, nous n'avons pas d'inhibition.

L'autre possibilité, concerne la méthode de la suppression. En effet, les données de la littérature sur ce sujet sont variables. Cette variabilité pourrait provenir du type des cellules tumorales, de la cinétique post injection, du fond génétique de souris utilisées par les différentes études. Cependant, la plupart des études ont montré que les cellules $\text{Gr1}^+\text{CD11b}^+$ issues de la rate des souris porteuses de tumeur, suppriment la réponse T de façon antigène spécifique. Par contre, les cellules $\text{Gr1}^+\text{CD11b}^+$ issues du microenvironnement tumoral suppriment la réponse T par les deux voies (Corzo et al., 2010; Youn et al., 2012; Movahedi et al., 2008; Sinha et al., 2011). Effectivement, dans notre modèle, nous avons observé que les cellules Gr1^+ triées à partir de l'infiltrat tumoral des souris contrôles et *Fasl KO*, indépendamment du génotype, sont capables de supprimer la réponse des cellules T activées par anti-CD3 (Figure 3.14). Donc, il serait intéressant de tester à nouveau la capacité suppressive des cellules Gr1^+ issues de la rate, sur les cellules T activées de manière antigène spécifique en utilisant les souris OT I/II et explorer le/les mécanismes impliqués en cas de suppression de la réponse T sachant que elles peuvent être différentes selon le type de population granulocytaire versus monocytaire. Il a été montré que la sous-population granulocytaire ou PMN-MDSC produit des niveaux élevés de ROS et de faibles niveaux de *NO*. Inversement, la sous-population monocytaire ou M-MDSC produit de faibles niveaux de ROS et des niveaux élevés de *NO*. Les deux sous-populations expriment arginase 1 (Youn et al., 2012). Dans notre modèle, nous devons observer un mécanisme de suppression différent chez les souris *Fasl KO* et (*Fasl^{fl/fl}*).

L'infiltrat T des souris *Fasl KO* est caractérisé par une diminution des cellules $\text{Gr1}^+\text{CD11b}^+$ et une accumulation des macrophages. Ces macrophages, indépendamment du génotype, ont une forte activité arginase et iNOS associée à une activité suppressive des cellules T activées de façon non spécifique. Il a été démontré in vitro que les M-MDSC peuvent se différencier en macrophages suppresseurs (Movahedi et al., 2008). Effectivement, notre observation très préliminaire, mais excitante, montre que les cellules Gr1^+ , isolées de la rate de souris porteuse de souris tumeurs, deviennent suppressives lorsqu'elles sont cultivées en présence de

milieu conditionnée de cellules de la lignée tumorale LL2. Il serait donc intéressant d'examiner le phénotype de ces cellules suppressives et de déterminer les facteurs solubles présents impliqués dans cette différenciation. On pourrait ainsi supposer que l'environnement de la souris *Fasl KO* porteuses de tumeur produit des facteurs qui favoriseraient la différenciation des cellules Gr1 en macrophages suppresseurs.

4.3 Rôle de FasL dans un modèle d'inflammation expérimentale

La dernière partie de ma thèse consiste à consolider les résultats sur l'enrichissement des macrophages observé dans le microenvironnement tumoral, dans un modèle de péritonite induite par thioglycolate. Chez les souris *Fasl KO*, nous avons observé une accumulation des macrophages péritonéaux $F480^+CD115^+IL-4R^+$ (Figure 3.18). Nous avons montré que ces macrophages péritonéaux, indépendamment de génotype, sont fortement suppresseurs (Figure 3.22). Nous avons également montré qu'ils exercent leur activité suppressive via principalement la voie arginase et iNOS (Fig 3.23).

IL-10 est une cytokine produite par les cellules de type TH2 produit par d'autres types cellulaires comme les cellules B régulatrices et les myéloïdes notamment Les macrophages régulateurs. Une étude récente a ont montré que, dans le cas d'une néphrose, les macrophagesM2 $IL-10^+$ inhibent la prolifération des cellules T in vitro et induisent la conversion des cellules T $CD4^+CD25^-$ en cellules T $CD4^+CD25^+FoxP3^+$. Ils ont également montré que l'expression par les macrophages régulateurs des niveaux élevés de B7-H4, une molécule inhibitrice de la famille B7, joue un rôle dans la conversion des cellules T vers les cellules T $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (Cao et al., 2010).

Nous avons montré dans la figure 3.25 que les macrophages $F480^+CD115^+IL-4R^+$ produisent de l'IL-10. Ces macrophages $F480^+CD115^+IL-4R^+$ lors qu'ils sont mis en présence de

splénocytes activés par anti-CD3, conduisent à une amplification des cellules $CD4^+CD25^+FoxP3^+$. Il serait intéressant de caractériser fonctionnellement ces cellules $FoxP3^+$ pour déterminer s'il s'agit de T régulateur. Deuxièmement, pour montrer si cette conversion est dépendante de l'IL10, la voie IL-10 sera bloquée

4.4 Rôle de FasL dans l'accumulation des macrophages ?

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'enrichissement des cellules myéloïdes suppressives chez les souris *Fasl KO*. La première hypothèse est que les macrophages, selon le site et l'environnement, sont plus sensibles à l'apoptose induite par la voie Fas/FasL. En effet, la délétion germinale de *Fasl* ne permet pas de bien disséquer ce mécanisme. Il serait intéressant d'utiliser les souris avec une délétion ciblée de *Fasl* sur les cellules myéloïdes et les cellules T pour voir si FasL sur les cellules T régule l'homéostasie des macrophages ou l'expression de *Fasl* sur les macrophages eux-mêmes, ou bien sur d'autres types des cellules myéloïdes, régule leur homéostasie.

Deuxième hypothèse repose sur le rôle non-apoptotique de la voie Fas/FasL via une activation de la voie NF- κ B et une production des cytokines pro-inflammatoires. Dans un modèle d'inflammation induite par une lésion de système nerveux central, la production d'IL-1, IL-6 et CXCL10 est nettement diminuée chez les souris ayant le gène *Fasl* invalidé dans les cellules myéloïdes, suggérant que la voie Fas/FasL pourrait changer l'environnement inflammatoire (Letellier et al., 2010). En effet, dans une condition physiologique, il existe une balance entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires. Cette balance pourrait être changée dans différentes situations pathologiques, comme l'inflammation et cancer. Ce déséquilibre pourrait favoriser un phénotype pro- ou anti-inflammatoire des cellules myéloïdes. Nous avons ainsi montré que chez les souris *Fasl KO*, porteuses de tumeur ou bien dans un état d'inflammatoire induit par thioglycolate, il y a une accumulation des macrophages avec un phénotype anti-inflammatoire ; ce qui pourrait être corrélé avec une carence des cytokines ou

chimiokines pro-inflammatoires et donc une orientation des macrophages vers le phénotype anti-inflammatoire.

En effet, Un réseau complexe de facteurs de transcription régule l'expansion et la fonction des cellules myéloïdes. Sa dérégulation conduit à une altération de leur maturation/différenciation et une programmation vers un phénotype MDSC. Parmi ces facteurs, NF- κ B joue un rôle crucial dans l'accumulation et la fonction des cellules myéloïdes suppressives (Biswas and Lewis, 2010). NF- κ B est impliqué dans la voie de signalisation de plusieurs cytokines, notamment celle de FasL et de TLR4. Il a été démontré que TLR4 joue un rôle dans l'expansion et la fonction des cellules myéloïdes suppressives (Bunt et al., 2009). TLR4 active NF- κ B via le recrutement de la protéine adaptatrice MyD88 vers le récepteur. Dans la signalisation de FasL, NF- κ B est activé via le recrutement de la protéine adaptatrice FADD. Les protéines adaptatrices Myd88 et FADD contiennent un domaine de mort appelé DD (death domain) donc un échange (cross talk) entre ces deux voies peut se faire. Ainsi, en absence de signalisation de la voie FasL et dans un environnement inflammatoire une activation excessive de la voie TLR4 est possible. Cette activation serait induite par un recrutement important de MyD88 à son récepteur qui conduirait à une activation excessive de NF- κ B et des gènes cibles, notamment iNos, arginase, TGF- β , IL-10. Il serait donc intéressant d'examiner, l'état de phosphorylation et la composition du complexe NF- κ B (p65/p55) et des molécules intermédiaires impliquées dans les deux voies de signalisation dans les cellules myéloïdes suppressives et les macrophages FasL+ ou FasL déficients des souris naïves et porteuses de tumeurs LL2 et activées par LPS et FasL soluble. Ainsi, ce travail pourrait apporter de nouvelles approches de levée de l'immunosuppression pour une immunothérapie efficace.

Chapitre 5

Matériels et Méthodes

Expérimentation animale

Animaux

Les souris C57BL/6 sont utilisées lors des expérimentation animale. Nos lignées de souris, celle qui est déficiente en FasL (*Fasl KO*) et son contrôle, celle qui a le gène *Fasl* bordé de deux sites de LoxP, *Fasl^{fl/fl}*, sont élevées à l'animalerie de l'IGR dans un environnement exempt de pathogènes. Les souris déficientes en FasL ont été générées comme décrit par Karray et al. (2004), et elles sont croisées (backcross) 12 générations.

Etude de la progression tumorale

La lignée des cellules tumorales utilisée est LL2 (Lewis Lung Carcinoma) qui une lignée syngénique des souris C57BL/6 établie à partir du poumon de souris C57BL/6 porteuse de tumeur primaire. Cette lignée est utilisée comme un modèle de métastase de poumon. Les cellules en phase exponentielle sont injectées lors qu'elles ont 70% de confluence. 3×10^5 cellules tumorales LL2 sont injectées en sous cutané (s.c.) aux souris *Fasl KO* et aux souris *Fasl^{fl/fl}*. La taille des tumeurs est déterminée tous les 3-4 jours. 21-23 jours après injection, soit un volume de la masse tumorale entre 500 et 600 mm³, les souris sont sacrifiées et les rates et les tumeurs sont prélevés pour une analyse fonctionnelle et phénotypique. La courbe de survie des souris *Fasl^{fl/fl}* et *Fasl KO* est établie après injection en intraveineuse (i.v.) de 2×10^5 cellules tumorales LL2.

Préparation d'une suspension cellulaire à partir des tumeurs

Les tumeurs sont dissociées mécaniquement dans du milieu RPMI sans SVF puis incubées avec un cocktail d'enzymes [DNase (sigma D5025) 500u/ml, Collagénase (Sigma C5138) 300u/ml et Hyaluronidase (Sigma H6254) 3000u/ml] pendant 45min sous agitation à 37°C. La réaction est arrêtée par l'ajout d'un grand volume de milieu supplémenté par 10% de

SVF.

Péritonite induite par le Thioglycolate

Afin de générer des macrophages péritonéaux, 1ml de Thioglycolate (Bio Mérieux Réf. 51018) 3% est injecté en intra-péritonéal (i.p) aux souris *Fas^l^{fl/fl}* et *Fas^l KO*. A J3 post injection, les cellules recrutées en péritoine sont obtenues par lavage de la cavité péritonéale avec 5ml de PBS 1X.

Culture cellulaire

Les cellules primaires et les lignées cellulaires tumorales sont cultivées à 37°C dans une atmosphère saturée en humidité à 5% de CO₂. Les cellules de carcinome de poumon (LL2) sont cultivées en milieu DMEM F12 supplémenté par 1% de pénicilline, 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 1% de pyruvate de sodium. Les macrophages et les splénocytes sont cultivés en milieu RPMI complémenté par 1% d'une solution de pénicilline/sreptomycine, 10% de SVF et 5.10-5M de β -mercaptoéthanol.

Différentiation des macrophages dérivés de moelle osseuse

Les cellules de la moelle osseuse sont préparées à partir des fémurs des souris. Après lyse des globules rouges par le ACK (NH₄Cl 0.155M, KHCO₃ 0.01M et EDTA 0.0001 M), les cellules sont mises en culture à une concentration de 1x10⁶ cellules/ml dans un milieu de culture RPMI complet en présence de GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) à 5 ng/ml ou de M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) à 5 ng/ml pendant 7 jours. Le phénotype des cellules est déterminé par cytométrie en flux en utilisant les marqueurs suivants : Gr1 (PE-Cy7), CD11b (APC-Cy7), F480 (Pacific Bleu), CD115 (PE), Ly6C (APC). La polarisation des macrophages est réalisée par un traitement

des cellules pendant 48h en présence de 10 ng/ml de LPS ou d'IL-4 10 ng/ml.

Purification des cellules

Les cellules Gr1⁺ ou les macrophages F480⁺ sont isolées à partir de rates ou d'infiltrat des souris *Fasl*^{fl/fl} ou *Fasl* KO porteuses de tumeurs LL2 à 21-23 jours post injection. Les cellules sont isolées soit sur colonne LS (MiltenyBiotech) soit sur trieur FACS Aria ou MoFlo.

Trieur : Pour la séparation des cellules sur trieur, les cellules sont marquées par l'anticorps d'intérêt pendant 30 min à 4°C. Les cellules sont triées ensuite par FACS Aria ou MoFlo. La pureté de la population est > 95%.

Colonnes de séparation : La séparation sur colonne est basée sur une sélection positive par des billes magnétiques selon le protocole du fournisseur (Milteny LS Columns 130-042-401). Brièvement, les Splénocytes sont reprises et lavées dans MACS buffer (1x PBS, 0.5% BSA et 2 mM EDTA) et par la suite incubés 30 minutes à 4°C avec un anticorps d'intérêt (0.5 µl d'AC pour 1 million de cellules). Après lavages, les cellules sont incubées pendant 30 minutes avec les microbilles (130-048-801) en utilisant 1 µl de billes par million de cellules. Les cellules sont triées sur les colonnes LS. La pureté des cellules triées est > 90%.

Analyse phénotypique

Marquage extracellulaire

Le phénotype des cellules est déterminé par fixation d'anticorps spécifiques des marqueurs d'intérêt et analyse en cytométrie de flux. Pour bloquer la fixation non spécifique via le fragment Fc des Igs, les cellules sont préalablement incubées pendant 30 min avec un surnageant d'hybridome de l'anticorps CD32 Mouse Fc Block (BD Bioscience 553141). Puis les cellules sont incubées 20 min à 4°C dans du tampon FACS (PBS 1X, BSA 0.5%, Azide 0.1%) contenant les anticorps d'intérêts aux concentrations appropriées. Tableau 5.1

Anticorps	Clone	Fournisseur
CD4 PE	GK1.5	BD biosciences
CD8 FITC	53-6.7	BD biosciences
CD25 FITC	PC61	BD biosciences
Anti-BrdU FITC	BU20A	BD biosciences
Ly6G FITC	1A8	eBioscience
CD115 PE	AFS98	eBioscience
IL-4R PE	8D4-8	eBioscience
Gr1- PE-CY7	RB6-8C5	eBioscience
CD11b APC-CY7	M1/70	eBioscience
F4/80 eFluoro405	BM8	eBioscience
Ly6C APC	HK1.4	eBioscience
IL-10 FITC	JES5-16E3	eBioscience
Anti-FoxP3 APC	FJK-16s	eBioscience

TABLE 5.1 – Liste des anticorps couplés

résume les différents anticorps utilisés. Après deux lavages en tampon FACS, l'acquisition est réalisée sur l'appareil LSR II. Les données sont analysées à l'aide d'un programme fourni par DIVA et Flowjo.

Marquage intra cellulaire

IL-10

Les cellules sont préalablement incubées pendant 4h à 37°C avec Brefeldin 10 μ M (B5736 Sigma), un inhibiteur de transport des protéines à Golgi pour amplifier la détection de cytokines produites par les cellules. La production d'IL-10 est déterminée après un marquage extracellulaire, fixation et perméabilisation des cellules (Kit BD Cytofix/Cytoperm 554722).

FoxP3

Le marquage FoxP3 est réalisé en utilisant le kit FoxP3 Staining Buffer set d'eBioscience (00-5523). Après un marquage extra-cellulaire, les cellules sont fixées et perméabilisées par la

solution « FoxP3 Fixation/Permeabilization working solution » et par la suite, sont marquées avec l'anticorps anti- FoxP3 (APC).

Analyse Fonctionnelle

Prolifération des cellules T

Test d'incorporation de BrdU

Les cellules sont incubées avec BrdU 10 μ M pendant 4 heures à 37°C et l'incorporation de BrdU est déterminée selon le protocole du fournisseur (FITC BrdU Flow Kit BD 559619). Brièvement, après l'étape de perméabilisation, les cellules sont incubées pendant 1h avec DNase à 37°C et puis avec anti-BrdU FITC 1/50 pendant 30 minutes à 4°C.

Test de MTT

Les Splénocytes(100 μ l) sont distribués à une concentration de 100.000 cellules par puits (plaques 96 puits) préalablement incubées pendant 4h à 37°C avec un anticorps anti-CD3 à 5 μ g/ml (Anti-mouse CD3 eBioscience 16-0031-86, Clone 145-2611) en présence ou en absence de macrophages ou de MDSCs à différents rapports. Après 72h de culture, la prolifération est déterminée par MTT. Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium). Tétrazolium est réduit en formazan par la succinate déshydrogénase qui existe dans la mitochondrie des cellules vivantes actives. Ceci forme un précipité dans la mitochondrie de couleur violette. La quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes (mais également à l'activité métabolique de chaque cellule). Il suffit donc après l'incubation des cellules avec du MTT pendant 4h à 37 °C de dissoudre les cellules, leur mitochondries et donc les précipités de Formazan violets dans le tampon de lyse contenant de SDS (overnight). La détermination de la densité optique à 550 nm permet de connaître la quantité relative de cellules vivantes et actives

métaboliquement.

Dosage des cytokines par ELISA

Les cytokines, IL-12p70 et IFN- γ , sont dosés par le kit ELISA en utilisant le protocole fourni par R&D Systems. Brièvement, Les plaques sont coatées par un anticorps de capture pendant 16h à température ambiante. Puis, après lavage, les plaques sont saturées avec block Buffer pendant 2h à 4°C. Les surnageants des cellules sont déposés et incubés pendant 16h à température ambiante. L'anticorps est ajouté par la suite et puis détecté en utilisant Streptavidine-HRP. La lecture des différents puits est réalisée aux densités optiques (DO) de 450 nm et 570 nm.

Dosage de l'activité arginase

Les cellules (1 million) sont lysées dans 100 μ l d'une solution de Triton X-100 à 0.1% pendant 30 min d'agitation vigoureuse. 100 μ l de Tris-HCl 25mM et 20 μ l de MnCl₂ 10mM ont été ajouté au lysat et l'arginase est activé par un échauffement de solution à 56°C pendant 10 min. Le substrat, 100 μ l de L-arginine de 0.5M, pH 9.7, est ajouté et le tout est incubé pendant 30 min à 37°C. La réaction est stoppée par l'ajout d'un mélange acide (H₂SO₄/H₃PO₄ (89%)/ H₂O, ratio1/3/7). La présence d'urée (un des produits de dégradation de la L-arginine) dans le lysat est révélée par l'ajout de 40 μ l d'isonitrosopropiophenone (1%, stock à 9% dissout dans l'éthanol). Après 15 min d'incubation à 100°C, l'absorbance des échantillons est mesurée à 570 nm. La concentration d'urée dans les échantillons est calculée grâce aux valeurs obtenues pour une courbe standard réalisée en parallèle.

Dosage des nitrites

La concentration en moNOxyde d'azote (NO) est indirectement mesurée par la présence de son produit de dégradation, le nitrite. Des aliquotes de surnageant sont mélangés à des

volumes équivalents de réactif de Griess (Promega G2930) et incubés pendant 10 min à température ambiante. L'absorbance des échantillons est mesurée à 550 nm. La concentration de nitrites dans les échantillons est calculée grâce aux valeurs obtenues pour une courbe standard réalisée en parallèle.

Dosage de l'activité ROS

CM-H2DCFDA (General Oxidative Stress Indicator) a été utilisé comme indicateur de ROS produit par les cellules. Les cellules sont marquées par Gr1-PE et après une incubation de 30 minutes à 4°C, les cellules sont lavées avec PBS et aussi HBSS (PBS sans Mg^{2+} et Ca^{2+}). Par la suite, les cellules sont incubées avec DCFDA 2.5 μM (Invitrogen C6827) pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules sont lavées et analysées par cytométrie en flux.

Extraction d'ARN (TRIzol)

La première étape est la lyse cellulaire : les cellules sont reprises dans 0.5ml de TRIzol et incubées 5 min à température ambiante. La deuxième étape consiste en la séparation des protéines et les acides nucléiques. Pour cela, 0.1ml de Chloroforme est ajouté puis la préparation est vortexée 15 secondes et incubée 15 min à température ambiante. La suspension est centrifugée 15 min à 4°C à 12000g, La bande aqueuse supérieure contient l'ARN. La dernière étape est la précipitation d'ARN : la bande aqueuse supérieure est transférée dans un nouveau tube puis 0.25ml d'Isopropanol sont ajoutés. Après 10 min d'incubation à température ambiante, le tube est centrifugé 10 min à 12000g à 4°C. Ensuite, l'ARN est lavé avec 0.5ml d'éthanol 75% puis centrifugé 5 min à 12000g à 4°C. Cette étape de lavage est répétée deux fois. Le culot est repris dans 20 μl d'eau ne contenant pas de RNase. La concentration des échantillons est mesurée par Nanodrop.

CCL24	Forward 5'GCTGCACGTCCTTTATTTCC3' Reverse 5'CCCCTTTAGAAGGCTGGTTT3'
MIP-1	Forward 5'AGTGAAGTGGCGCTGTCAATG3' Reverse 5'TTAGCCTTGCCTTTGTTCAG3'
iNOS	Forward 5'CCTTGTTTCAGCTACGCCTTC3' Reverse 5'AAGGCCAAACACAGCATACC3'
TNF	Forward 5' GAACTGGCAGAAGAGGCACT 3' Reverse 5' GGTCTGGGCCATAGAAGTGA
CXCL10	Forward 5' AAGTGCTGCCGTCATTTTCT 3' Reverse 5' TCTTTTTCATCGTGGCAATG 3'
IL-6	Forward 5' TTCCATCCAGTTGCCTTCTT3' Reverse 5' CAGAATTGCCATTGCACAAC3'

TABLE 5.2 – Liste des amorces utilisées et leur séquence.

PCR Quantitative (Q-PCR)

1 μ g d'ARN est rétro transcrit en ADNc en utilisant d'un cocktail de transcription inverse (10x Buffer, MgCl₂, RTase, Reverse Transcriptase, dNTP et oligo Hexamère, Applied Biosystem) et en incubant ce mélange 60 min à 42°C puis 5 min à 99°C. Le PCR Quantitative est réalisée en mélangeant 12,5 μ l Master Mix Sybr Green, 0,75 μ l de chaque amorce et 1 μ l d'ADNc conformément aux recommandations du fabricant (Applied Biosystems). La liste des amorces utilisées se trouve dans le Tableau 5.2. Le taux d'ARN amplifié est normalisé par une amplification simultanée d'un contrôle endogène (NADPH).

Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du programme GraphPad Prism version 3.00.¹

1. GraphPad Software, San Diego, CA, <http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>.

Bibliographie

- Adachi, M., Watanabe-Fukunaga, R., et al., 1993 ; Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the fas antigen gene of lpr mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **90**(5) :1756–1760.
- Agostinelli, E. and Seiler, N., 2006 ; Non-irradiation-derived reactive oxygen species (ros) and cancer : therapeutic implications. *Amino Acids*, **31**(3) :341–355.
- Aguirre-Ghiso, J.A., 2007 ; Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature Reviews Cancer*, **7**(11) :834–846.
- Al-Sarireh, B. and Eremin, O., 2000 ; Tumour-associated macrophages (tams) : disordered function, immune suppression and progressive tumour growth. *Journal of the Royal College of Surgeons of Edinburgh*, **45**(1) :1.
- Algeciras-Schimmich, A., Shen, L., et al., 2002 ; Molecular ordering of the initial signaling events of cd95. *Molecular and cellular biology*, **22**(1) :207–220.
- Allavena, P. and Mantovani, A., 2012 ; Immunology in the clinic review series ; focus on cancer : tumour-associated macrophages : undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clinical & Experimental Immunology*, **167**(2) :195–205.
- Almand, B., Resser, J.R., et al., 2000 ; Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clinical Cancer Research*, **6**(5) :1755–1766.
- Anderson, C.F. and Mosser, D.M., 2002 ; A novel phenotype for an activated macrophage : the type 2 activated macrophage. *Journal of leukocyte biology*, **72**(1) :101–106.
- Andreola, G., Rivoltini, L., et al., 2002 ; Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of fasl-bearing microvesicles. *The Journal of experimental medicine*, **195**(10) :1303–1316.
- Andrikoula, M., Kolaitis, N., et al., 2009 ; Serum levels of soluble fas in patients with multinodular goiter. *Immunological investigations*, **38**(5) :398–407.
- Auffray, C., Sieweke, M.H., et al., 2009 ; Blood monocytes : development, heterogeneity, and

- relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology*, **27** :669–692.
- Badley, A.D., McElhinny, J.A., et al., 1996 ; Upregulation of fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected t lymphocytes. *Journal of virology*, **70**(1) :199–206.
- Balkwill, F., 2004 ; Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews Cancer*, **4**(7) :540–550.
- Barnhart, B.C., Lee, J.C., et al., 2003 ; The death effector domain protein family. *Oncogene*, **22**(53) :8634–8644.
- Barry, M. and Bleackley, R.C., 2002 ; Cytotoxic t lymphocytes : all roads lead to death. *Nature Reviews Immunology*, **2**(6) :401–409.
- Ben Moshe, T., Barash, H., et al., 2007 ; Role of caspase-8 in hepatocyte response to infection and injury in mice. *Hepatology*, **45**(4) :1014–1024.
- Bettelli, E., Carrier, Y., et al., 2006 ; Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector th17 and regulatory t cells. *Nature*, **441**(7090) :235–238.
- Bingisser, R.M., Tilbrook, P.A., et al., 1998 ; Macrophage-derived nitric oxide regulates t cell activation via reversible disruption of the jak3/stat5 signaling pathway. *The Journal of Immunology*, **160**(12) :5729–5734.
- Biswas, S.K. and Lewis, C.E., 2010 ; Nf- κ b as a central regulator of macrophage function in tumors. *Journal of leukocyte biology*, **88**(5) :877–884.
- Biswas, S.K. and Mantovani, A., 2010 ; Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets : cancer as a paradigm. *Nature immunology*, **11**(10) :889–896.
- Black, R.A., Rauch, C.T., et al., 1997 ; A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-or from cells. *Nature*, **385**(6618) :729–733.
- Blank, C. and Mackensen, A., 2007 ; Contribution of the pd-l1/pd-1 pathway to t-cell exhaustion : an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, **56**(5) :739–745.
- Blaser, M.J., Perez-Perez, G.I., et al., 1995 ; Infection with helicobacter pylori strains possessing caga is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer research*, **55**(10) :2111–2115.
- Bodmer, J.L., Holler, N., et al., 2000 ; Trail receptor-2 signals apoptosis through fadd and caspase-8. *Nature cell biology*, **2**(4) :241–243.

- Bogdan, C., 2001 ; Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology*, **2**(10) :907–916.
- Boissonnas, A., Scholer-Dahirel, A., et al., 2010 ; Foxp3⁺ t cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity*, **32**(2) :266–278.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., et al., 1996 ; Involvement of mach, a novel mort1/fadd-interacting protease, in fas/apo-1-and tnfr1-induced cell death. *Cell*, **85**(6) :803.
- Bouillet, P. and O'Reilly, L.A., 2009 ; Cd95, bim and t cell homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, **9**(7) :514–519.
- Bourgeois, C., Rocha, B., et al., 2002 ; A role for cd40 expression on cd8⁺ t cells in the generation of cd8⁺ t cell memory. *Science Signaling*, **297**(5589) :2060.
- Brandt, E., Woerly, G., et al., 2000 ; Il-4 production by human polymorphonuclear neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, **68**(1) :125–130.
- Bronte, V., Wang, M., et al., 1998 ; Apoptotic death of cd8⁺ t lymphocytes after immunization : induction of a suppressive population of mac-1⁺/gr-1⁺ cells. *The Journal of Immunology*, **161**(10) :5313–5320.
- Bronte, V. and Zanovello, P., 2005 ; Regulation of immune responses by l-arginine metabolism. *Nature Reviews Immunology*, **5**(8) :641–654.
- Buissow, S.C., Paul, R.D., et al., 1984 ; Influence of mammary tumor progression on phenotype and function of spleen and in situ lymphocytes in mice. *Journal of the National Cancer Institute*, **73**(1) :249–255.
- Bunt, S.K., Clements, V.K., et al., 2009 ; Inflammation enhances myeloid-derived suppressor cell cross-talk by signaling through toll-like receptor 4. *Journal of leukocyte biology*, **85**(6) :996–1004.
- Burnet, F. et al., 1970 ; The concept of immunological surveillance. *Progress in experimental tumor research*, **13** :1.
- Burstein, N.A. and Law, L.W., 1971 ; Neonatal thymectomy and non-viral mammary tumours in mice.
- Campbell, D.J. and Koch, M.A., 2011 ; Phenotypical and functional specialization of foxp3⁺ regulatory t cells. *Nature Reviews Immunology*, **11**(2) :119–130.
- Cao, Q., Wang, Y., et al., 2010 ; Il-10/tgf- β -modified macrophages induce regulatory t cells and protect against adriamycin nephrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, **21**(6) :933–942.

- Carbone, E., Terrazzano, G., et al., 1999 ; Recognition of autologous dendritic cells by human nk cells. *European journal of immunology*, **29**(12) :4022–4029.
- Chaigne-Delalande, B., Moreau, J.F., et al., 2008 ; Rewinding the disc. *Archivum immunologiae et therapias experimentalis*, **56**(1) :9–14.
- Chan, F.K.M., Chun, H.J., et al., 2000 ; A domain in tnfr receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science Signaling*, **288**(5475) :2351.
- Chen, W., Frank, M.E., et al., 2001 ; Tgf- β released by apoptotic t cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity*, **14**(6) :715–725.
- Cheng, L., Jiang, J., et al., 2009 ; B7-h4 expression promotes tumorigenesis in ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, **19**(9) :1481–1486.
- Chiesa, S., Mingueneau, M., et al., 2006 ; Multiplicity and plasticity of natural killer cell signaling pathways. *Blood*, **107**(6) :2364–2372.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., et al., 1995 ; Fadd, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis. *Cell*, **81**(4) :505–512.
- Chouaib, S. and Bertoglio, J., 1988 ; Prostaglandins e as modulators of the immune response. *Lymphokine research*, **7**(3) :237–245.
- Ch'ng, E.S., Sharif, S.E.T., et al., 2013 ; In human invasive breast ductal carcinoma, tumor stromal macrophages and tumor nest macrophages have distinct relationships with clinicopathological parameters and tumor angiogenesis. *Virchows Archiv*, pages 1–11.
- Clark, W.H., Elder, D.E., et al., 1989 ; Model predicting survival in stage i melanoma based on tumor progression. *Journal of the National Cancer Institute*, **81**(24) :1893–1904.
- Cohen, P.L. and Eisenberg, R.A., 1991 ; Lpr and gld : single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annual review of immunology*, **9**(1) :243–269.
- Condamine, T. and Gabrilovich, D.I., 2011 ; Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends in immunology*, **32**(1) :19–25.
- Corzo, C.A., Condamine, T., et al., 2010 ; Hif-1 α regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *The Journal of experimental medicine*, **207**(11) :2439–2453.
- Coussens, L.M. and Werb, Z., 2002 ; Inflammation and cancer. *Nature*, **420**(6917) :860–867.
- Croci, D.O., Fluck, M.F.Z., et al., 2007 ; Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, **56**(11) :1687–1700.

- Curiel, T.J., Coukos, G., et al., 2004 ; Specific recruitment of regulatory t cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine*, **10**(9) :942–949.
- Debatin, K., Fahrig-Faissner, A., et al., 1994 ; High expression of apo-1 (cd95) on t lymphocytes from human immunodeficiency virus-1-infected children [letter]. *Blood*, **83**(10) :3101–3103.
- DeNardo, D.G., Andreu, P., et al., 2010 ; Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. *Cancer and Metastasis Reviews*, **29**(2) :309–316.
- DeNardo, D.G., Barreto, J.B., et al., 2009 ; Cd4⁺ t cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer cell*, **16**(2) :91–102.
- Desbarats, J. and Newell, M.K., 2000 ; Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. *Nature medicine*, **6**(8) :920–923.
- Dineen, S.P., Lynn, K.D., et al., 2008 ; Vascular endothelial growth factor receptor 2 mediates macrophage infiltration into orthotopic pancreatic tumors in mice. *Cancer research*, **68**(11) :4340–4346.
- Dorothee, G., Thiery, J., et al., 2004 ; Les cellules tueuses : voies lytiques et régulation. *Hématologie*, **10**(5) :355–364.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., et al., 2002 ; Cancer immunoediting : from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology*, **3**(11) :991–998.
- Dunn, G.P., Old, L.J., et al., 2004 ; The three es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.*, **22** :329–360.
- Edwards, J.P., Zhang, X., et al., 2006 ; Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *Journal of leukocyte biology*, **80**(6) :1298–1307.
- Ekmekcioglu, S., Ellerhorst, J.A., et al., 2006 ; Tumor inos predicts poor survival for stage iii melanoma patients. *International journal of cancer*, **119**(4) :861–866.
- Elliott, R.L. and Blobe, G.C., 2005 ; Role of transforming growth factor beta in human cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **23**(9) :2078–2093.
- Eyles, J., Puaux, A.L., et al., 2010 ; Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma. *The Journal of clinical investigation*, **120**(6) :2030.
- Falk, L.A., Wahl, L., et al., 1988 ; Analysis of ia antigen expression in macrophages derived from bone marrow cells cultured in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or

- macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of Immunology*, **140**(8) :2652–2660.
- Fallarino, F., Grohmann, U., et al., 2002 ; T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell death and differentiation*, **9**(10) :1069.
- Filipe-Santos, O., Bustamante, J., et al., 2006 ; Inborn errors of il-12/23-and ifn- γ -mediated immunity : molecular, cellular, and clinical features. In *Seminars in immunology*, volume 18, pages 347–361. Elsevier.
- Finnberg, N., Klein-Szanto, A.J., et al., 2008 ; Trail-r deficiency in mice promotes susceptibility to chronic inflammation and tumorigenesis. *Journal of Clinical Investigation*, **118**(1) :111–123.
- Fisher, G.H., Rosenberg, F.J., et al., 1995 ; Dominant interfering fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell*, **81**(6) :935–946.
- Fleming, B.D. and Mosser, D.M., 2011 ; Regulatory macrophages : setting the threshold for therapy. *European journal of immunology*, **41**(9) :2498–2502.
- Frumento, G., Rotondo, R., et al., 2002 ; Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of t and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2, 3-dioxygenase. *The Journal of experimental medicine*, **196**(4) :459–468.
- Fujita, T., Teramoto, K., et al., 2009 ; Inhibition of transforming growth factor- β -mediated immunosuppression in tumor-draining lymph nodes augments antitumor responses by various immunologic cell types. *Cancer research*, **69**(12) :5142–5150.
- Fulda, S., Debatin, K.M., et al., 2004 ; Signaling through death receptors in cancer therapy. *Current opinion in pharmacology*, **4**(4) :327–332.
- Fulda, S., Küfer, M.U., et al., 2001 ; Sensitization for death receptor-or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene*, **20**(41) :5865.
- Gabrilovich, D.I. and Nagaraj, S., 2009 ; Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, **9**(3) :162–174.
- Gallagher, I., Nair, M.G., et al., 2007 ; Alternative activation is an innate response to injury that requires cd4+ t cells to be sustained during chronic infection. *The Journal of Immunology*, **179**(6) :3926–3936.
- Gallo, O., Fini-Storchi, I., et al., 1998 ; Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **90**(8) :587–596.
- Galon, J., Costes, A., et al., 2006 ; Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, **313**(5795) :1960–1964.

- Galon, J., Fridman, W.H., et al., 2007 ; The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer : a novel perspective. *Cancer research*, **67**(5) :1883–1886.
- Galon, J., Pagès, F., et al., 2012 ; The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J Transl Med*, **10**(1) :1.
- Gati, A., Guerra, N., et al., 2001 ; Tumor cells regulate the lytic activity of tumor-specific cytotoxic t lymphocytes by modulating the inhibitory natural killer receptor function. *Cancer research*, **61**(8) :3240–3244.
- Geissmann, F., Jung, S., et al., 2003 ; Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, **19**(1) :71–82.
- Geissmann, F., Manz, M.G., et al., 2010 ; Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, **327**(5966) :656–661.
- Giacinti, C. and Giordano, A., 2006 ; Rb and cell cycle progression. *Oncogene*, **25**(38) :5220–5227.
- Giuntoli, R.L., Lu, J., et al., 2002 ; Direct costimulation of tumor-reactive ctl by helper t cells potentiate their proliferation, survival, and effector function. *Clinical cancer research*, **8**(3) :922–931.
- Godfrey, D.I., Hammond, K.J., et al., 2000 ; Nkt cells : facts, functions and fallacies. *Immunology today*, **21**(11) :573–583.
- Gondek, D.C., Lu, L.F., et al., 2005 ; Cutting edge : contact-mediated suppression by cd4+ cd25+ regulatory cells involves a granzyme b-dependent, perforin-independent mechanism. *The Journal of Immunology*, **174**(4) :1783–1786.
- Gordon, S. and Taylor, P.R., 2005 ; Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, **5**(12) :953–964.
- Gorelik, L. and Flavell, R.A., 2001 ; Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor- β signaling in t cells. *Nature medicine*, **7**(10) :1118–1122.
- Grage-Griebenow, E., Flad, H.D., et al., 2001 ; Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *Journal of leukocyte biology*, **69**(1) :11–20.
- Grimm, E.A., Ellerhorst, J., et al., 2008 ; Constitutive intracellular production of inos and no in human melanoma : possible role in regulation of growth and resistance to apoptosis. *Nitric Oxide*, **19**(2) :133–137.
- Hagemann, T., Robinson, S.C., et al., 2004 ; Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to tnf- α dependent up-regulation of matrix

- metalloproteases. *Carcinogenesis*, **25**(8) :1543–1549.
- Hahne, M., Rimoldi, D., et al., 1996 ; Melanoma cell expression of fas (apo-1/cd95) ligand : implications for tumor immune escape. *Science*, **274**(5291) :1363–1366.
- Hamanishi, J., Mandai, M., et al., 2007 ; Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating cd8+ t lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**(9) :3360–3365.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A., 2000 ; The hallmarks of cancer. *cell*, **100**(1) :57–70.
- Hao, C., Beguinot, F., et al., 2001 ; Induction and intracellular regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (trail) mediated apoptosis in human malignant glioma cells. *Cancer research*, **61**(3) :1162–1170.
- Hao, Z., Duncan, G.S., et al., 2008 ; Fas receptor expression in germinal-center b cells is essential for t and b lymphocyte homeostasis. *Immunity*, **29**(4) :615–627.
- Hao, Z., Hampel, B., et al., 2004 ; T cell-specific ablation of fas leads to fas ligand-mediated lymphocyte depletion and inflammatory pulmonary fibrosis. *The Journal of experimental medicine*, **199**(10) :1355–1365.
- Hao, Z. and Mak, T.W., 2010 ; Type i and type ii pathways of fas-mediated apoptosis are differentially controlled by xiap. *Journal of molecular cell biology*, **2**(2) :63–64.
- Harari, O. and Liao, J.K., 2004 ; Inhibition of mhc ii gene transcription by nitric oxide and antioxidants. *Current pharmaceutical design*, **10**(8) :893.
- Harris, S.G., Padilla, J., et al., 2002 ; Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in immunology*, **23**(3) :144–150.
- Hattori, K., Hirano, T., et al., 1998 ; Differential effects of anti-fas ligand and anti-tumor necrosis factor α antibodies on acute graft-versus-host disease pathologies. *Blood*, **91**(11) :4051–4055.
- Hazlett, L.D., McClellan, S.A., et al., 2010 ; Il-33 shifts macrophage polarization, promoting resistance against pseudomonas aeruginosa keratitis. *Investigative ophthalmology & visual science*, **51**(3) :1524–1532.
- Herberman, R.B., Holden, H.T., et al., 1978 ; *Natural cell-mediated immunity*. Academic Press.
- Hesse, M., Modolell, M., et al., 2001 ; Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo : granulomatous pathology is shaped by the pattern of l-arginine metabolism. *The Journal of Immunology*, **167**(11) :6533–6544.

- Hilchey, S.P., De, A., et al., 2007; Follicular lymphoma intratumoral cd4+ cd25+ gitr+ regulatory t cells potently suppress cd3/cd28-costimulated autologous and allogeneic cd8+ cd25- and cd4+ cd25- t cells. *The Journal of Immunology*, **178**(7) :4051–4061.
- Hohlbaum, A.M., Moe, S., et al., 2000; Opposing effects of transmembrane and soluble fas ligand expression on inflammation and tumor cell survival. *The Journal of experimental medicine*, **191**(7) :1209–1220.
- Holler, N., Tardivel, A., et al., 2003; Two adjacent trimeric fas ligands are required for fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Molecular and cellular biology*, **23**(4) :1428–1440.
- Hopkins-Donaldson, S., Ziegler, A., et al., 2003; Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by dna methylation. *Cell Death & Differentiation*, **10**(3) :356–364.
- Hsu, H., Shu, H.B., et al., 1996; Tradd-raf2 and tradd-fadd interactions define two distinct tnfr1 signal transduction pathways. *Cell*, **84**(2) :299.
- Hubert, P., Jacobs, N., et al., 2007; The cross-talk between dendritic and regulatory t cells : good or evil? *Journal of leukocyte biology*, **82**(4) :781–794.
- Hung, K., Hayashi, R., et al., 1998; The central role of cd4+ t cells in the antitumor immune response. *The Journal of experimental medicine*, **188**(12) :2357–2368.
- Hunig, T., 1983; T-cell function and specificity in athymic mice. *Immunology Today*, **4**(3) :84–87.
- Ignéy, F.H. and Krammer, P.H., 2002; Immune escape of tumors : apoptosis resistance and tumor counterattack. *Journal of leukocyte biology*, **71**(6) :907–920.
- Ignéy, F.H. and Krammer, P.H., 2005; Tumor counterattack : fact or fiction? *Cancer Immunology, Immunotherapy*, **54**(11) :1127–1136.
- Ikehara, S., Pahwa, R.N., et al., 1984; Functional t cells in athymic nude mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **81**(3) :886–888.
- Ivanov, V.N., Bhoumik, A., et al., 2003; Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. *Oncogene*, **22**(20) :3152–3161.
- Iwamoto, A., Ikeguchi, M., et al., 2006; Tumor cyclooxygenase-2 gene suppresses local immune responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Tumori*, **92**(2) :130.
- Janeway, C.A., 1989; Approaching the asymptote? evolution and revolution in immunology. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, volume 54, pages 1–13. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Janssen, E.M., Lemmens, E.E., et al., 2003 ; Cd4&plus ; t cells are required for secondary expansion and memory in cd8&plus ; t lymphocytes. *Nature*, **421**(6925) :852–856.
- Jodo, S., Pidiyar, V.J., et al., 2005 ; Cutting edge : Fas ligand (cd178) cytoplasmic tail is a positive regulator of fas ligand-mediated cytotoxicity. *The Journal of Immunology*, **174**(8) :4470–4474.
- Johnson, S., 1968 ; Effect of thymectomy on the induction of skin tumours by dibenzanthracene, and of breast tumours by dimethylbenzanthracene, in mice of the if strain. *British journal of cancer*, **22**(4) :755.
- Kaech, S.M., Wherry, E.J., et al., 2002 ; Effector and memory t-cell differentiation : implications for vaccine development. *Nature Reviews Immunology*, **2**(4) :251–262.
- Kambayashi, T., Alexander, H.R., et al., 1995 ; Potential involvement of il-10 in suppressing tumor-associated macrophages. colon-26-derived prostaglandin e2 inhibits tnfr-alpha release via a mechanism involving il-10. *The Journal of Immunology*, **154**(7) :3383–3390.
- Kamphausen, E., Kellert, C., et al., 2010 ; Distinct molecular mechanisms leading to deficient expression of er-resident aminopeptidases in melanoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, **59**(8) :1273–1284.
- Kang, T.B., Ben-Moshe, T., et al., 2004 ; Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *The Journal of Immunology*, **173**(5) :2976–2984.
- Kaplan, D.H., Shankaran, V., et al., 1998 ; Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**(13) :7556–7561.
- Kärjä, v., Aaltomaa, S., et al., 2005 ; Tumour-infiltrating lymphocytes : A prognostic factor of psa-free survival in patients with local prostate carcinoma treated by radical prostatectomy. *Anticancer research*, **25**(6C) :4435–4438.
- Karray, S., Kress, C., et al., 2004 ; Complete loss of fas ligand gene causes massive lymphoproliferation and early death, indicating a residual activity of gld allele. *The Journal of Immunology*, **172**(4) :2118–2125.
- Katz, J.B., Muller, A.J., et al., 2008 ; Indoleamine 2, 3-dioxygenase in t-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunological reviews*, **222**(1) :206–221.
- Kayagaki, N., Kawasaki, A., et al., 1995 ; Metalloproteinase-mediated release of human fas ligand. *The Journal of experimental medicine*, **182**(6) :1777–1783.
- Kelliher, M.A., Grimm, S., et al., 1998 ; The death domain kinase rip mediates the tnfr-induced nf- κ b signal. *Immunity*, **8**(3) :297–303.

- Khong, H.T. and Restifo, N.P., 2002; Natural selection of tumor variants in the generation of tumor escape phenotypes. *Nature immunology*, **3**(11) :999–1005.
- Kimberley, F.C. and Screaton, G.R., 2004; Following a trail : update on a ligand and its five receptors. *Cell research*, **14**(5) :359–372.
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., et al., 2001; Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(49) :46639–46646.
- Klein, G., Clifford, P., et al., 1966; Search for tumor-specific immune reactions in burkitt lymphoma patients by the membrane immunofluorescence reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **55**(6) :1628.
- Klimp, A., De Vries, E., et al., 2002; A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*, **44**(2) :143–161.
- Knutson, K. and Disis, M., 2005; Tumor antigen-specific t helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, **54**(8) :721–728.
- Koebel, C.M., Vermi, W., et al., 2007; Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*, **450**(7171) :903–907.
- Kolls, J.K. and Lindén, A., 2004; Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*, **21**(4) :467–476.
- Krammer, P.H., 2000; Cd95's deadly mission in the immune system. *Nature*, **407**(6805) :789–795.
- Kristiansen, J., Hendricks, O., et al., 2004; Letters from the nobellaureater paul ehrlich to the director for the state serum institute in copenhagen, thorvald madsen]. *Dansk medicinhistorisk årbog*, page 173.
- Kryczek, I., Banerjee, M., et al., 2009; Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of th17 cells in the human tumor environments. *Blood*, **114**(6) :1141–1149.
- Kryczek, I., Bruce, A.T., et al., 2008; Induction of il-17+ t cell trafficking and development by ifn- γ : mechanism and pathological relevance in psoriasis. *The Journal of Immunology*, **181**(7) :4733–4741.
- Kuper, H., Adami, H.O., et al., 2000; Infections as a major preventable cause of human cancer. *Journal of internal medicine*, **248**(3) :171–183.
- Kurahara, H., Shintani, H., et al., 2011; Significance of m2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *Journal of Surgical Research*, **167**(2) :e211–e219.

- Kurowska-Stolarska, M., Stolarski, B., et al., 2009 ; Il-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *The Journal of Immunology*, **183**(10) :6469–6477.
- Kusmartsev, S. and Gabrilovich, D.I., 2003 ; Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer : the role of reactive oxygen species. *Journal of leukocyte biology*, **74**(2) :186–196.
- Kusmartsev, S. and Gabrilovich, D.I., 2005 ; Stat1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated t cell deletion. *The Journal of Immunology*, **174**(8) :4880–4891.
- Landowski, T.H., Qu, N., et al., 1997 ; Mutations in the fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood*, **90**(11) :4266–4270.
- Lankat-Buttgereit, B. and Tampé, R., 2002 ; The transporter associated with antigen processing : function and implications in human diseases. *Physiological reviews*, **82**(1) :187–204.
- Law, R.H., Lukoyanova, N., et al., 2010 ; The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature*, **468**(7322) :447–451.
- Le Floch, A., Jalil, A., et al., 2007 ; $\alpha\epsilon\beta 7$ integrin interaction with e-cadherin promotes antitumor ctl activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis. *The Journal of experimental medicine*, **204**(3) :559–570.
- LeBlanc, H. and Ashkenazi, A., 2003 ; Apo2l/trail and its death and decoy receptors. *Cell Death & Differentiation*, **10**(1) :66–75.
- Leek, R.D., Lewis, C.E., et al., 1996 ; Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer research*, **56**(20) :4625–4629.
- Lehmann, C., Zeis, M., et al., 2000 ; Impaired binding of perforin on the surface of tumor cells is a cause of target cell resistance against cytotoxic effector cells. *Blood*, **96**(2) :594–600.
- Lengagne, R., Pommier, A., et al., 2011 ; T cells contribute to tumor progression by favoring pro-tumoral properties of intra-tumoral myeloid cells in a mouse model for spontaneous melanoma. *PloS one*, **6**(5) :e20235.
- Letellier, E., Kumar, S., et al., 2010 ; Cd95-ligand on peripheral myeloid cells activates syk kinase to trigger their recruitment to the inflammatory site. *Immunity*, **32**(2) :240–252.
- Lewis, J., Landers, R., et al., 2000 ; Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *The Journal of pathology*, **192**(2) :150–158.
- Li, B., Samanta, A., et al., 2006 ; Foxp3 ensembles in t-cell regulation. *Immunological reviews*, **212**(1) :99–113.

- Li, Y.M., Baviello, G., et al., 1997; Glycation products in aged thioglycollate medium enhance the elicitation of peritoneal macrophages. *Journal of immunological methods*, **201**(2) :183–188.
- Liang, B.C., 2010; Increased expression but not sensitivity to fas/cd95 in glioblastoma cells depleted of mitochondrial dna. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **1**(6) :1049.
- Lieberman, J., 2003; The abcs of granule-mediated cytotoxicity : new weapons in the arsenal. *Nature Reviews Immunology*, **3**(5) :361–370.
- Lin, E.Y. and Pollard, J.W., 2007; Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Research*, **67**(11) :5064–5066.
- Liu, Z.g., Hsu, H., et al., 1996; Dissection of tnfr1 effector functions : Jnk activation is not linked to apoptosis while nf- κ b activation prevents cell death. *Cell*, **87**(3) :565–576.
- Löb, S., Königsrainer, A., et al., 2009; Inhibitors of indoleamine-2, 3-dioxygenase for cancer therapy : can we see the wood for the trees? *Nature Reviews Cancer*, **9**(6) :445–452.
- Ludewig, B., Graf, D., et al., 1995; Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by trap (cd40-ligand) and tnfr1, but strongly enhanced by interleukin-10. *European journal of immunology*, **25**(7) :1943–1950.
- Mabrouk, I., Buart, S., et al., 2008; Prevention of autoimmunity and control of recall response to exogenous antigen by fas death receptor ligand expression on t cells. *Immunity*, **29**(6) :922–933.
- Mackaness, G., 1969; The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo. *The Journal of experimental medicine*, **129**(5) :973–992.
- Madhakar, M., Mhatre, S., et al., 2011; Advances in autoimmune lymphoproliferative syndromes. *European journal of haematology*, **87**(1) :1–9.
- Maecker, H.L., Yun, Z., et al., 2002; Epigenetic changes in tumor fas levels determine immune escape and response to therapy. *Cancer Cell*, **2**(2) :139–148.
- Maeda, T., Yamada, Y., et al., 1999; Fas gene mutation in the progression of adult t cell leukemia. *The Journal of experimental medicine*, **189**(7) :1063–1071.
- Maher, S., Toomey, D., et al., 2002; Activation-induced cell death : the controversial role of fas and fas ligand in immune privilege and tumour counterattack. *Immunology and cell biology*, **80**(2) :131–137.
- Mahmoud, S.M., Paish, E.C., et al., 2011; Tumor-infiltrating cd8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **29**(15) :1949–1955.

- Maleckar, J.R. and Sherman, L.A., 1987; The composition of the t cell receptor repertoire in nude mice. *The Journal of Immunology*, **138**(11) :3873–3876.
- Mantovani, A., Bottazzi, B., et al., 1992; The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunology today*, **13**(7) :265–270.
- Mantovani, A., Sica, A., et al., 2004; The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*, **25**(12) :677–686.
- Mantovani, A., Sica, A., et al., 2007; New vistas on macrophage differentiation and activation. *European journal of immunology*, **37**(1) :14–16.
- Mariani, S.M. and Krammer, P.H., 1998; Surface expression of trail/apo-2 ligand in activated mouse t and b cells. *European journal of immunology*, **28**(5) :1492–1498.
- Medema, J., De Jong, J., et al., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**(20) :11515–11520.
- Menegaz, R., Michelin, M., et al., 2008; Peri-and intratumoral t and b lymphocytic infiltration in breast cancer. *European journal of gynaecological oncology*, **29**(4) :321–326.
- Menetrier-Caux, C., Montmain, G., et al., 1998; Inhibition of the differentiation of dendritic cells from cd34+ progenitors by tumor cells : role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, **92**(12) :4778–4791.
- Menke, J., Kriegsmann, J., et al., 2012; Autocrine csf-1 and csf-1 receptor coexpression promotes renal cell carcinoma growth. *Cancer research*, **72**(1) :187–200.
- Meunier, S., Rapetti, L., et al., 2012; Synergistic cd40 signaling on apcs and cd8 t cells drives efficient cd8 response and memory differentiation. *Journal of leukocyte biology*, **91**(6) :859–869.
- Midis, G.P., Shen, Y., et al., 1996; Elevated soluble fas (sfas) levels in nonhematopoietic human malignancy. *Cancer research*, **56**(17) :3870–3874.
- Mihm Jr, M.C., Clemente, C.G., et al., 1996; Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases : a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **74**(1) :43.
- Misharin, A.V., Saber, R., et al., 2012; Eosinophil contamination of thioglycollate-elicited peritoneal macrophage cultures skews the functional readouts of in vitro assays. *Journal of Leukocyte Biology*, **92**(2) :325–331.

- Miyasaka, M. and Tanaka, T., 2004 ; Lymphocyte trafficking across high endothelial venules : dogmas and enigmas. *Nature Reviews Immunology*, **4**(5) :360–370.
- Mlecnik, B., Tosolini, M., et al., 2011 ; Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *Journal of Clinical Oncology*, **29**(6) :610–618.
- Molldrem, J.J., Lee, P.P., et al., 2003 ; Chronic myelogenous leukemia shapes host immunity by selective deletion of high-avidity leukemia-specific t cells. *Journal of Clinical Investigation*, **111**(5) :639–647.
- Mori, T., Ando, K., et al., 1997 ; Fas-mediated apoptosis of the hematopoietic progenitor cells in mice infected with murine cytomegalovirus. *Blood*, **89**(10) :3565–3573.
- Mosser, D.M., 2003 ; The many faces of macrophage activation. *Journal of leukocyte biology*, **73**(2) :209–212.
- Mosser, D.M. and Edwards, J.P., 2008 ; Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, **8**(12) :958–969.
- Movahedi, K., Guillemins, M., et al., 2008 ; Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct t cell-suppressive activity. *Blood*, **111**(8) :4233–4244.
- Munn, D.H., Mellor, A.L., et al., 2007 ; Indoleamine 2, 3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *Journal of Clinical Investigation*, **117**(5) :1147–1154.
- Murdoch, C., Muthana, M., et al., 2008 ; The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, **8**(8) :618–631.
- Nagaraj, S. and Gabrilovich, D.I., 2010 ; Myeloid-derived suppressor cells in human cancer. *The Cancer Journal*, **16**(4) :348–353.
- Nagata, S., 1997 ; Apoptosis by death factor review. *cell*, **88**(355-365) :392.
- Neeper, M., Schmidt, A., et al., 1992 ; Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **267**(21) :14998–15004.
- Ni, Y.H., Wang, Z.Y., et al., 2012 ; Effect of sirna-mediated downregulation of vegf in tca8113 cells on the activity of monocyte-derived dendritic cells. *Oncology Letters*, **3**(4) :885.
- Nicolini, A. and Carpi, A., 2009 ; Immune manipulation of advanced breast cancer : an interpretative model of the relationship between immune system and tumor cell biology. *Medicinal research reviews*, **29**(3) :436–471.

- Nishinakagawa, T., Fujii, S., et al., 2010 ; Analysis of cell cycle arrest and apoptosis induced by rcas1. *International journal of molecular medicine*, **25**(5) :717.
- Nomoto, K. and Takeya, K., 1969 ; Immunologic properties of methylcholanthrene-induced sarcomas of neonatally thymectomized mice. *Journal of the National Cancer Institute*, **42**(3) :445–453.
- O’Connell, J., O’Sullivan, G.C., et al., 1996 ; The fas counterattack : Fas-mediated t cell killing by colon cancer cells expressing fas ligand. *The Journal of experimental medicine*, **184**(3) :1075–1082.
- O’Garra, A. and Murphy, K.M., 2009 ; From il-10 to il-12 : how pathogens and their products stimulate apcs to induce th1 development. *Nature immunology*, **10**(9) :929–932.
- Ohm, J.E., Gabrilovich, D.I., et al., 2003 ; Vegf inhibits t-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood*, **101**(12) :4878–4886.
- Old, L.J. and Boyse, E.A., 1964 ; Immunology of experimental tumors. *Annual review of medicine*, **15**(1) :167–186.
- Old, L.J. et al., 1988 ; Tumor necrosis factor. *Scientific American*, **258**(5) :59.
- Onodera, T., Jang, M.H., et al., 2009 ; Constitutive expression of ido by dendritic cells of mesenteric lymph nodes : functional involvement of the ctla-4/b7 and ccl22/ccr4 interactions. *The Journal of Immunology*, **183**(9) :5608–5614.
- O’Reilly, L.A., Tai, L., et al., 2009 ; Membrane-bound fas ligand only is essential for fas-induced apoptosis. *Nature*, **461**(7264) :659–663.
- Orlinick, J.R., Elkon, K.B., et al., 1997 ; Separate domains of the human fas ligand dictate self-association and receptor binding. *Journal of Biological Chemistry*, **272**(51) :32221–32229.
- Outzen, H., Custer, R.P., et al., 1975 ; Spontaneous and induced tumor incidence in germfree" nude" mice. *Journal of the Reticuloendothelial Society*, **17**(1) :1.
- Pages, F., Berger, A., et al., 2008 ; Potential immunologic consequences of lymph node dissection in colorectal cancer. *Journal de Chirurgie*, **145** :12S6–12S12.
- Pandiyani, P., Conti, H.R., et al., 2011 ; Cd4+ cd25+ foxp3+ regulatory t cells promote th17 cells in vitro and enhance host resistance in mouse candida albicans th17 cell infection model. *Immunity*, **34**(3) :422.
- Pardoll, D., 2003 ; Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annual review of immunology*, **21**(1) :807–839.

- Passlick, B., Flieger, D., et al., 1989 ; Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*, **74**(7) :2527–2534.
- Peli, J., Schröter, M., et al., 1999 ; Oncogenic ras inhibits fas ligand-mediated apoptosis by downregulating the expression of fas. *The EMBO journal*, **18**(7) :1824–1831.
- Peranzoni, E., Zilio, S., et al., 2010 ; Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Current opinion in immunology*, **22**(2) :238–244.
- Petruson, K., Stalfors, J., et al., 2005 ; Nitric oxide production in the sphenoidal sinus by the inducible and constitutive isozymes of nitric oxide synthase. *Rhinology*, **43**(1) :18–23.
- Pipkin, M.E. and Lieberman, J., 2007 ; Delivering the kiss of death : progress on understanding how perforin works. *Current opinion in immunology*, **19**(3) :301–308.
- Prado-Garcia, H., Romero-Garcia, S., et al., 2012 ; Activation-induced cell death of memory cd8+ t cells from pleural effusion of lung cancer patients is mediated by the type ii fas-induced apoptotic pathway. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, **61**(7) :1065–1080.
- Qin, L., Ding, Y., et al., 1997 ; Adenovirus-mediated gene transfer of viral interleukin-10 inhibits the immune response to both alloantigen and adenoviral antigen. *Human gene therapy*, **8**(11) :1365–1374.
- Qin, Z. and Blankenstein, T., 2000 ; Cd4⁺ t cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on ifn- γ receptor expression by non-hematopoietic cells. *Immunity*, **12**(6) :677–686.
- Quezada, S.A., Simpson, T.R., et al., 2010 ; Tumor-reactive cd4+ t cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *The Journal of experimental medicine*, **207**(3) :637–650.
- Raftery, M.J., Schwab, M., et al., 2001 ; Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus : a multilayered viral defense strategy. *Immunity*, **15**(6) :997–1009.
- Restifo, N.P., 2000 ; Not so fas : re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape. *Nature medicine*, **6**(5) :493–495.
- Richardsen, E., Uglehus, R.D., et al., 2008 ; The prognostic impact of m-csf, csf-1 receptor, cd68 and cd3 in prostatic carcinoma. *Histopathology*, **53**(1) :30–38.
- Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., et al., 1995 ; Mutations in fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science*, **268**(5215) :1347–1349.
- Rivoltini, L., Carrabba, M., et al., 2002 ; Immunity to cancer : attack and escape in t lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunological reviews*, **188**(1) :97–113.

- Rodríguez, P.C. and Ochoa, A.C., 2008 ; Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer : mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunological reviews*, **222**(1) :180–191.
- Rodriguez, P.C., Zea, A.H., et al., 2002 ; Regulation of t cell receptor cd3 ζ chain expression byl-arginine. *Journal of Biological Chemistry*, **277**(24) :21123–21129.
- Romieu-Mourez, R., Solis, M., et al., 2006 ; Distinct roles for ifn regulatory factor (irf)-3 and irf-7 in the activation of antitumor properties of human macrophages. *Cancer research*, **66**(21) :10576–10585.
- Sade-Feldman, M., Kanterman, J., et al., 2013 ; Tumor necrosis factor- α blocks differentiation and enhances suppressive activity of immature myeloid cells during chronic inflammation. *Immunity*.
- Saito, H., Tsujitani, S., et al., 1998 ; Relationship between the expression of vascular endothelial growth factor and the density of dendritic cells in gastric adenocarcinoma tissue. *British journal of cancer*, **78**(12) :1573.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., et al., 2008 ; Regulatory t cells and immune tolerance. *Cell*, **133**(5) :775–787.
- Salazar-Onfray, F., Charo, J., et al., 1997 ; Down-regulation of the expression and function of the transporter associated with antigen processing in murine tumor cell lines expressing il-10. *The Journal of Immunology*, **159**(7) :3195–3202.
- Sato, E., Olson, S.H., et al., 2005 ; Intraepithelial cd8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high cd8+/regulatory t cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(51) :18538–18543.
- Sauer, H., Wartenberg, M., et al., 2001 ; Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **11**(4) :173–186.
- Scaffidi, C., Fulda, S., et al., 1998 ; Two cd95 (apo-1/fas) signaling pathways. *The EMBO journal*, **17**(6) :1675–1687.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., et al., 1999 ; Differential modulation of apoptosis sensitivity in cd95 type i and type ii cells. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(32) :22532–22538.
- Schneider, P., Holler, N., et al., 1998 ; Conversion of membrane-bound fas (cd95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *The Journal of experimental medicine*, **187**(8) :1205–1213.

- Schuchmann, M., Ruckert, F., et al., 2005; Mort1/fadd is involved in liver regeneration. *World Journal of Gastroenterology*, **11**(46) :7248.
- Seino, K.i., Iwabuchi, K., et al., 1998; Cutting edge : chemotactic activity of soluble fas ligand against phagocytes. *The Journal of Immunology*, **161**(9) :4484–4488.
- Seliger, B., Cabrera, T., et al., 2002; Hla class i antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. In *Seminars in cancer biology*, volume 12, pages 3–13. Elsevier.
- Serafini, P., Meckel, K., et al., 2006; Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *The Journal of experimental medicine*, **203**(12) :2691–2702.
- Serbina, N.V. and Pamer, E.G., 2006; Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor ccr2. *Nature immunology*, **7**(3) :311–317.
- Serrano, A., Castro-Vega, I., et al., 2011; Role of gene methylation in antitumor immune response : implication for tumor progression. *Cancers*, **3**(2) :1672–1690.
- Shacter, E. and Weitzman, S.A., 2002; Chronic inflammation and cancer. *Oncology*, **16**(2) :217–232.
- Shankaran, V., Ikeda, H., et al., 2001; Ifn γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, **410**(6832) :1107–1111.
- Shedlock, D.J. and Shen, H., 2003; Requirement for cd4 t cell help in generating functional cd8 t cell memory. *Science Signaling*, **300**(5617) :337.
- Sheikh, M.S., Huang, Y., et al., 1999; The antiapoptotic decoy receptor trid/trail-r3 is a p53-regulated dna damage-inducible gene that is overexpressed in primary tumors of the gastrointestinal tract. *Oncogene*, **18**(28) :4153–4159.
- Shen, Y.Q., Zhang, J.Q., et al., 2007; Low-molecular-weight protein (lmp) 2/lmp7 abnormality underlies the downregulation of human leukocyte antigen class i antigen in a hepatocellular carcinoma cell line. *Journal of gastroenterology and hepatology*, **22**(7) :1155–1161.
- Shinkai, Y. et al., 1992; Rag-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate v (d) j rearrangement. *Cell*, **68**(5) :855–867.
- Shu, H.B., Halpin, D.R., et al., 1997; Casper is a fadd-and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity*, **6**(6) :751.
- Sica, A., Saccani, A., et al., 2000; Defective expression of the monocyte chemotactic protein-1 receptor ccr2 in macrophages associated with human ovarian carcinoma. *The Journal of Immunology*, **164**(2) :733–738.

- Sica, G.L., Choi, I.H., et al., 2003 ; B7-h4, a molecule of the b7 family, negatively regulates t cell immunity. *Immunity*, **18**(6) :849–861.
- Siegel, R.M., Frederiksen, J.K., et al., 2000 ; Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science Signaling*, **288**(5475) :2354.
- Sinha, P., Chornoguz, O., et al., 2011 ; Myeloid-derived suppressor cells express the death receptor fas and apoptose in response to t cell-expressed fasl. *Blood*, **117**(20) :5381–5390.
- Sinha, P., Clements, V.K., et al., 2007 ; Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *The Journal of Immunology*, **179**(2) :977–983.
- Sironi, M., Martinez, F.O., et al., 2006 ; Differential regulation of chemokine production by fc γ receptor engagement in human monocytes : association of ccl1 with a distinct form of m2 monocyte activation (m2b, type 2). *Journal of leukocyte biology*, **80**(2) :342–349.
- Siveen, K. and Kuttan, G., 2009 ; Role of macrophages in tumour progression. *Immunology letters*, **123**(2) :97–102.
- Smyth, M.J., Crowe, N.Y., et al., 2001 ; Nk cells and nkt cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *International immunology*, **13**(4) :459–463.
- Smyth, M.J., Dunn, G.P., et al., 2006 ; Cancer immunosurveillance and immunoediting : the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Advances in immunology*, **90** :1–50.
- Smyth, M.J., Hayakawa, Y., et al., 2002 ; New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*, **2**(11) :850–861.
- Smyth, M.J., Takeda, K., et al., 2003 ; Nature's trailÑNon a path to cancer immunotherapy. *Immunity*, **18**(1) :1–6.
- Sonda, N., Chioda, M., et al., 2011 ; Transcription factors in myeloid-derived suppressor cell recruitment and function. *Current opinion in immunology*, **23**(2) :279–285.
- Sprick, M.R., Weigand, M.A., et al., 2000 ; Fadd/mort1 and caspase-8 are recruited to trail receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by trail receptor 2. *Immunity*, **12**(6) :599.
- Starling, G.C., Bajorath, J., et al., 1997 ; Identification of amino acid residues important for ligand binding to fas. *The Journal of experimental medicine*, **185**(8) :1487–1492.
- Stein, M., Keshav, S., et al., 1992 ; Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity : a marker of alternative immunologic macrophage activation.

- The Journal of experimental medicine*, **176**(1) :287–292.
- Steinberg, A.D., Roths, J.B., et al., 1980 ; Effects of thymectomy or androgen administration upon the autoimmune disease of mrl/mp-lpr/lpr mice. *The Journal of Immunology*, **125**(2) :871–873.
- Steinman, R.M. and Idoyaga, J., 2010 ; Features of the dendritic cell lineage. *Immunological reviews*, **234**(1) :5–17.
- Strand, S., Hofmann, W.J., et al., 1996 ; Lymphocyte apoptosis induced by cd95 (apo-1/fas) ligand-expressing tumor cells—A mechanism of immune evasion ? *Nature medicine*, **2**(12) :1361–1366.
- Stranges, P.B., Watson, J., et al., 2007 ; Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive t cells by fas contributes to prevention of autoimmunity. *Immunity*, **26**(5) :629–641.
- Strauss, L., Bergmann, C., et al., 2007 ; The frequency and suppressor function of cd4+ cd25highfoxp3+ t cells in the circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical Cancer Research*, **13**(21) :6301–6311.
- Street, S.E., Hayakawa, Y., et al., 2004 ; Innate immune surveillance of spontaneous b cell lymphomas by natural killer cells and $\gamma\delta$ t cells. *The Journal of experimental medicine*, **199**(6) :879–884.
- Stuart, P.M., Griffith, T.S., et al., 1997 ; Cd95 ligand (fasl)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. *Journal of Clinical Investigation*, **99**(3) :396.
- Stutman, O., 1974 ; Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science*, **183**(4124) :534–536.
- Sun, J.C. and Bevan, M.J., 2003 ; Defective cd8 t cell memory following acute infection without cd4 t cell help. *Science*, **300**(5617) :339–342.
- Sun, M., Ames, K.T., et al., 2006a ; The cytoplasmic domain of fas ligand costimulates tcr signals. *The Journal of Immunology*, **177**(3) :1481–1491.
- Sun, Y., Wang, Y., et al., 2006b ; B7-h3 and b7-h4 expression in non-small-cell lung cancer. *Lung cancer*, **53**(2) :143–151.
- Sunderkötter, C., Nikolic, T., et al., 2004 ; Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *The Journal of Immunology*, **172**(7) :4410–4417.
- Takahashi, H., Iizuka, H., et al., 2001 ; Rcas1 antigen is highly expressed in extramammary paget's disease and in advanced stage squamous cell carcinoma of the skin. *Journal of dermatological science*, **26**(2) :140–144.

- Takahashi, T., Kuniyasu, Y., et al., 1998 ; Immunologic self-tolerance maintained by cd25+ cd4+ naturally anergic and suppressive t cells : induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *International immunology*, **10**(12) :1969–1980.
- Takahashi, T., Tanaka, M., et al., 1994 ; Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the fas ligand. *Cell*, **76**(6) :969–976.
- Tanaka, M., Itai, T., et al., 1998 ; Downregulation of fas ligand by shedding. *Nature medicine*, **4**(1) :31–36.
- Tang, P., Hung, M.C., et al., 1996 ; Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry*, **35**(25) :8216–8225.
- Tanikawa, T., Wilke, C.M., et al., 2012 ; Interleukin-10 ablation promotes tumor development, growth, and metastasis. *Cancer research*, **72**(2) :420–429.
- Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., et al., 1993 ; A novel domain within the 55 kd tn timerceptor signals cell death. *Cell*, **74**(5) :845–853.
- Tartour, E., Dorval, T., et al., 1994 ; Serum interleukin 6 and c-reactive protein levels correlate with resistance to il-2 therapy and poor survival in melanoma patients. *British journal of cancer*, **69**(5) :911.
- Tecchio, C., Huber, V., et al., 2004 ; Ifn- α -stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of tn timerelated apoptosis-inducing ligand (trail/apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells. *Blood*, **103**(10) :3837–3844.
- Tefany, F.J., Barnetson, R.S., et al., 1991 ; Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in primary regressing and non-regressing malignant melanoma. *Journal of investigative dermatology*, **97**(2) :197–202.
- Teitz, T., Wei, T., et al., 2000 ; Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of mycn. *Nature medicine*, **6**(5) :529–535.
- Terrazzano, G. and Carbone, E., 2012 ; Nk cells blur the frontier between innate and acquired immunity. *Frontiers in immunology*, **3**.
- Thomas, L. and Lawrence, H., 1959 ; Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. *New York : Hoeber-Harper*, pages 529–32.
- Tibbetts, M.D., Zheng, L., et al., 2003 ; The death effector domain protein family : regulators of cellular homeostasis. *Nature immunology*, **4**(5) :404–409.
- Tosolini, M., Kirilovsky, A., et al., 2011 ; Clinical impact of different classes of infiltrating t cytotoxic and helper cells (th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer research*, **71**(4) :1263–1271.

- Trapani, J.A., Jans, D.A., et al., 1998 ; Efficient nuclear targeting of granzyme b and the nuclear consequences of apoptosis induced by granzyme b and perforin are caspase-dependent, but cell death is caspase-independent. *Journal of Biological Chemistry*, **273**(43) :27934–27938.
- Tschopp, J. and Nabholz, M., 1990 ; Perforin-mediated target cell lysis by cytolytic t lymphocytes. *Annual review of immunology*, **8**(1) :279–302.
- Tsung, K., Dolan, J.P., et al., 2002 ; Macrophages as effector cells in interleukin 12-induced t cell-dependent tumor rejection. *Cancer research*, **62**(17) :5069–5075.
- Ugurel, S., Rappl, G., et al., 2001 ; Increased soluble cd95 (sfas/cd95) serum level correlates with poor prognosis in melanoma patients. *Clinical cancer research*, **7**(5) :1282–1286.
- Vesely, M.D., Kershaw, M.H., et al., 2011 ; Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual review of immunology*, **29** :235–271.
- Wang, J., Ioan-Facsinay, A., et al., 2007 ; Transient expression of foxp3 in human activated nonregulatory cd4+ t cells. *European journal of immunology*, **37**(1) :129–138.
- Wang, Y. and Oliver, G., 2010 ; Current views on the function of the lymphatic vasculature in health and disease. *Genes & development*, **24**(19) :2115–2126.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., et al., 1992 ; Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in fas antigen that mediates apoptosis.
- Wei, Y., Fan, T., et al., 2008 ; Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, **40**(4) :278–288.
- Wohlfart, S., Sebinger, D., et al., 2004 ; Fas (cd95) mutations are rare in gastric malt lymphoma but occur more frequently in primary gastric diffuse large b-cell lymphoma. *The American journal of pathology*, **164**(3) :1081–1089.
- Wu, G., Bazer, F.W., et al., 2009 ; Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino acids*, **37**(1) :153–168.
- Wu, J., Zhou, T., et al., 1993 ; Autoimmune disease in mice due to integration of an endogenous retrovirus in an apoptosis gene. *The Journal of experimental medicine*, **178**(2) :461–468.
- Xiao, C., Yang, B.F., et al., 2002 ; Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced death-inducing signaling complex and its modulation by c-flip and ped/pea-15 in glioma cells. *Journal of Biological Chemistry*, **277**(28) :25020–25025.
- Xiao, S., Deshmukh, U.S., et al., 2004 ; Novel negative regulator of expression in fas ligand (cd178) cytoplasmic tail : evidence for translational regulation and against fas ligand

- retention in secretory lysosomes. *The Journal of Immunology*, **173**(8) :5095–5102.
- Yee, C., Thompson, J., et al., 2002 ; Adoptive t cell therapy using antigen-specific cd8+ t cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma : in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred t cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**(25) :16168–16173.
- Yeh, W.C., Itie, A., et al., 2000 ; Requirement for casper (c-flip) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity*, **12**(6) :633–642.
- Yeh, W.C., Shahinian, A., et al., 1997 ; Early lethality, functional nf- κ b activation, and increased sensitivity to tnf-induced cell death in traf2-deficient mice. *Immunity*, **7**(5) :715–725.
- Youn, J.I., Collazo, M., et al., 2012 ; Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of leukocyte biology*, **91**(1) :167–181.
- Youn, J.I., Kumar, V., et al., 2013 ; Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer. *Nature immunology*.
- Youn, J.I., Nagaraj, S., et al., 2008 ; Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *The Journal of Immunology*, **181**(8) :5791–5802.
- Young, M.R., Newby, M., et al., 1987 ; Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic lewis lung carcinoma tumors. *Cancer research*, **47**(1) :100–105.
- Yue, F.Y., Dummer, R., et al., 1997 ; Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates hla class-i, hla class-ii and icam-1 molecules. *International journal of Cancer*, **71**(4) :630–637.
- Zeidler, R., Eissner, G., et al., 1997 ; Downregulation of tap1 in b lymphocytes by cellular and epstein-barr virus-encoded interleukin-10. *Blood*, **90**(6) :2390–2397.
- Zhang, J., Cado, D., et al., 1998 ; Fas-mediated apoptosis and activation-induced t-cell proliferation are defective in mice lacking fadd/mort1. *Nature*, **392**(6673) :296–300.
- Zou, W., 2006 ; Regulatory t cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, **6**(4) :295–307.