

Université de Montréal

**Contrôle de la réponse immunitaire par
l'indoleamine 2,3-dioxygénase: étude de la régulation
d'une molécule immunosuppressive dans les cellules
cancéreuses et les lymphocytes B chez l'humain**

par

Jessica Godin-Ethier

Programme de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Doctorat
en Sciences Biomédicales

Août 2010

© Jessica Godin-Ethier, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Contrôle de la réponse immunitaire par l'indoleamine 2,3-dioxygénase:
étude de la régulation d'une molécule immuno-suppressive dans les cellules cancéreuses et
les lymphocytes B chez l'humain

Présentée par :
Jessica Godin-Ethier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean-François Gauchat, président-rapporteur
Dr Réjean Lapointe, directeur de recherche
Dr Hugo Soudeyns, membre du jury
Dr Frank Housseau, examinateur externe
Dr Gerardo Ferbeyre, représentant du doyen de la Faculté de Médecine

Résumé

Le système immunitaire se doit d'être étroitement régulé afin d'éviter que des réponses immunologiques inappropriées ou de trop forte intensité ne surviennent. Ainsi, différents mécanismes permettent de maintenir une tolérance périphérique, mais aussi d'atténuer la réponse lorsque celle-ci n'est plus nécessaire. De tels mécanismes sont cependant aussi exploités par les tumeurs, qui peuvent ainsi échapper à une attaque par le système immunitaire et donc poursuivre leur progression. Ces mécanismes immunosuppresseurs nuisent non seulement à la réponse naturelle contre les cellules tumorales, mais font aussi obstacle aux tentatives de manipulation clinique de l'immunité visant à générer une réponse anti-tumorale par l'immunothérapie.

L'un des mécanismes par lesquels les tumeurs s'évadent du système immunitaire est l'expression d'enzymes responsables du métabolisme des acides aminés dont l'une des principales est l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO). Cette dernière dégrade le tryptophane et diminue ainsi sa disponibilité dans le microenvironnement tumoral, ce qui engendre des effets négatifs sur la prolifération, les fonctions et la survie des lymphocytes T qui y sont présents. Bien que la régulation de l'expression de cette enzyme ait été largement étudiée chez certaines cellules présentatrices d'antigènes, dont les macrophages et les cellules dendritiques, peu est encore connu sur sa régulation dans les cellules tumorales humaines.

Nous avons posé l'hypothèse que différents facteurs produits par les cellules immunitaires infiltrant les tumeurs (TIIC) régulent l'expression de l'IDO dans les cellules tumorales. Nous avons effectivement démontré qu'une expression de l'IDO est induite chez les cellules tumorales humaines, suite à une interaction avec des TIIC. Cette induction indépendante du contact cellulaire résulte principalement de l'interféron-gamma (IFN- γ) produit par les lymphocytes T activés, mais est régulée à la baisse par l'interleukine (IL)-13. De plus, la fludarabine utilisée comme agent chimiothérapeutique inhibe l'induction de l'IDO chez les cellules tumorales en réponse aux lymphocytes T activés. Cette observation pourrait avoir des conséquences importantes en clinique sachant qu'une forte proportion

d'échantillons cliniques provenant de tumeurs humaines exprime l'IDO. Enfin, les lymphocytes B, qui sont retrouvés également dans certaines tumeurs et qui interagissent étroitement avec les lymphocytes T, sont aussi susceptibles à une induction transcriptionnelle et traductionnelle de l'IDO. Cette enzyme est cependant produite sous une forme inactive dans les lymphocytes B, ce qui rend peu probable l'utilisation de l'IDO par les lymphocytes B comme mécanisme pour freiner la réponse immunitaire.

Nos travaux apportent des informations importantes quant à la régulation de l'expression de la molécule immunosuppressive IDO dans les cellules cancéreuses. Ils démontrent que l'expression de l'IDO est influencée par la nature des cytokines présentes dans le microenvironnement tumoral. De plus son expression est inhibée par la fludarabine, un agent utilisé pour le traitement de certains cancers. Ces données devraient être prises en considération dans la planification de futurs essais immunothérapeutiques, et pourraient avoir un impact sur les réponses cliniques anti-tumorales.

Mots-clés

Immunothérapie

Cancer du sein

Cancer du rein

Humain

Indoleamine 2,3-dioxygénase

Lymphocytes T activés

Interféron-gamma

Interleukine-13

Lymphocytes B

Abstract

The immune system is under tight control to avoid inappropriate and excessive immunological responses. Many mechanisms allow the maintenance of peripheral tolerance and mediate attenuation of the immune response after pathogen clearance. Such mechanisms are also exploited by tumors, thereby favoring their escape from assault by the immune system. These immunosuppressive mechanisms hamper host natural immune responses against tumor cells, but also represent an obstacle to the successful clinical manipulation of the immune system in attempts to generate an anti-tumor response through immunotherapy.

One immune escape mechanism used by tumors is the production of enzymes responsible for amino acid metabolism, amongst which indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is of major importance. IDO degrades tryptophan, thus leading to its depletion from intracellular pools and local microenvironments. This culminates in multi-pronged negative effects on T lymphocytes neighboring IDO-expressing cells, notably on proliferation, function and survival. The regulation of IDO expression has been largely studied in antigen-presenting cells such as macrophages and dendritic cells, but its regulation in human tumor cells must still be characterized.

We hypothesized that different factors produced by tumor-infiltrating immune cells (TIIC) regulate IDO expression in tumor cells. Accordingly, we have demonstrated that IDO expression is induced in human tumor cells upon interaction with TIIC. This induction is cell contact-independent, and results mainly from interferon-gamma (IFN- γ) produced by activated T lymphocytes, while being antagonised by interleukin (IL)-13. Moreover, the chemotherapeutic agent fludarabine inhibits activated T lymphocyte-dependent IDO induction in tumor cells. This observation could have major clinical consequences, considering the large proportion of human cancer clinical samples expressing IDO. Finally, B lymphocytes, which interact closely with T lymphocytes and are found infiltrating human tumors, are also susceptible to transcriptional and translational IDO induction. This enzyme

is however produced in an inactive form, suggesting that B lymphocytes do not exploit this mechanism to impede the immune response.

In conclusion, our work brings crucial information on the regulation of the immunosuppressive molecule IDO in human tumor cells. We demonstrate that IDO expression is dependent on the nature of cytokines present in the tumor microenvironment. Furthermore, its expression is inhibited by fludarabine, a compound used to treat some types of cancer. These data should be taken into consideration in planning future immunotherapy trials and could impact anti-tumor clinical responses.

Keywords

Immunotherapy

Breast cancer

Kidney cancer

Human

Indoleamine 2,3-dioxygenase

Activated T lymphocytes

Interferon-gamma

Interleukin-13

B lymphocytes

Table des matières

Pages liminaires

Résumé	i
Mots-clés	iii
Abstract	iv
Keywords	vi
Table des matières	vii
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Liste des abréviations	xv

SECTION 1. INTRODUCTION

<i>Objectif général et structure de la thèse</i>	1
1.1 Le cancer et ses propriétés	1
1.1.1 Épidémiologie et limites des approches thérapeutiques.....	1
1.1.2 Traits relatifs au cancer	5
1.2 Interactions entre la tumeur et le système immunitaire	8
1.2.1 Reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire	8
1.2.2 Importance de l’infiltrat immunitaire dans le cancer : corrélation avec le pronostic.....	10
1.2.3 Réponses immunitaires contre des antigènes dérivés des tumeurs	15
1.3 Immunothérapie du cancer	20
1.3.1 Définitions et justification.....	20
1.3.2 Stratégies immunothérapeutiques	21

1.4	Les défis actuels reliés à l'immunologie des tumeurs et l'immunothérapie ...	32
1.5	Tolérance immunitaire et mécanismes d'évasion tumorale	36
1.5.1	Défauts dans la machinerie d'apprêtement et de présentation des antigènes	36
1.5.2	Perte d'antigènes tumoraux.....	38
1.5.3	Défaut de signalement par les récepteurs de mort cellulaire et expression de ligands pour les récepteurs de mort cellulaire.....	40
1.5.4	Co-inhibition et manque de co-stimulation.....	41
1.5.5	Diminution de la transduction du signal par le récepteur des cellules T	42
1.5.6	Les cellules immunorégulatrices.....	43
1.5.7	Production de molécules immunosuppressives.....	47
1.6	Indoleamine 2,3-dioxygénase	50
1.6.1	Description	50
1.6.2	Rôle de l'IDO dans l'évasion tumorale.....	52
1.6.3	Mécanismes menant à l'immunosuppression par l'IDO.....	55
1.6.4	Régulation de l'expression de l'IDO.....	62
1.6.5	Expression de l'IDO dans le cancer et pronostic	64
1.6.6	Cibler l'IDO pour améliorer l'efficacité d'une réponse anti-tumorale	69
1.6.6.1	Justification	69
1.6.6.2	Utilisation d'inhibiteurs pour bloquer l'activité de l'IDO	70
1.6.6.3	Immunothérapie dirigée contre l'IDO à l'aide de CTL	74
1.7	Objectifs du projet de doctorat.....	76

SECTION 2. MANUSCRIT 1

Human activated T lymphocytes modulate IDO expression in tumors through Th1/Th2 balance.....	78
Contribution des auteurs	79
Abstract	80
Introduction	81
Materials and Methods	84
Results	89
Discussion	96
Figures	102

SECTION 3. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

3.1 Justification	117
3.2 Matériel et Méthodes.....	122
3.3 Résultats et conclusions	126

SECTION 4. MANUSCRIT 2

IDO expression by human B lymphocytes in response to T lymphocyte stimuli is biologically inactive.....	136
Contribution des auteurs	137
Abstract	138
Introduction	139
Materials and Methods	141
Results	146
Discussion	149
Figures	153

SECTION 5. DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

5.1	L'expression de l'IDO dans les cellules tumorales humaines est régulée par la balance entre les cytokines Th1 et Th2 présente dans l'environnement tumoral.....	161
5.1.1	Objectifs accomplis et critique des résultats	161
5.1.2	Perspectives et conclusions.....	166
5.2	Inhibition de l'expression de l'IDO dans les cellules tumorales humaines par la fludarabine.....	168
5.2.1	Objectifs accomplis et critique des résultats	168
5.2.2	Perspectives à court et à long terme.....	170
5.3	Expression de l'IDO par les lymphocytes B humains.....	177
5.3.1	Objectifs accomplis et critique des résultats	177
5.3.2	Perspectives et conclusions.....	178
5.4	Conclusions générales.....	181
	BIBLIOGRAPHIE	182
	ANNEXE 1	213

Liste des tableaux

SECTION 1. INTRODUCTION

Tableau 1.	Paramètres cliniques corrélant avec une forte expression de l'IDO dans des cancers de différents types histologiques.....	65
------------	---	----

Liste des figures

SECTION 1. INTRODUCTION

Figure 1	Taux d'incidence et de mortalité du cancer du sein, pour les femmes au Canada entre 1980 et 2009.....	3
Figure 2	Les six traits fondamentaux du cancer.....	7
Figure 3	Présentation antigénique classique par les cellules tumorales et présentatrices d'antigènes.....	19
Figure 4	Génération de lymphocytes T anti-tumoraux utilisés pour le transfert adoptif.....	30
Figure 5	Les six étapes nécessaires pour une réponse anti-tumorale efficace impliquant les lymphocytes T CD8 ⁺	35
Figure 6	Mécanismes moléculaires responsables des déficiences en CMH de classe I.....	39
Figure 7	Mécanismes d'immunosuppression médiés par l'IDO.....	57
Figure 8	Métabolisme du tryptophane par la voie de la kynurénine.....	59
Figure 9	Structure moléculaire du tryptophane et de molécules analogues.....	71

SECTION 2. MANUSCRIT 1

Figure 1 ^{m1}	Infiltration of activated T lymphocytes in breast and kidney tumors.	102
Figure 2 ^{m1}	Th1-polarized T cells infiltrate kidney cancers.....	103
Figure 3 ^{m1}	Immune cells prepared from RCC induce IDO expression in renal carcinoma cell line.	104
Figure 4 ^{m1}	Activated T cells induce IDO expression in human breast and kidney cancer cell lines.....	105
Figure 5 ^{m1}	IDO-expressing tumor cells decrease T cell functions.	107
Figure 6 ^{m1}	IDO is expressed from human breast and kidney cancers.	109

Figure 7 ^{m1}	IDO expression in tumors is modulated by Th1/Th2 cytokine balance.....	111
Supplemental figure 1 ^{m1}	Phenotyping of immune cell populations in breast and renal cell carcinoma samples.	113
Supplemental figure 2 ^{m1}	IDO is expressed in breast and kidney cancer lines in response to IFN- γ	114
Supplemental figure 3 ^{m1}	IDO induction in tumor lines is cell-contact independent	115
Supplemental figure 4 ^{m1}	Cytokine secretion profile of activated T cells	116

SECTION 3. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

Figure 10	Signalement par la voie JAK-STAT en réponse à l'IFN- γ	119
Figure 11	Activation de STAT1 et STAT6 en réponse aux surnageants de lymphocytes T activés.....	127
Figure 12	Inhibition de STAT1 dans les PBMC par la fludarabine	130
Figure 13	Inhibition de l'induction de l'IDO dépendante de l'IFN- γ par la fludarabine dans des lignées cellulaires tumorales.	131
Figure 14	Inhibition par la fludarabine de l'expression de l'IDO induite dans des lignées cellulaires tumorales exposées à des surnageants de lymphocytes T ou de TIL activés.	134

SECTION 4. MANUSCRIT 2

Figure 1 ^{m2}	IDO mRNA induction in human B lymphocytes.....	153
Figure 2 ^{m2}	IDO protein expression in B lymphocytes.....	155
Figure 3 ^{m2}	IDO and CD20 co-expression	156
Figure 4 ^{m2}	Functional assessment of IDO produced by B cells	157
Supplemental figure 1 ^{m2}	IDO protein induction in activated T cell supernatant.....	158

SECTION 5. DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

Figure 15	Mécanisme de suppression dépendant des MDSC.....	165
Figure 16	Modèle <i>in vitro</i> antigène-spécifique pour mesurer les effets de la fludarabine sur l'IDO	175

Liste des abréviations

- 1-MT**, 1-méthyltryptophane
ADN, acide désoxyribonucléique
AML, acute myeloid leukemia, leucémie myéloïde aïgue
APC, antigen presenting cell, cellule présentatrice d'antigène
ARG, arginase
ARNm, acide ribonucléique messenger
ARNt, acide ribonucléique de transfert
AT, antigène tumoral
CD40L, CD40 ligand
CMH, complexe majeur d'histocompatibilité
CTL, cytotoxic T lymphocyte, lymphocyte T cytotoxique
CTLA-4, cytotoxic T lymphocyte antigen-4
DC, dendritic cell, cellule dendritique
ER, estrogen receptor, récepteur d'œstrogène
FasL, Fas ligand
FoxP3, forkhead box P3
GAS, interferon- γ -activated site
GCN2, general control non-depressible 2
GITR, glucocorticoid-induced TNFR-related protein
GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HLA, human leukocyte antigen
HER-2, human epidermal growth factor receptor 2
IDO, indoleamine 2,3-dioxygénase
ICC, immunocytochimie
IHC, immunohistochimie
IL, interleukine

IFN, interferon
IRF-1, interferon regulatory factor-1
JAK, janus-activated kinase
LMP, low-molecular weight protein
LN, lymph node, ganglion lymphatique
LPS, lipopolysaccharide
M-CSF, macrophage colony-stimulating factor
MDSC, myeloid-derived suppressor cell, cellule suppressive myéloïde
MMTV, mouse mammary tumor virus
MTH, methyl-thiohydantoin
NK, natural killer
NOS, nitric-oxide synthase
PBMC, peripheral-blood mononuclear cells, cellules mononucléées du sang périphérique
PD-1, programmed death receptor-1
PDL-1, programmed death receptor-ligand 1
PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase
PKC- δ , protéine kinase C-delta
PMA, phorbol myristate acétate
PR, progesterone receptor, récepteur de progestérone
RAG, recombinase activating gene, gène activateur de la recombinaison
RE, réticulum endoplasmique
STAT, signal transducer and activator of transcription
TAA, tumor-associated antigen, antigène associé aux tumeurs
TAL, tumor-associated lymphocyte
TAM, tumor-associated macrophage, macrophage associé aux tumeurs
TAP, transporter associated with antigen processing
TCR, T cell receptor, récepteur de cellule T
TDNL, tumor-draining lymph node, ganglion lymphatique drainant la tumeur
TDO, tryptophane 2,3-dioxygénase

TGF- β , transforming growth factor-beta

TIL, tumor-infiltrating lymphocyte, lymphocyte infiltrant les tumeurs

TIIC, tumor infiltrating immune cell, cellule immunitaire infiltrant la tumeur

TNF, tumor necrosis factor

TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand

Treg, lymphocyte T régulateur

VEGF, vascular endothelial growth factor

Remerciements

Cette thèse de doctorat est le fruit de beaucoup d'efforts et de travail et sa réalisation n'aurait pas été possible sans la contribution de plusieurs personnes. Je tiens donc à souligner l'apport de tous ceux qui ont participé de près ou de loin au projet, ou ayant été présents au fil de mon parcours.

Mes tous premiers remerciements vont à mon directeur de recherche, le Dr Réjean Lapointe, qui m'a permis d'embarquer dans cette belle aventure que sont les études graduées. Il a su, depuis le début, me transmettre sa curiosité scientifique, mais surtout sa passion sans borne pour l'immunothérapie du cancer.

Merci à chacun des membres passés et actuels du laboratoire, qui, de par leur personnalité unique auront contribué à faire du labo Lapointe ma deuxième famille. Merci à Laïla-Aïcha Hanafi, la meilleure stagiaire qui soit et maintenant une étudiante au doctorat accomplie, pour toute son aide et son dévouement; à Cécile Grange, pour son brin de folie et sa bonne humeur contagieuse; à Alexandre Reuben pour son humour que j'apprécie beaucoup et pour le temps qu'il consacre sans compter à corriger nos textes en anglais; à Jean-Daniel Doucet qui a été un modèle d'inspiration pour moi; à Dominique Gauchat pour tout le travail qu'elle accomplit, mais surtout pour avoir pris le relais pendant ma rédaction; à Urszula Krzemien de m'avoir rendu la tâche beaucoup plus facile de par son travail. Un merci tout particulier à deux personnes qui ont occupé une place spéciale depuis le début de mes études graduées, Marie-Andrée Forget et Philippe O. Gannon. Ils auront fait parti de cette aventure avec moi du début à la fin, et je les remercie pour tous les moments que nous avons traversés ensemble. Merci aux anciens du labo, dont Simon Turcotte, notre « petit chirurgien » qui nous a permis de voir à travers son œil de clinicien; Sandy Pelletier dont la présence au labo me manque encore, à Stéphanie Lepage et Diane Beauseigle qui ont grandement facilité mes débuts dans le labo.

Je tiens aussi à remercier plusieurs personnes qui ont contribué à l'avancement de mes travaux, et sans qui ce projet n'aurait pas été possible. Merci au Dr Nathalie Grandvaux et à son étudiante Karin Fink qui m'ont été d'une aide précieuse pour les expériences de signalement cellulaire. Un grand merci à Jean-Baptiste Duvignaud, qui a rendu possible les analyses par HPLC malgré son emploi du temps très chargé, et à Dr Denis Leclerc pour sa collaboration.

Enfin, j'aimerais remercier certaines personnes de mon entourage qui ont été très importantes dans mon parcours. D'abord, merci à Martine et Stéphanie, avec qui mon cheminement dans le monde de la science a débuté. Elles ont été des amies précieuses qui ont toujours été là pour comprendre les émotions à travers lesquelles on peut passer pendant des études graduées.

Un énorme merci à mes parents, Chantal et Michel, de m'avoir toujours encouragée à faire ce que j'aime dans la vie, et surtout pour avoir cru en moi et en mes capacités. Je suis très reconnaissante de tout le support qu'ils m'ont apporté au fil des ans et ce, d'autant de façons qu'ils l'ont pu.

Finalement, je remercie mon amoureux Frédéric, de m'avoir rendu la tâche plus facile au quotidien par ses encouragements constants, son écoute, sa patience et son positivisme à toute épreuve. Et c'est sans compter le précieux soutien informatique qu'il m'a fourni tout au long de mon doctorat! Partager la vie de quelqu'un qui fait un doctorat ça impose certains sacrifices et je le remercie de les avoir faits pour moi.

SECTION 1. INTRODUCTION

Objectif général et structure de la thèse

L'objectif général de ce projet de doctorat consiste à étudier les éléments régulateurs de l'expression d'une molécule immuno-suppressive, l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) dans les cellules cancéreuses humaines et dans les lymphocytes B. La SECTION 1 met en contexte les travaux réalisés et recense la littérature en lien avec les travaux de recherche accomplis. La SECTION 2 est constituée d'un manuscrit publié rapportant les résultats de notre étude sur les facteurs influençant la régulation de l'expression de l'IDO dans les cellules tumorales humaines. La SECTION 3 comporte des résultats complémentaires à la section 2, décrivant la régulation négative de l'expression de l'IDO dans les cellules tumorales humaines lorsqu'elles sont traitées avec un agent chimiothérapeutique, la fludarabine. La SECTION 4, aussi présentée sous forme de manuscrit, mais cette fois-ci non publié, fait le point sur la régulation de l'expression et de l'activité de l'IDO dans une population de cellules immunitaires, les lymphocytes B.

1.1 Le cancer et ses propriétés

1.1.1 Épidémiologie et limites des approches thérapeutiques

Le cancer est la première cause de mortalité au Canada, devant les maladies cardiovasculaires, selon des données récentes de la Société canadienne du Cancer. On estime à plus de 171 000 le nombre de nouveaux cas de cancer annuel au Canada et à plus de 75 000 le nombre de décès (1). Selon les taux d'incidence et de mortalité actuels, les probabilités d'être atteint d'un cancer au cours de sa vie se situent entre 40 et 45%, et un Canadien sur quatre risque d'en mourir.

Deux des principaux types de cancers qui serviront de modèle pour cette étude, soit les cancers du sein et du rein, sont aussi liés à des statistiques désolantes. Le cancer du sein est celui ayant la plus forte incidence chez la femme. Bien que le taux de mortalité qui lui est attribuable soit en baisse (Figure 1), entre autres en raison de la détection plus précoce rendue possible grâce aux mammographies, le cancer du sein reste le deuxième plus mortel chez la femme. De plus, le taux de survie chez les femmes atteintes âgées entre 20 et 39 ans au moment du diagnostic est le plus faible parmi tous les groupes d'âges se situant entre 20 et 79 ans (1). Ces statistiques témoignent du fait que les traitements actuels, bien qu'ils aient une efficacité grandissante et contribuent à la tendance à la baisse du taux de mortalité, échouent encore dans de nombreux cas. De plus, les possibilités de traitements sont limitées pour certains cas. Les approches thérapeutiques envisageables sont déterminées en fonction de certains paramètres clinico-pathologiques permettant de classifier les carcinomes mammaires et étant d'importants facteurs prédictifs de la survie des patients. D'une part, différents stades cliniques peuvent être attribués à ces cancers selon 3 critères : la taille de la tumeur primaire (T), le nombre de ganglions axillaires atteints par les cellules cancéreuses (N), et la présence de métastases à distance (M), référé comme étant la classification TNM. Dans les cas de cancers invasifs, la chirurgie ne peut être envisagée, ce qui limite les options de traitement pour ces patientes. D'autre part, les tumeurs peuvent aussi être caractérisées par la présence de récepteurs hormonaux dont les récepteurs à œstrogène (ER) et à progestérone (PR), ou par la surexpression du récepteur *human epidermal growth factor receptor 2* (HER-2). Ces patientes peuvent alors bénéficier de thérapies adjuvantes comme l'hormonothérapie destinée à empêcher les hormones de contribuer à la croissance des cellules tumorales et l'Herceptin® qui constitue une thérapie ciblée visant à éliminer les cellules qui surexpriment HER-2. Malheureusement, pour les cas dits « triples négatifs », ces options supplémentaires de traitements ne sont d'aucune utilité.

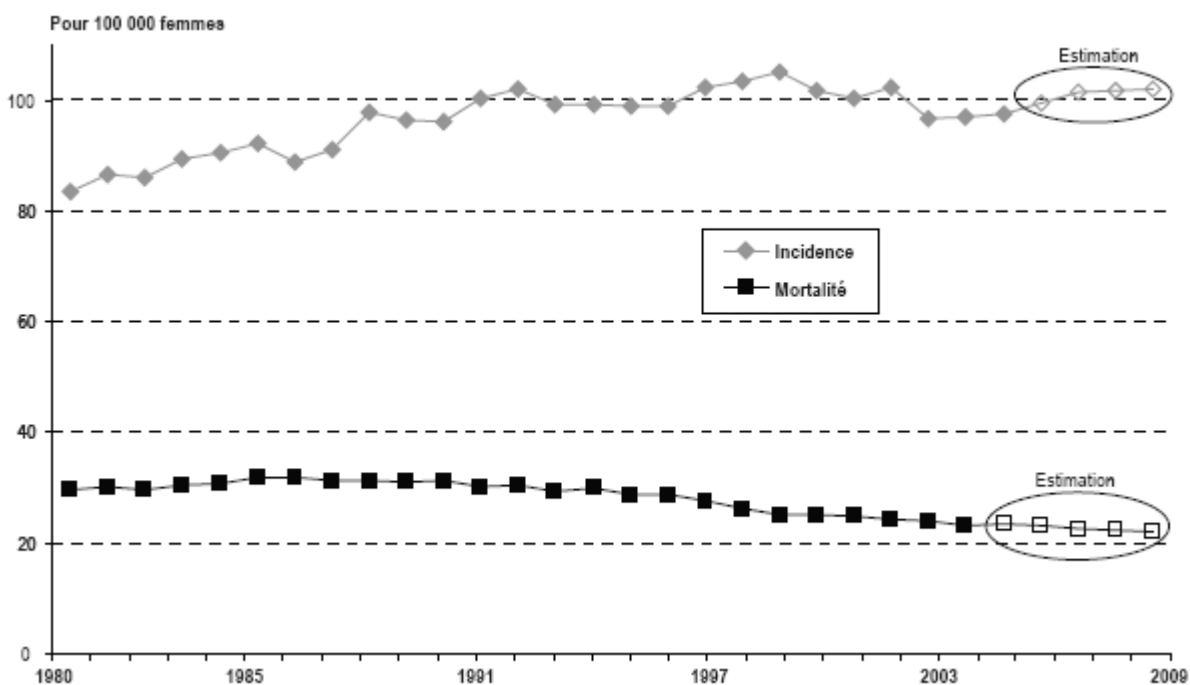


Figure 1 Taux d'incidence et de mortalité du cancer du sein, pour les femmes au Canada entre 1980 et 2009.

Légende: Taux d'incidence et de mortalité normalisés selon l'âge. Les taux sont corrigés en prenant pour référence la population canadienne de 1991. Des données estimatives sont utilisées pour l'incidence entre 2006 et 2009 et pour la mortalité entre 2005 et 2009 (2).

Les carcinomes mammaires représentent 98% des cancers du sein et sont catégorisés comme infiltrants ou *in situ* selon qu'ils envahissent ou non le tissu conjonctif avoisinant. Ces carcinomes peuvent se développer à partir des cellules épithéliales des canaux ou des lobes de la glande mammaire pour former respectivement des carcinomes canaux ou lobulaires. Différents facteurs de risque sont associés à l'apparition de cette pathologie. Une composante génétique est à l'origine d'un faible pourcentage des cas (5 à 10%), attribuables à des mutations sur certains gènes dont BRCA1 et BRCA2. Des facteurs hormonaux jouent aussi un rôle dans la susceptibilité au cancer du sein. La fenêtre d'exposition aux œstrogènes, regroupant plusieurs facteurs comme l'âge à laquelle surviennent les premières règles et la ménopause, le nombre de grossesses, mais surtout l'âge à la première grossesse, a une forte influence sur l'incidence de ce cancer.

Le cancer du rein a quant à lui une fréquence moins élevée dans la population Canadienne, puisqu'on estime à 4800 le nombre de nouveaux cas de cancer du rein qui surviendront en 2010. Ce cancer entraîne cependant des conséquences dramatiques chez les patients qui en sont atteints puisque environ 34% d'entre eux en décèderont dans les 5 années suivant le diagnostique (1). Ce taux de mortalité atteint 90% pour les patients présentant des métastases. Puisque les tumeurs primaires et les métastases sont chimio- et radio-résistantes, la chirurgie reste le traitement principal pour ce type de cancer, mais son rôle est limité dans les cas de cancers métastatiques.

Différents facteurs de risque contribuent au développement du cancer du rein, dont des troubles génétiques reliés à la maladie de von Hippel-Lindau, l'obésité, et le tabagisme. Plusieurs facteurs permettent d'établir un pronostic chez les patients atteints d'un cancer du rein, dont le type de tumeur. Le carcinome à cellules rénales qui représente plus de 90% des cas de cancer du rein, regroupe différents sous-types dont le carcinome à cellules claires, le carcinome des tubes collecteurs et le sarcome à cellules rénales étant associés au pronostic le moins favorable, ainsi que les types papillaire et chromophile annonçant un meilleur pronostic. Le grade qui fait état du niveau de différenciation des cellules cancéreuses

influence aussi le pronostic des patients. Enfin, le stade est le facteur prédictif le plus important et est établi selon une classification TNM similaire à celle du cancer du sein bien que les critères de taille soient différents.

1.1.2 Traits relatifs au cancer

Bien qu'elles se développent dans des organes différents, les tumeurs sont le fruit d'un événement commun; les altérations génétiques. L'accumulation de ces altérations amorce un processus de transformation des cellules normales menant progressivement à des cellules ayant un potentiel malin. Selon ce qui a été proposé par Hanahan et Weinberg il y a une dizaine d'années (3), les tumeurs, quelle que soit leur origine, développent des propriétés intrinsèques qui selon eux sont universelles. Dans leur modèle, six traits fondamentaux sont attribués aux cancers et consistent en une autosuffisance en facteurs de croissance, une insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, une évvasion de la mort cellulaire programmée (apoptose), un potentiel réplicatif illimité, une angiogénèse soutenue et une invasion tissulaire ainsi qu'un potentiel métastatique (Figure 2).

Plusieurs de ces traits fondamentaux peuvent être reliés par l'inflammation, une composante importante de l'environnement tumoral communément retrouvée dans une multitude de cancers. L'inflammation peut d'une part être présente avant toute transformation maligne et ainsi être à la source de l'apparition de certains types de tumeurs (4,5). À l'inverse, certaines tumeurs peuvent induire un microenvironnement inflammatoire qui à son tour favorisera la croissance tumorale. Ces conditions inflammatoires agissent de plusieurs façons pour promouvoir la progression tumorale, entre autres en aidant à la survie des cellules malignes, en favorisant l'angiogénèse et la formation de métastases, et en altérant la réponse immunitaire adaptative. Parmi la gamme de molécules impliquées dans l'inflammation liée au cancer, certaines peuvent être identifiées comme des molécules endogènes clés, dont certains facteurs de transcription comme le NF- κ B. Ce dernier peut

être activé suite à des altérations génétiques dans les cellules tumorales (6) et son activation constitutive est communément retrouvée dans plusieurs cancers humains (revu dans (7)). NF- κ B étant connu pour réguler l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la promotion du cancer (8,9), son expression constitutive joue un rôle déterminant dans la progression tumorale.

Parallèlement aux traits communs qui gouvernent la tumorigénèse, chaque tumeur revêt un caractère unique. La littérature fournit d'ailleurs des évidences que les cancers sont empreints d'une grande variabilité d'un individu à l'autre, même en appartenant au même type histologique. Une étude menée sur 65 échantillons cliniques de cancer du sein humain prélevés chez 42 individus avant et après avoir reçu un traitement de chimiothérapie en est d'ailleurs un bon exemple. Selon le profil d'expression des gènes déterminé à l'aide de micro-puces à ADN, les échantillons indépendants prélevés à 16 semaines d'intervalle chez un même patient avant et après l'administration d'un agent chimiothérapeutique ont plus de ressemblances entre eux qu'avec n'importe quel autre échantillon analysé (10). Ces observations se transposent aussi pour des échantillons provenant de mêmes patients, mais prélevés à des sites anatomiques différents. En effet, les cellules cancéreuses prélevées de la tumeur primaire ou des métastases ganglionnaires ont un profil d'expression génique plus apparenté entre elles qu'avec tous les autres échantillons auxquels elles ont été comparées (10).

Ces caractéristiques propres au cancer de chaque individu mettent en évidence le fait qu'en plus d'acquies des propriétés intrinsèques, les tumeurs acquies aussi des propriétés extrinsèques. Celles-ci sont le produit des interactions qui surviennent entre les cellules cancéreuses et certaines cellules de l'hôte. Plus précisément, le système immunitaire est en étroite communication avec les cellules cancéreuses et influence de façon unique la progression tumorale.

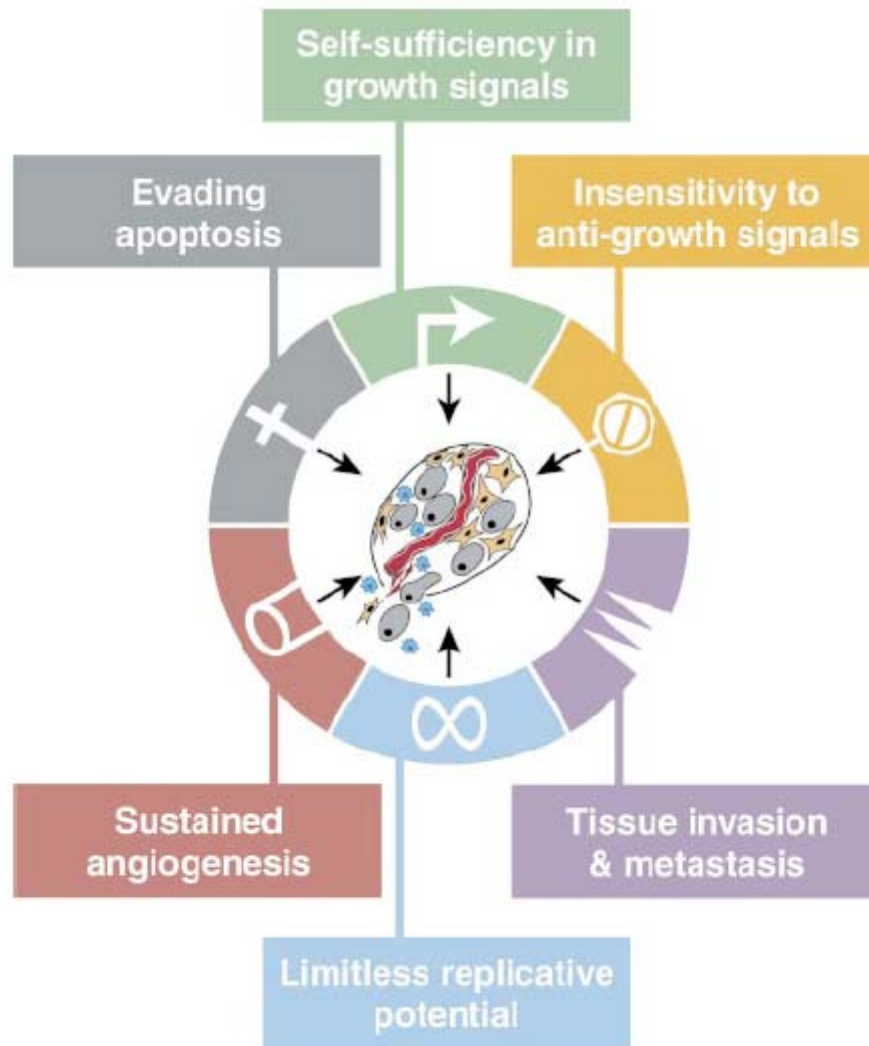


Figure 2 Les six traits fondamentaux du cancer. (Figure tirée de (3))

Légende: Schéma représentatif de l'hypothèse selon laquelle la grande majorité sinon tous les cancers acquièrent six caractéristiques fonctionnelles durant leur développement, mais selon des stratégies mécanistiques différentes.

1.2 Interactions entre la tumeur et le système immunitaire

1.2.1 Reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire

La théorie selon laquelle le système immunitaire possède la capacité d'interagir avec les cellules tumorales et puisse affecter le cours de la tumorigénèse en s'attaquant aux cellules tumorales de la même façon qu'il s'attaque aux agents infectieux a longtemps été controversé. L'idée que l'immunité puisse protéger l'hôte contre l'apparition de néoplasmes a été proposée par Ehrlich en 1909. Une cinquantaine d'années plus tard, le terme d'immuno-surveillance est apparu, alors que Thomas et Burnet ont proposé que l'élimination de cellules transformées, dont l'apparition survenait de façon continue, était rendue possible grâce aux lymphocytes. Une incidence accrue de tumeurs chez les individus ayant une dysfonction immunitaire supportait d'ailleurs cette théorie. Ce concept n'a cependant pas perduré lorsque Stutman a mis en évidence le fait que des souris "nude" dépourvues de thymus ne développaient pas plus de tumeurs spontanées ou induites par un agent chimique, le méthylcholanthrène, que les souris contrôles (11).

La théorie initiale de l'immunosurveillance a finalement été ravivée il y a une dizaine d'années, grâce à différents modèles de souris knock-out pour une variété de composantes immunologiques dont l'interféron-gamma (IFN- γ), le récepteur de l'IFN- γ (IFN- γ R), la perforine, le gène activateur de la recombinaison (RAG)-2 et STAT1. Les souris ne possédant pas de lymphocytes ou ayant une signalisation par l'IFN- γ altérée sont plus susceptibles de développer des sarcomes et des lymphomes spontanés ou induits par un carcinogène, ainsi que plus de tumeurs d'origine épithéliales spontanées (12,13). Les souris déficiente en perforine développent quant à elles un plus haut taux de lymphomes et d'adénocarcinomes du poumon (12,14). Les discordances entre ces résultats et ceux des études antérieures s'expliquent par le fait que la souris athymique, bien qu'elle ne possède pas de lymphocytes T, est dotée de cellules *natural killer* (NK). Ce type cellulaire possède en effet des propriétés leur permettant d'éliminer les cellules tumorales. Elles sont d'une

part pourvues de récepteurs inhibiteurs dont les ligands sont des molécules de classe I du CMH (15). L'interaction entre ces récepteurs des cellules NK avec des cellules présentant une expression de CMH de classe I représente un important point de contrôle pour l'activation des cellules NK. Les cellules tumorales ayant généralement un niveau réduit de molécules de classe I du CMH, elles ne fournissent pas les signaux inhibiteurs aux cellules NK. Leur activation dépend cependant aussi des signaux dérivés de l'interaction entre leurs récepteurs activateurs et leur ligand, ceux-ci étant surexprimés par les cellules tumorales alors qu'ils ne sont généralement pas exprimés chez les cellules normales (16). Cette combinaison entre les signaux activateurs et l'absence de signaux inhibiteurs confère aux cellules NK un potentiel cytotoxique envers les cellules tumorales.

Une étude réalisée par Schreiber chez des souris RAG-2^{-/-}, gène nécessaire au développement des lymphocytes matures et fonctionnels, a démontré que les tumeurs prélevées chez ces souris étaient plus facilement éliminées lorsqu'implantées chez des souris de type sauvage, comparativement aux tumeurs des souris contrôles (13). Ces résultats ont été interprétés comme une évidence d'un modelage des tumeurs par le système immunitaire. Les variant tumoraux les plus immunogéniques étant éliminés par les lymphocytes, ils laissent place aux cellules tumorales ayant des propriétés leur permettant d'échapper au système immunitaire. Ainsi, Schreiber et ses collègues ont élaboré la théorie de l'immunoediting qui tient compte des 3 étapes menant à la progression tumorale : Élimination, Équilibre et Évasion (17). Selon cette théorie, l'élimination correspond au concept initial d'immuno-surveillance; l'équilibre représente le processus par lequel des cellules tumorales sont éliminées par le système immunitaire, mais entraîne l'émergence de variants tumoraux possédant de meilleures capacités à survivre à une attaque par le système immunitaire; et l'évasion se décrit par une expansion incontrôlée de la tumeur chez un hôte immunocompétent.

1.2.2 Importance de l'infiltrat immunitaire dans le cancer : corrélation avec le pronostic

L'invasion lymphocytaire de la masse tumorale est un trait commun de plusieurs tumeurs solides humaines et est d'une importance primordiale pour la défense de l'hôte contre le développement de néoplasmes. L'une des évidences les plus marquées du rôle que joue le système immunitaire dans la lutte contre le cancer est la forte association entre une présence accrue de lymphocytes T effecteurs infiltrant la tumeur et un meilleur pronostic pour les patients (18). Cependant, plusieurs facteurs relatifs à l'infiltrat, dont la densité, le type cellulaire et la localisation, interviennent sur l'impact de celui-ci sur la progression tumorale et ainsi sur le pronostic des patients.

Densité

L'infiltrat immunitaire peut être défini en termes de densité cellulaire qui est généralement représentée selon 3 intensités : absente/faible, modérée et abondante. Cette densité peut être une mesure globale de la présence intratumorale de cellules immunitaires ou elle peut être déterminée pour une population précise de cellules immunitaires comme les lymphocytes T. Il est d'ailleurs bien documenté qu'une densité élevée de leucocytes ou de lymphocytes T CD3⁺ infiltrant les tumeurs corrèle avec une augmentation de la survie des patients, dans plusieurs types de cancers humains (19-21). La présentation antigénique par les cellules tumorales pourrait être déterminante pour l'abondance des cellules immunitaires infiltrantes. En effet, une association positive entre la densité des lymphocytes T intratumoraux et l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I a été démontrée (22).

Cependant, la densité n'est pas le seul facteur à prendre en considération quant à l'influence que peuvent avoir les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL). En effet, un infiltrat immunitaire abondant est l'indicateur d'une survie significativement prolongée

chez des patients âgés de moins de 50 ans atteints d'un cancer du sein, alors qu'il n'influence pas la survie chez les 50 ans et plus (23). Cette observation met en évidence le fait que la densité à elle seule ne suffit pas à bloquer la progression et la dissémination de la tumeur. Il est possible qu'une densité similaire de cellules immunitaires soit retrouvée à la fois dans les cancers à apparition précoce ou tardive, mais que la composition de l'infiltrat diffère entre ces deux groupes. De plus, des défauts dans les fonctions effectrices de ces cellules immunitaires peuvent survenir chez les patients d'un âge avancé et affecter négativement la réponse anti-tumorale (revu dans (24)).

Type cellulaire et état d'activation

La démonstration faite d'une association entre la densité globale de l'infiltrat immunitaire et la survie des patients, est contredite par d'autres études (25). Ces dernières ont plutôt permis d'établir un lien entre la survie des patients et la proportion des différents sous-types de cellules immunitaires présentes dans le tissu tumoral ou l'expression de certains marqueurs d'activation à leur surface. En effet, l'infiltrat immunitaire peut être composé d'une variété de types cellulaires, n'ayant pas tous les propriétés nécessaires à l'élimination des cellules tumorales, selon leur phénotype. Ainsi, la balance entre les cellules effectrices et les cellules régulatrices apparaît comme étant un facteur déterminant dans le rôle joué par l'infiltrat immunitaire sur la progression tumorale.

Il a été suggéré qu'un meilleur pronostic est retrouvé chez les patients présentant une fréquence élevée de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques. Non seulement la fréquence absolue de CD8⁺, mais un ratio élevé de ceux-ci par rapport aux CD4⁺ corrèle avec une meilleure survie des patients (25). Dans le cancer du sein, la présence accrue des lymphocytes T CD4⁺ est fréquemment rapportée comme étant un facteur promouvant la progression tumorale. Ainsi, l'abondance de l'infiltrat de lymphocytes T CD4⁺ reflète le statut métastatique des ganglions lymphatiques (26). Ces observations peuvent être dues au fait que les lymphocytes T CD4⁺ comportent une sous-population de lymphocytes T

régulateurs (Treg) $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, qui suppriment la réponse immunitaire. D'ailleurs, une présence accrue de Treg infiltrant les tumeurs est détectée dans une variété de cancers (27). De plus, cette accumulation substantielle retrouvée principalement dans les cancers de stades avancés corrèle de façon inverse avec la survie des patients et s'avère être un facteur pronostique indépendant (28).

D'autre part, afin d'être en mesure d'accomplir leurs fonctions, les cellules immunitaires intratumorales doivent être préalablement activées. Cet état d'activation peut être mesuré grâce à l'expression de certains marqueurs à la surface des cellules comme le HLA-DR. Ce marqueur serait d'ailleurs retrouvé à la surface des lymphocytes infiltrant les tumeurs les moins agressives, alors qu'une plus faible expression de ce marqueur a été notée chez les cas de cancers plus invasifs (29). Sa présence a donc été associée avec une diminution de la progression de la maladie.

De plus, les fonctions des cellules immunitaires dépendent des cytokines qu'elles produisent. Les cytokines sont donc un facteur important à considérer dans l'analyse du profil des TIL. Par exemple, il a été observé que les lymphocytes T $CD4^+$ infiltrant des mélanomes peu agressifs produisent des cytokines typiques d'une réponse inflammatoire Th1 comme l'IFN- γ , l'interleukine (IL)-2 et l'IL-15, alors que les tumeurs plus malignes sont infiltrées par des $CD4^+$ produisant des cytokines comme le *transforming growth factor-beta* (TGF- β) et l'IL-10 (30).

Localisation

Les TIL peuvent être retrouvés non seulement dans l'épithélium tumoral, mais aussi dans le stroma qui l'entoure. Cependant, selon leur localisation, ces cellules infiltrantes n'ont pas toutes le même effet sur la survie des patients, puisque leurs fonctions peuvent être affectées différemment selon qu'elles soient dans un environnement local, régional ou systémique par rapport à la tumeur.

Par exemple, dans le cancer de l'ovaire, en plus de retrouver des TIL, des lymphocytes associés à la tumeur (TAL) se retrouvent aussi dans les ascites des patientes, conséquence de la dissémination tumorale dans la cavité péritonéale. La comparaison des TAL aux cellules immunitaires du sang périphérique montre que ces premières comprennent des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ qui présentent un phénotype activé de par leur expression de CD69 et du HLA-DR (31). Une forte accumulation de cellules $CD3^+CD56^+$, possiblement des cellules de type NK-T possédant une activité cytotoxique a aussi été détectée dans les ascites des patientes ayant bien répondu aux traitements chimiothérapeutiques, faisant de cette population cellulaire un facteur prédictif potentiel pour la sensibilité à la chimiothérapie.

Densité, type et localisation cellulaire

Une grande proportion des études s'étant penchées sur le phénotype des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs ont été réalisées par immunohistochimie sur des tissus tumoraux fixés sur des lames. Bien que cette méthode permette la quantification de marqueurs individuels, elle limite la caractérisation détaillée des sous-types cellulaires et leur état d'activation qui requiert l'utilisation de plusieurs marqueurs simultanément. De plus, les critères établis pour définir la positivité des échantillons ainsi que la classification appliquée varie d'une étude à l'autre, ce qui peut entraîner des discordances entre les conclusions. Certaines études comptabilisent séparément les cellules retrouvées dans l'épithélium ou dans le stroma, alors que d'autres ne font pas cette distinction. De plus, dans ce type d'étude, le phénotype de l'infiltrat immunitaire n'est pas comparé aux cellules immunitaires du sang périphérique ou aux cellules immunitaires infiltrant les tissus non cancéreux.

Les analyses réalisées par cytométrie de flux impliquent quant à elles généralement une digestion enzymatique des tissus pour en extraire les cellules immunitaires. Cette procédure peut entraîner la perte de marqueurs à la surface cellulaire (32,33) et ainsi

introduire un biais dans les conclusions tirées de telles analyses. Le phénotypage des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs par cette méthode n'est pas réalisable à partir de tous les tissus puisque leur extraction offre un rendement parfois insuffisant pour en permettre l'analyse. Ces échantillons sont alors exclus des analyses et par le fait même des statistiques relatives à la survie des patients en fonction de la nature ou de la densité de leur infiltrat immunitaire. Enfin, la cytométrie de flux ne permet pas de visualiser la localisation des cellules immunitaires dans l'architecture de la tumeur et ne permet pas d'observer des interactions cellulaires. Par contre, elle permet d'étudier le caractère fonctionnel de ces cellules infiltrantes en déterminant les cytokines produites par ces mêmes cellules.

Par ailleurs, des techniques d'analyse génomiques et protéomiques à large échelle surmontent plusieurs des inconvénients associés aux méthodes décrites ci-haut et parviennent à regrouper plusieurs facteurs critiques à l'étude des marqueurs de cellules immunitaires et leur impact sur le pronostic des patients. Ces méthodes permettent l'analyse et la comparaison d'une grande quantité d'échantillons, pouvant être prélevés dans différentes zones de la tumeur. Des études ayant pour but de déterminer les signatures moléculaires des tumeurs, grâce à des techniques telles les micro-puces à ADN (*gene array*) et le micro-étalage de tissus (*tissue microarray*) ont permis d'établir une relation inverse entre l'infiltrat et la récurrence tumorale pour des patients atteints d'un carcinome colorectal. La classification des patients selon l'intensité d'expression des gènes associés à une immunité adaptative de type Th1 dont l'*interferon regulatory factor 1* (IRF1), l'IFN- γ , le CD3- ζ , le CD8 et le granzyme B dans leur tumeur a permis de les regrouper de façon à déterminer leur probabilité à rechuter (18). La densité des infiltrats de CD3, CD8, granzyme B et CD45RO évaluée grâce à des marquages *in situ* de plusieurs centaines de tissus a permis la stratification des patients atteints du cancer du côlon en 2 groupes dont la survie globale et sans récurrence était statistiquement différente (18).

En plus de la densité, la localisation des cellules immunitaires permet de prédire l'évolution clinique chez les patients en stade précoce de la maladie. Une forte infiltration

de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) ($CD8^+$) et mémoires ($CD45^+$) à la fois au centre de la tumeur et dans les marges invasives est indicateur d'un faible risque de récurrence ainsi que d'une survie globale significativement augmentée par rapport aux patients ayant un faible marquage de ces molécules dans l'une ou l'autre des régions tumorales (34). Ces données suggèrent que la réponse immunitaire adaptative joue un rôle important dans la prévention de la récurrence. Elle permet possiblement d'affaiblir le pouvoir métastatique des cellules tumorales et la génération d'une mémoire immunitaire nuisant à la réapparition de cellules cancéreuses. Cependant, bien que des cellules immunitaires infiltrent un grand nombre de tumeurs solides, elles doivent aussi y être en abondance pour être l'indicateur d'un bon pronostic. Cette abondance de cellules immunitaires est peut-être sous-jacente à une absence de mécanismes immunosuppresseurs dans l'environnement tumoral.

Spécificité des TIL

En plus des facteurs décrits ci-haut, un autre facteur est déterminant dans l'influence que peut avoir l'infiltrat immunitaire sur la progression tumorale. La spécificité des lymphocytes pour des protéines présentées par les cellules cancéreuses est d'une importance majeure pour que celles-ci soient éliminées par le système immunitaire, et sera discutée dans la section suivante.

1.2.3 Réponses immunitaires contre des antigènes dérivés des tumeurs

L'élimination des cellules tumorales peut se produire suite à leur reconnaissance et à une réponse spécifique orchestrée par les deux acteurs responsables de la réponse immunitaire adaptative, les lymphocytes T et les lymphocytes B. Cette réponse spécifique est dirigée contre des protéines retrouvées chez les cellules tumorales, nommées antigènes tumoraux (AT). Quatre grandes catégories permettant de classer ces AT ont été établies, soit les antigènes des cellules germinales (*cancer-testis antigens*), les antigènes de

différenciation, les antigènes surexprimés et les antigènes spécifiques aux tumeurs uniques ou partagés par différents types de cancers (revu dans (35)). Il existe dans la littérature plusieurs évidences qu'une réponse naturelle contre des antigènes dérivés des cellules tumorales puisse survenir chez des patients atteints de cancer.

D'une part, les lymphocytes T qui sont responsables de la réponse immunitaire à médiation cellulaire peuvent reconnaître spécifiquement des AT. Via leur récepteur de cellule T (TCR) spécifique, les lymphocytes sont en mesure de reconnaître et de se lier à un complexe composé d'une molécule du CMH chargée d'un fragment peptidique de l'antigène nommé peptide. Les peptides dérivés d'AT peuvent être présentés aux lymphocytes T CD8⁺ directement par les cellules tumorales via les molécules de classe I du CMH à leur surface (Figure 3A). Les AT peuvent aussi être internalisés, apprêtés et présentés à des lymphocytes T CD4⁺ par des APC grâce au CMH de classe II (Figure 3B). Cette interaction entre des composantes des cellules tumorales et les lymphocytes T initie une réponse cytotoxique par les CD8⁺ devant mener à la mort des cellules tumorales. L'efficacité de cette réponse est accrue par les lymphocytes T CD4⁺ activés, qui, par la production de cytokines, stimulent la prolifération et la différenciation des lymphocytes T CD8⁺. De plus, la régulation positive du CD40 ligand (CD40L) à la surface des CD4⁺ activés contribue à l'activation des APC qui stimuleront la réponse.

Alternativement, des antigènes exogènes peuvent être apprêtés et présentés par des molécules de classe I du CMH à des lymphocytes T CD8⁺ par un processus de présentation croisée. Bien que ce phénomène ait été source de controverse, il est maintenant reconnu pour l'important rôle qu'il joue dans la réponse immunitaire contre les tumeurs (36,37). La présentation croisée d'AT par des APC aux CD8⁺ permet que la reconnaissance d'un peptide antigénique lié au CMH de classe I soit accompagnée des signaux de co-stimulation requis pour l'activation des CD8⁺ naïfs.

Un grand nombre d'épitopes dérivées d'AT et pouvant être reconnus par des lymphocytes T ont déjà été identifiés, et ce pour plusieurs types de cancers. Un inventaire détaillé de ces AT fait d'ailleurs l'objet d'une revue de littérature (35). Une fréquence élevée de lymphocytes T spécifiques à différents AT peut d'ailleurs être retrouvée dans le sang circulant des patients, et ce même avant toute intervention visant à manipuler l'immunité de ces patients (38).

En plus d'apporter une aide aux lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, les lymphocytes T CD4⁺ peuvent aussi entrer en discussion avec les lymphocytes B et ainsi favoriser la branche humorale de la réponse immunitaire menant à la production d'anticorps. Lorsqu'un lymphocyte B reconnaît spécifiquement un antigène par l'entremise de son récepteur de cellule B, celui-ci est internalisé, dégradé sous forme de peptides qui peuvent à leur tour être présentés à la surface cellulaire par les CMH de classe II. La liaison de ce complexe au TCR d'un lymphocyte T CD4⁺ spécifique résulte en l'échange de signaux entre ces deux types cellulaires. Les lymphocytes T répondent à ce stimulus par l'induction de l'expression de CD40L à leur surface, qui se lie au CD40 des lymphocytes B et déclenche l'expression de la molécule B7 chez ces derniers. Ainsi, la liaison entre B7 et CD28 respectivement à la surface des lymphocytes B et T fournit le signal de co-stimulation nécessaire à l'activation des lymphocytes T et à la production de cytokines, qui viennent à leur tour stimuler la prolifération des lymphocytes B et la différenciation en cellules productrices d'anticorps, les plasmocytes.

De nombreuses études ont démontré qu'une telle réponse humorale peut être produite contre des AT. Ces anticorps peuvent être spécifiques à des néo-antigènes retrouvés seulement dans les tumeurs, mais la plupart sont dirigés contre des protéines du soi qui sont exprimés de façon aberrante dans les cancers. Des anticorps spécifiques à p53, un gène suppresseur de tumeur p53 muté dans environ 50% de tous les cancers humains et qui joue un rôle central dans la carcinogénèse, ont été détectés dans le sérum de patients atteints de différents types de cancer dont ceux du côlon, du sein et du poumon (39). Des

auto-anticorps dirigés contre des protéines surexprimées dans un pourcentage élevé de cas de cancer comme HER-2 sont aussi fréquemment retrouvés dans le sérum des patients (40). En plus des exemples ci-haut mentionnés, il existe un nombre impressionnant d'AT pour lesquels des auto-anticorps ont été identifiés. Grâce aux avancées technologiques des dernières années, plus de 2300 auto-antigènes sont documentés à ce jour (revu dans (41)).

La présence de ces anticorps démontre qu'une réponse immunitaire humorale peut survenir contre des AT, mais il n'est pas clair si cette réponse confère une protection aux patients. En effet, certaines études ont associé la présence de tels anticorps avec des paramètres cliniques et un pronostic défavorables (42,43) alors que d'autres concluent plutôt à une augmentation de la survie des patients (44,45).

Ainsi, le système immunitaire a la capacité de mettre en place une réponse naturelle contre les cellules cancéreuses. Cependant, les régressions tumorales spontanées sont rares (revu dans (46-48)), ce qui permet de faire le constat que l'immunité anti-tumorale nécessite une stimulation supplémentaire afin d'être plus efficace.

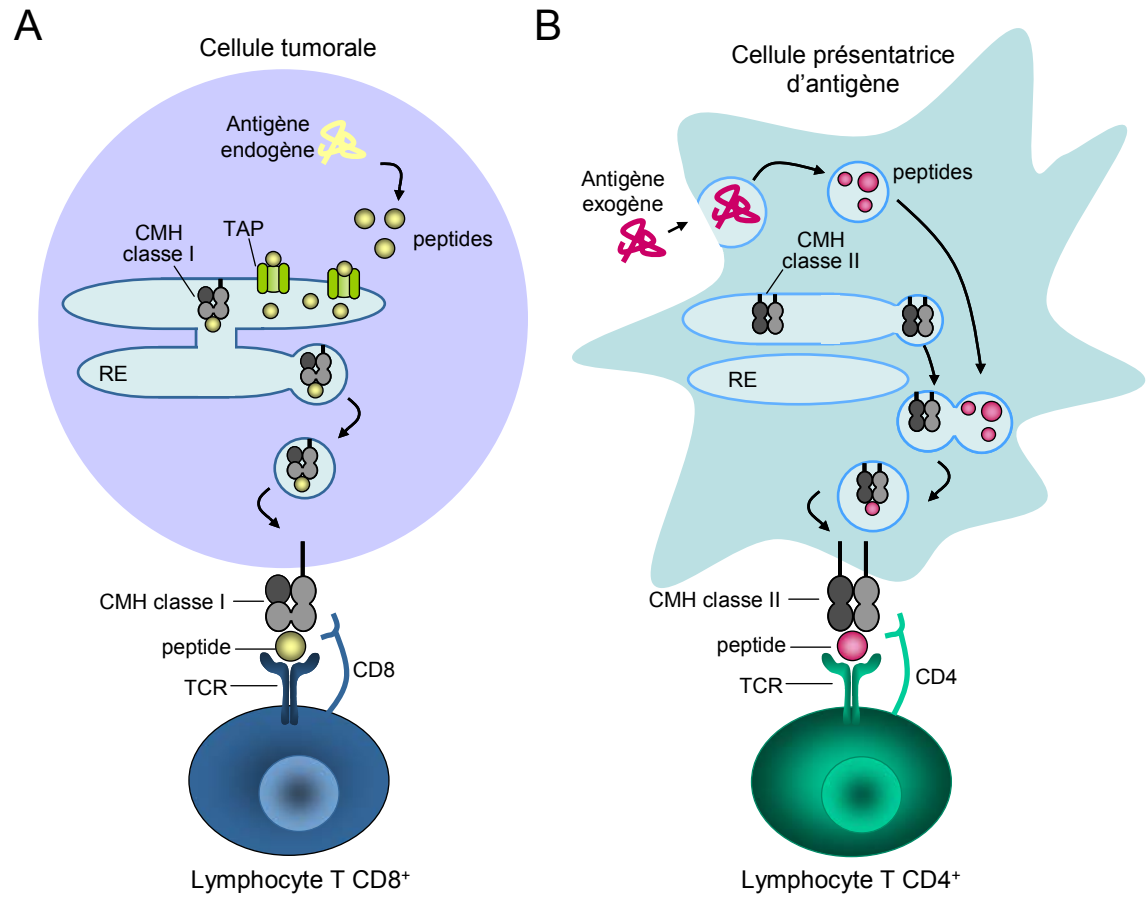


Figure 3 Présentation antigénique classique par les cellules tumorales et présentatrices d'antigènes. (Figure inspirée de (49))

Légende: (A) Dans la voie de présentation par le CMH de classe I, les peptides sont produits à partir de protéines endogènes dans le cytosol, puis sont transportés vers le réticulum endoplasmique (RE) où ils se lient aux molécules du CMH. Les complexes peptides-CMH sont transportés à la surface cellulaire et peuvent être reconnus par des lymphocytes T CD8⁺. (B) Dans la voie de présentation par le CMH de classe II, les protéines sont internalisées par des vésicules puis dégradées en peptides pour ensuite se lier au CMH dirigé vers la même vésicule. Les complexes CMH II- peptide migrent à la surface cellulaire pour être reconnus par les lymphocytes T CD4⁺.

1.3 Immunothérapie du cancer

1.3.1 Définitions et justification

L'immunothérapie du cancer consiste à utiliser le système immunitaire afin qu'il cible et élimine les cellules tumorales, tout en préservant les cellules normales. Ceci peut entre autre être réalisé par l'administration d'anticorps monoclonaux, d'interférons ou d'interleukines, ainsi que par la vaccination des patients avec différentes composantes immunitaires, comme, des cellules dendritiques (DC), des NK ou des lymphocytes pour stimuler l'immunité de façon non-spécifique ou spécifique. La stimulation spécifique repose principalement sur la présence d'antigènes associés aux tumeurs, lesquels peuvent être reconnus par les effecteurs de la réponse cellulaire ou humorale du système immunitaire et initier une réponse anti-tumorale. L'identification de tels antigènes a ouvert la voie au développement de multiples stratégies immunothérapeutiques. Ainsi, la vaccination avec des AT, qu'ils soient sous forme de peptides, d'ADN ou d'extraits de cellules tumorales, a pour objectif de stimuler des CTL CD8⁺ ou des lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ spécifiques.

Considérant ses multiples avantages théoriques, l'immunothérapie anti-tumorale pourrait représenter une forme de traitement permettant de surpasser certaines des contraintes associées aux thérapies communément utilisées pour le traitement du cancer. D'une part, cette approche serait ciblée comparativement aux thérapies conventionnelles telles la chimiothérapie et la radiothérapie qui sont peu spécifiques. De plus, contrairement à ces dernières qui sont connues pour engendrer une toxicité, l'immunothérapie pourrait occasionner peu d'effets secondaires indésirables et des mesures pourraient être prises pour contrôler ceux-ci advenant qu'ils surviennent. D'autre part, l'immunothérapie pourrait permettre de cibler non seulement les tumeurs primaires, mais aussi les cellules disséminées et les métastases, en raison d'une potentielle re-circulation des lymphocytes T spécifiques, ce qui n'est pas le cas avec d'autres types de thérapies administrées

localement. Enfin, l'immunothérapie pourrait servir autant d'intervention préventive chez les individus présentant un haut risque de développer un cancer ou de récidiver suite à un cancer traité, que d'intervention curative pour les cancers primaires à différents stades ou les cancers métastatiques. Cette approche pourrait même être combinée à certaines thérapies conventionnelles afin d'en tirer de plus grands bénéfices.

1.3.2 Stratégies immunothérapeutiques

L'élaboration d'un vaccin destiné à l'éradication de tumeurs est complexe puisque différents éléments entrent dans sa composition et doivent être optimaux. D'abord, une cible antigénique spécifique à la tumeur et ayant un fort potentiel immunogène doit être identifiée. Ensuite, une plateforme via laquelle ces antigènes seront administrés doit être choisie. Et enfin, une stratégie favorisant une stimulation adjuvante de l'immunité afin de renforcer la réponse peut y être intégrée. Ainsi, l'immunothérapie du cancer englobe une variété de composantes vaccinales, ayant été testés en clinique, et dont l'efficacité est variable mais souvent inférieure à ce qui est attendu compte tenu des résultats observés dans des modèles précliniques.

Anticorps monoclonaux

Parmi les traitements dits immunothérapeutiques, on retrouve les vaccins basés sur des anticorps monoclonaux ciblant des molécules de surface spécifiques. Ces anticorps visent généralement à inhiber le signallement associé à ces molécules qui promeuvent la croissance des cellules tumorales ou encore font obstacle à la réponse immunitaire anti-tumorale. Un large spectre de cellules peut donc être la cible d'un tel type de thérapie.

D'une part, les anticorps monoclonaux peuvent cibler une molécule surexprimée à surface des cellules cancéreuses. C'est d'ailleurs le cas du trastuzumab, un anticorps dirigé

contre HER2, une protéine qui s'associe avec d'autres membres de la famille des *epidermal growth factor receptors*, pour induire un signalment favorisant la croissance cellulaire. La surexpression de HER2 est présente dans environ 25% des cas de cancer du sein, et cette caractéristique corrèle avec une plus forte agressivité des tumeurs, une plus grande probabilité de récurrence et un mauvais pronostic (50). Le trastuzumab est donc utilisé comme traitement dans les cas de cancer du sein dans lesquels une forte surexpression de HER2 est retrouvée, afin de bloquer ce signalment responsable de la progression tumorale (51).

Outre les cellules tumorales elles-mêmes, d'autres types cellulaires faisant partie de la structure tumorale peuvent être ciblés par une telle approche. D'une part, les tumeurs sont souvent caractérisées par la production de facteurs pro-angiogéniques, favorisant la croissance tumorale par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui permettent l'apport de nutriments et d'oxygène. Des anticorps monoclonaux visant à inhiber ce processus ont donc été développés et testés en cliniques. Ceux-ci se lient soit au *vascular endothelial growth factor* (VEGF) ou à son récepteur, le VEGFR, pour interférer avec leur signalment. Les thérapies anti-angiogéniques combinées au ciblage des cellules stromales telles les cellules myéloïdes CD11b⁺ associées aux tumeurs pourrait constituer une avenue intéressante. En effet, ces cellules ont été identifiées comme étant à la source d'une résistance des thérapies anti-angiogéniques (52). De plus, les cellules stromales ne présentent pas l'instabilité génomique qui caractérise les cellules tumorales et elles ont ainsi moins de possibilités pour s'évader.

La manipulation de signaux inhibiteurs des voies de co-stimulation est une autre avenue vers laquelle une thérapie par les anticorps monoclonaux peut être dirigée. L'une des voies les plus étudiées est celle impliquant la molécule *cytotoxic T lymphocyte antigen-4* (CTLA-4) qui est exprimé à la surface des lymphocytes T lorsque activés. Le CTLA-4 a une affinité supérieure envers les molécules B7 en comparaison avec le CD28. Lorsque le CTLA-4 est engagé, il s'oppose aux signaux de co-stimulation émis par le CD28 en

enclenchant des signaux inhibiteurs chez les lymphocytes T et il en résulte l'inhibition de la réponse des lymphocytes T (revu dans (53)). Ceci tend à être contré par l'administration d'anticorps monoclonaux dirigés contre le CTLA-4, soit l'ipilimumab et le tremelimumab. Cette approche ciblant des cellules immunitaires comporte un avantage non négligeable par rapport aux immunothérapies ciblant les cellules tumorales qui ont la capacité de s'évader. De plus, ne requérant pas l'expression d'une cible commune par les cellules tumorales, elle a le potentiel d'être utilisée pour le traitement de plusieurs types de cancers. Dans des essais cliniques de phase II, l'ipilimumab a d'ailleurs montré une certaine efficacité chez des patients atteints du cancer, principalement pour le mélanome métastatique. Entre autres, des régressions tumorales, une stabilisation de la maladie et une augmentation de la survie des patients ont été observés (revu dans (54)). Des réponses partielles ont aussi été provoquées par l'ipilimumab chez des patients atteints d'un cancer métastatique des cellules rénales (55). Quant au tremelimumab, son administration entraîne aussi des régressions tumorales et une stabilisation de la maladie, mais la comparaison de son efficacité avec celle d'un traitement chimiothérapeutique standard n'a pas permis de démontrer sa supériorité, ce qui a forcé l'arrêt d'une étude clinique de phase III (54). De plus, les réponses objectives générées par l'administration d'anti-CTLA-4 sont souvent associées avec des effets secondaires de grade 3 et 4, tels des colites, des dermatites, des uvéites, des entérocolites et des hépatites (56).

Certaines limites sont cependant associées à l'utilisation et à l'efficacité de ces anticorps. L'une d'elles concerne la proportion restreinte de patients surexprimant à un degré suffisant la molécule ciblée pour bénéficier des effets d'une telle thérapie. C'est entre autre le cas du trastuzumab, dont l'efficacité *in vivo* corrèle fortement avec le degré de surexpression de HER2, selon des modèles pré-cliniques (57). Le même phénomène est observé en clinique, puisque les patients chez qui la plus forte surexpression est retrouvée sur une échelle de 0 à 3+ sont plus susceptibles de tirer des bénéfices du trastuzumab (58). D'autre part, une résistance aux anticorps peut survenir chez un grand nombre de patients admissibles au traitement. Les patients chez lesquels aucune réponse n'est détectée

présentent une résistance innée, alors qu'une résistance acquise peut se développer chez les patients ayant initialement profité d'une réponse. C'est entre autre le cas du trastuzumab, qui selon les études, génère un taux de réponse variant entre 12 et 40%, indiquant qu'une majorité des patients traités ne répondent pas et sont donc naturellement résistants. De plus, parmi les répondeurs, plus de 40% sont victimes d'un retour de la progression de la maladie dans les 12 mois suivant le début du traitement, indiquant l'apparition de mécanismes de résistance (59). Enfin, l'efficacité des anticorps monoclonaux est souvent limitée lorsqu'ils sont utilisés en mono-thérapie, mais elle se trouve considérablement améliorée par leur combinaison avec des traitements de chimiothérapie. D'ailleurs, l'utilisation combinatoire du trastuzumab avec le paclitaxel ou la cyclophosphamide est associée avec une augmentation du taux de réponses objectives, de la durée des réponses et de la survie globale et sans progression (51). Des effets similaires ont été observés pour certains agents anti-angiogéniques comme le bevacizumab (60) ainsi que pour un des anticorps anti-CTLA-4, l'ipilimumab (61).

Vaccins basés sur des peptides ou de l'ADN

Depuis le clonage de MAGE-1 en 1991, qui est un antigène du mélanome mais aussi le premier AT reconnu par des lymphocytes T à avoir été identifié, bon nombre d'AT ont été découverts pour divers cancers (35). L'identification d'un ou plusieurs épitopes, qui consistent en des séquences peptidiques reconnues par des lymphocytes T spécifiques, provenant des AT, est à la base de la vaccination anti-tumorale par les peptides. Cette méthode de vaccination est d'ailleurs la plus simple et rapide à produire et permet une standardisation du vaccin, ce qui constitue un avantage majeur.

Certains obstacles s'opposent cependant à son applicabilité à l'ensemble des patients. D'une part, les AT desquels proviennent les peptides ne sont pas exprimés par toutes les tumeurs d'un même type. Ainsi, la proportion des patients pouvant bénéficier

d'un vaccin composé d'un peptide précis est souvent limitée. De plus, chacun de ces peptides est restreint au CMH, c'est-à-dire que pour être reconnu par un lymphocyte T spécifique, il doit se loger dans la poche peptidique d'un CMH bien précis pour lequel il possède des résidus d'ancrage. Ceci restreint l'administration de tels vaccins peptidiques aux patients qui possèdent le CMH approprié seulement.

Étant généralement le produit d'antigènes du soi, les peptides dérivés des cellules tumorales ne sont reconnus que par des lymphocytes T de faible avidité, ce qui peut constituer un obstacle à une vaccination anti-tumorale efficace. Pour contrer cette limitation, les antigènes peuvent être rendus plus immunogènes en modifiant un acide aminé dans la séquence peptidique, augmentant ainsi la force de liaison entre la molécule de CMH et le peptide, et pouvant générer une réponse plus prononcée des lymphocytes T spécifiques (62).

L'administration d'ADN codant pour un AT représente une alternative intéressante. Tout comme les vaccins peptidiques, les vaccins à ADN peuvent être produits selon une méthode standardisée. De plus, puisque souvent plusieurs épitopes sont reconnus par des lymphocytes T sur un même antigène, et que certains sont plus immunogènes que d'autres, les vaccins à ADN ont la capacité de stimuler des lymphocytes T spécifiques à différents peptides, parmi lesquels certains génèreront une réponse plus efficace.

Le mélanome ayant fait l'objet de la majorité des essais cliniques dans le domaine de l'immunothérapie, bon nombre de ces études ont été consacrées à l'évaluation de l'efficacité des vaccins peptidiques chez des patients atteints de ce type de cancer. Une compilation des résultats découlant de ces multiples études a d'ailleurs été publiée en 2004, et a fait état d'un taux de réponse clinique moyen de seulement 2,9%, malgré les différentes stratégies mises en place pour améliorer l'efficacité de cette approche vaccinale (63).

Un inconvénient majeur relié à l'approche immunothérapeutique basée sur les peptides ou l'ADN constitue la perte de l'antigène cible. Ce phénomène qui sera discuté plus amplement dans la section 1.5.2 survient lorsque les cellules tumorales exprimant l'antigène ciblé par le vaccin sont éliminées alors que les cellules ne l'exprimant pas persistent. Ceci entraîne l'émergence d'autres antigènes n'étant pas ciblés par le vaccin, rendant donc celui-ci inefficace. Certaines études se sont d'ailleurs intéressées à l'analyse de la spécificité des lymphocytes T retrouvés chez des patients ayant bénéficié d'une régression tumorale suite à une vaccination ciblant un antigène en particulier. Elles ont révélé que chez ces patients, la fréquence des lymphocytes T spécifiques à l'antigène ciblé était de 100 à 10 000 fois plus faible par rapport à celle des lymphocytes T spécifiques à d'autres AT non ciblés par le vaccin (38,64,65). Ceci laisse supposer que pour qu'une régression tumorale se produise, une réponse contre plusieurs antigènes doit être induite. Ceci justifie donc les efforts consacrés au développement de vaccins cellulaires ciblant différents antigènes à la fois, une approche pouvant s'avérer plus intéressante d'un point de vue clinique.

Vaccins cellulaires

Les vaccins cellulaires sont une forme d'immunothérapie qui consiste en l'utilisation de cellules tumorales, qu'elles soient autologues ou allogéniques. La méthode basée sur les cellules autologues, provenant de la résection de la tumeur primaire du patient qui recevra le vaccin, présente certains avantages. D'une part, l'ensemble des AT de l'individu s'y retrouve, permettant ainsi que plusieurs antigènes soient ciblés à la fois. De plus, l'identification d'épitopes n'est pas nécessaire lorsque des cellules tumorales sont exploitées. Une telle approche requiert cependant la préparation de vaccins individualisés, ce qui peut être évité par l'utilisation de lignées cellulaires en remplacement des cellules tumorales autologues. Cette approche s'appuie sur le fait que les cellules provenant de tumeurs d'un même type partagent des AT communs, ce qui fait des cellules allogéniques

une source antigénique intéressante à exploiter. D'après les résultats obtenus de nombreuses études cliniques, les vaccins composés de cellules autologues ne permettent pas d'obtenir un taux de réponse significativement plus élevé que les cellules allogéniques (66).

Par ailleurs, l'efficacité supérieure de l'utilisation de cellules tumorales ou d'extraits de ces cellules par rapport à l'utilisation d'épitopes définis a été mise en évidence par Neller et ses collègues (66). En effet, ce groupe a réalisé une revue exhaustive des résultats d'essais cliniques d'immunothérapie utilisant l'une ou l'autre de ces méthodes, pour un large éventail de cancers incluant le mélanome, le cancer du rein, du foie, du poumon, de la prostate, du sein, du côlon, du pancréas et de l'ovaire. Cette compilation a permis d'établir qu'en ciblant un large spectre d'AT par l'utilisation de cellules tumorales entières, une réponse objective est rapportée chez 8,1 % des patients traités en moyenne. De son côté, la vaccination ciblant des antigènes préalablement définis engendre un taux de réponses objectives de seulement 3,6%.

Cependant, puisque les cellules tumorales sont de façon générale faiblement immunogéniques, ces vaccins peuvent nécessiter des adjuvants immunologiques, lesquels entraînent fréquemment des réactions auto-immunes. De plus, la plupart des tumeurs solides ne possèdent pas de molécules de co-stimulation permettant une stimulation adéquate des lymphocytes T (67). Dans l'optique d'améliorer le potentiel stimulant de ce type de vaccin, des modifications peuvent être apportées aux cellules tumorales afin qu'elles expriment des molécules de co-stimulation dont B7 et CD40, des molécules du CMH de classe I et de classe II, des molécules d'adhésion telles ICAM1 et LFA3 et/ou des cytokines, entre autre l'IL-2, l'IL-12 et le *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) (68-72).

Les DC étant de puissantes cellules présentatrices d'antigènes (APC) de par leur capacité particulière à engloutir, apprêter et présenter les antigènes aux lymphocytes T

(revu dans (73)), elles jouent un rôle crucial dans le déclenchement d'une réponse antigène-spécifique par les lymphocytes T. Ces cellules sont donc vouées à être utilisées en clinique afin de stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale. Plusieurs approches ont donc été déployées pour mettre à profit les DC dans les vaccins anti-cancer. Parmi celles-ci, on retrouve l'électroporation des DC avec de l'acide ribonucléique messager (ARNm) codant pour un AT (74), la fusion des DC avec des cellules tumorales (75), ainsi que le chargement des DC avec des peptides dérivés d'AT (76) ou des lysats de cellules tumorales. Quelle que soit l'approche utilisée, les vaccins constitués de DC sont personnalisés, ce qui rend leur préparation laborieuse, au même titre que les vaccins constitués des cellules tumorales autologues.

Une approche immunothérapeutique basée sur les cellules dendritiques, le Sipuleucel-T, a d'ailleurs été récemment approuvée par la *US Food and Drug Administration*. Cette thérapie qui constitue la première immunothérapie spécifique à un antigène approuvée pour le traitement du cancer représente une avancée majeure pour le traitement personnalisé du cancer. Le Sipuleucel-T, utilisé dans le traitement contre le cancer de la prostate, est en effet produit sur mesure pour chaque patient à partir d'une leucaphérèse à partir de laquelle sont enrichis les monocytes (77). Ceux-ci sont alors incubés avec une protéine de fusion réunissant le GM-CSF et la *Prostatic acid phosphatase* (PAP), un antigène exprimé dans la majorité des adénocarcinomes de la prostate (78), pour ensuite être administrés au patient. Il en résulte une maturation des monocytes en APC pleinement compétentes pouvant présenter des peptides de PAP au système immunitaire de l'hôte, activant ainsi les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, lesquels participent à la réponse anti-tumorale (79). Les essais cliniques de phase III ont permis de démontrer que le Sipuleucel-T prolonge significativement la survie globale des patients (80).

Transfert adoptif de lymphocytes T

Bien qu'ayant montré leur efficacité dans une multitude de modèles murins, les différents vaccins décrits ci-dessus n'ont pas mené aux taux de succès escomptés lorsqu'ils ont été transposés chez l'humain (revu dans (81)). La méthode de vaccination ayant amené les résultats les plus concluants est définitivement le transfert adoptif de TIL (Figure 4). Celle-ci consiste à extraire les lymphocytes infiltrant la tumeur d'un patient, puis de les activer pour ensuite sélectionner les cellules spécifiques ayant un fort potentiel de réponse. Ces cellules sont alors amplifiées *in vitro* pour atteindre des quantités de l'ordre de 1×10^{11} cellules (82), pour enfin être administrées au patient ayant préalablement subi une lymphodéplétion non-myéloablatrice. Des essais cliniques de transfert adoptif ont entraîné des régressions tumorales dans une proportion allant jusqu'à 51% des patients atteints d'un mélanome réfractaire (83). Il a d'ailleurs été démontré que le processus de lymphodéplétion précédant le transfert adoptif améliore considérablement l'efficacité du traitement. L'irradiation totale du corps ou l'administration d'agents chimiothérapeutiques lymphodéplétants non-myéloablatifs agit en réduisant à la fois les Treg, mais aussi les cellules qui consomment l'IL-7 et l'IL-15, des cytokines importantes pour la prolifération et la fonction des lymphocytes T. Ceci résulte non pas en une augmentation du nombre de lymphocytes T réactifs à la tumeur, mais plutôt à une augmentation des fonctions effectrices des cellules transférées (84).

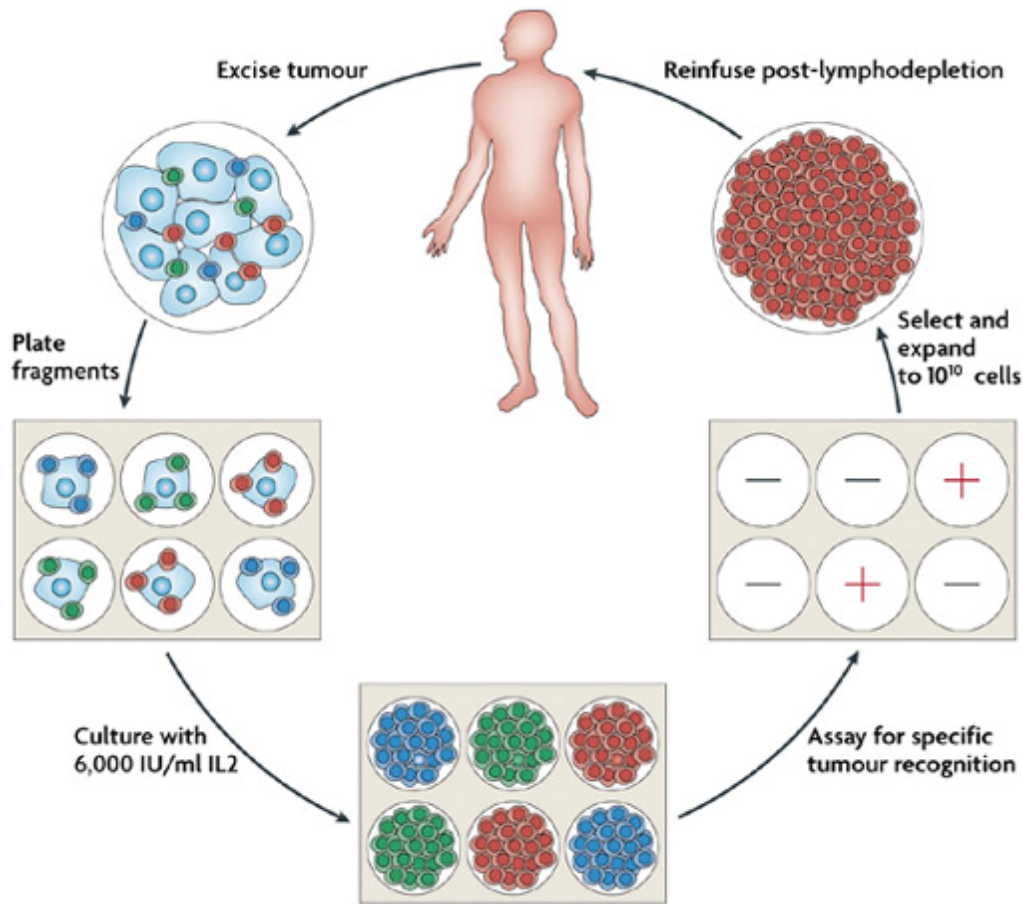


Figure 4 Génération de lymphocytes T anti-tumoraux utilisés pour le transfert adoptif. (Figure tirée de (85))

Légende: La tumeur est excisée et plusieurs cultures individuelles sont établies, prolifèrent séparément et sont testées pour leur reconnaissance spécifique de la tumeur. Les cultures hautement réactives subissent une expansion, pour atteindre des quantités de l'ordre de 10^{10} à 10^{11} cellules. Elles sont ensuite infusées au patient suivant l'administration d'une chimiothérapie lympho-déplétante.

L'isolement et l'expansion de lymphocytes T réactifs à la tumeur représente cependant un processus difficile et laborieux. D'une part, cette approche requiert un prélèvement du tissu tumoral par biopsie, ce qui restreint le nombre de patients éligibles en raison de la trop petite taille ou encore de l'inaccessibilité de leur tumeur (86). Dans les cas où la biopsie est possible, les TIL isolés doivent être cultivés afin d'en générer une quantité suffisante pour permettre l'administration au patient. Cette étape longue et coûteuse n'est fructueuse que dans la moitié des cas pour lesquels un échantillon de la tumeur a pu être prélevé (87). Par ailleurs, les TIL ne sont pas une source renouvelable de lymphocytes T, ce qui peut être limitant lorsqu'une re-stimulation est nécessaire. Dans l'optique d'éviter d'avoir à sélectionner les lymphocytes T réactifs, ceux-ci peuvent être modifiés *ex vivo* de façon à leur faire exprimer le TCR désiré. La spécificité des lymphocytes T provenant du sang périphérique de patients peut être redirigée en introduisant à l'aide de vecteurs rétroviraux des gènes encodant des TCR spécifiques à des AT. Cette technique permet de générer à la fois des lymphocytes T CD8⁺ pouvant reconnaître et lyser des cellules tumorales exprimant l'antigène cible *in vitro*, ainsi que des CD4⁺ qui favorisent la réponse des CD8⁺ (88). Lorsque administrée à des patients, des lymphocytes T ayant un TCR redirigé peuvent représenter plus de 10% des lymphocytes circulant dans le sang périphérique un mois après le transfert, et des régressions tumorales sont observées chez certains d'entre eux (89). Par ailleurs, les TCR peuvent aussi être modifiés de manière à ce que leur domaine intracellulaire soit celui d'une molécule de co-stimulation, la reconnaissance antigénique devenant ainsi le seul pré-requis menant à la lyse de la cellule cible.

1.4 Les défis actuels reliés à l'immunologie des tumeurs et l'immunothérapie

Les essais cliniques réalisées chez l'humain jusqu'à maintenant n'ont pas connu les mêmes succès que ceux obtenus avec différents modèles expérimentaux murins. On a établi plusieurs critères devant être rencontrés pour qu'une immunothérapie parvienne à reconnaître et à éliminer sa cible qu'est la tumeur. Les six facteurs critiques pour l'efficacité d'une immunothérapie anti-tumorale sont schématisés dans la figure 5.

Seuil antigénique

Les AT étant généralement des protéines du soi, ils sont reconnus par des lymphocytes T de faible avidité. Le seuil antigénique nécessaire à l'activation de ces lymphocytes T spécifiques s'en trouve donc augmenté. L'importance d'une forte expression de l'antigène cible a été démontrée grâce à un modèle expérimental auquel étaient implantées des cellules tumorales exprimant un faible ou un haut niveau de l'antigène. Le transfert de lymphocytes T spécifiques à l'antigène a permis le rejet des tumeurs seulement chez les souris porteuses de tumeurs exprimant fortement l'antigène cible (90).

Présentation antigénique

Bien qu'un haut niveau d'antigène soit exprimé, celui-ci ne peut être reconnu par un lymphocyte T que s'il est présenté par une molécule du CMH. Tel qu'il sera discuté dans la section 1.5, il survient régulièrement chez les cellules tumorales une perte de l'expression des molécules de classe I du CMH, limitant donc la présentation antigénique par celles-ci. La vaccination anti-tumorale doit donc inclure des moyens stimulant la présentation antigénique, soit par l'augmentation de l'expression des CMH de classe I à la surface des cellules tumorales, ou soit en favorisant la présentation antigénique par les APC capables de présenter à la fois par les CMH de classe I et de classe II.

Réponse des lymphocytes T

Suite à la rencontre de l'antigène auquel il est spécifique, un lymphocyte T se doit de répondre par une phase de prolifération donnant naissance à une large population de lymphocytes T spécifiques. Bien que, suite à l'administration d'un vaccin anti-tumoral, une augmentation du nombre de lymphocytes T spécifiques à la tumeur circulant dans le sang des patients survient dans une grande proportion des cas, cette réponse immunologique se transpose rarement en une régression tumorale (91,92). Une cause possible de ces échecs concerne le fait que les lymphocytes T spécifiques à la tumeur générés atteignent difficilement une fréquence supérieure à 2% des lymphocytes T CD8⁺ circulants (91,93). Ce problème peut être surmonté par le transfert adoptif, qui permet l'obtention de quantités imposantes de lymphocytes T du patient par leur expansion *in vitro*, pouvant ensuite être administrés au patient. Chez des hôtes lymphodéplétés, le transfert adoptif de ces cellules peut donner lieu à des proportions de lymphocytes T anti-tumoraux circulants allant de 5 à 75% des CD8⁺ totaux (82).

Migration des lymphocytes T

Bien que le nombre de cellules transférées soit un facteur déterminant pour la réussite ou l'échec d'une immunothérapie, les cellules transférées doivent aussi migrer vers le site de la tumeur pour y remplir leurs fonctions effectrices. Il a été démontré que chez les patients n'ayant pas bénéficié d'une régression tumorale suite à un traitement d'immunothérapie, les lymphocytes T spécifiques générés ne parviennent pas à infiltrer la tumeur. Selon plusieurs études réalisées sur des modèles expérimentaux, il semble que le tissu tumoral soit peu permissif à l'extravasation des lymphocytes. Bien que ceux-ci soient retrouvés en forte densité dans la région péri-tumorale, ils infiltrent plus difficilement la région intra-tumorale elle-même (94). Contrairement aux vaisseaux permettant la migration des lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires, la vascularisation présente dans les tumeurs posséderait de faibles niveaux d'ICAM-1, molécule clé pour l'adhésion des

lymphocytes à l'endothélium, ainsi qu'une incapacité à interagir efficacement avec les lymphocytes T circulants, entravant ainsi leur transmigration subséquente (revu dans (95)).

Destruction de la cible

Une fois présents au site tumoral, les lymphocytes T spécifiques à la tumeur doivent d'une part reconnaître la cible, mais ils doivent ensuite être activés et pouvoir mettre en œuvre leurs fonctions effectrices afin d'amorcer la destruction des cellules tumorales. Ces étapes critiques sont cependant difficiles à accomplir puisque plusieurs éléments présents dans l'environnement tumoral font obstacle au déploiement des fonctions des lymphocytes T. Ces éléments ayant des effets néfastes sur la réponse immunitaire anti-tumorale qui seront détaillés dans la section 1.5 doivent impérativement être contournés par les différentes stratégies de vaccination.

Génération d'une mémoire immunitaire anti-tumorale

L'objectif ultime de l'immunothérapie de cancer consiste non seulement à générer une réponse immunitaire menant à une régression tumorale, mais vise aussi à ce que cette réponse soit durable afin d'éviter que des récurrences ne surviennent. L'un des avantages d'utiliser le système immunitaire pour provoquer l'élimination des tumeurs se rapporte au fait qu'il existe une mémoire immunologique. Lorsqu'une réponse immunitaire se produit, une étape d'expansion donnant lieu à une large population de cellules progénitrices pouvant se différencier en populations de cellules T effectrices ou mémoires. La population de cellules mémoires possède des propriétés distinctes lui permettant d'être ré-activée rapidement suite à seconde exposition à l'antigène. Cependant, dans une situation d'exposition chronique à l'antigène, les propriétés des cellules mémoires générées sont affectées et elles culminent vers un stade d'épuisement (revu dans (96)). Ce phénomène concorde avec la conversion d'une réponse anti-tumorale curative en une réponse non-curative *in vivo*. Les stratégies d'immunothérapie doivent donc prendre en considération les facteurs importants permettant la génération d'une mémoire fonctionnelle.

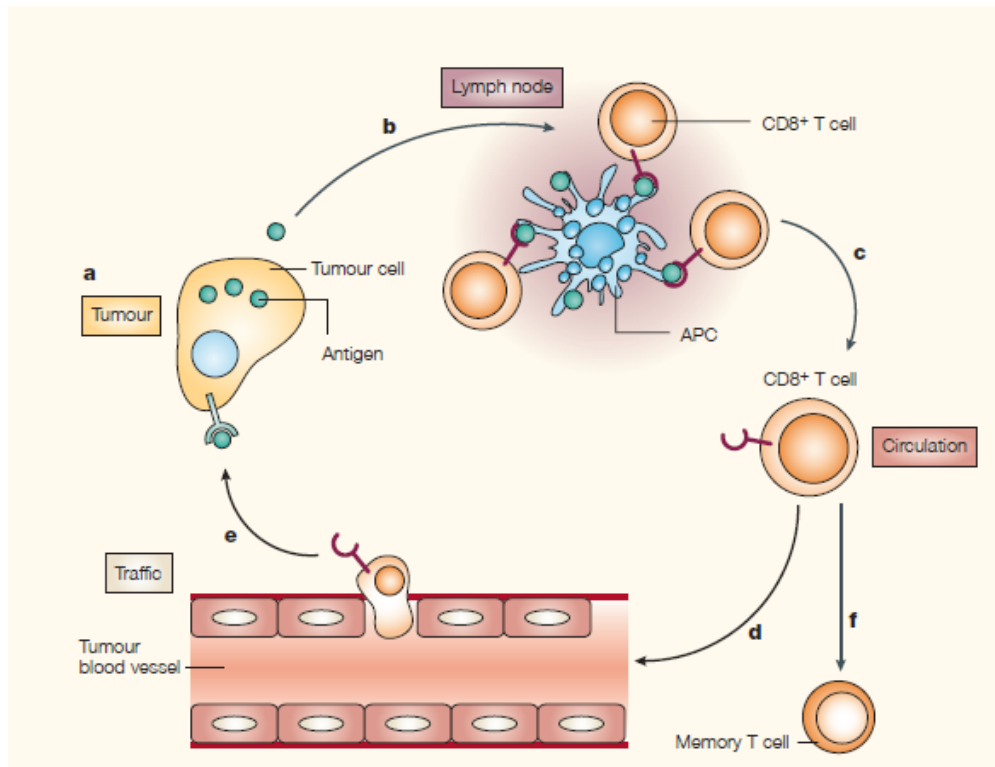


Figure 5 Les six étapes nécessaires pour une réponse anti-tumorale efficace impliquant les lymphocytes T CD8⁺. (Figure tirée de (97))

Légende: La destruction efficace des tumeurs par les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques aux antigènes est un processus comprenant plusieurs étapes. Chacune des six étapes est requise et peu être modulée par plusieurs facteurs : les AT doivent être présents (a); ces antigènes doivent atteindre des cellules présentatrices professionnelles, soit les APC, puis être chargés par celles-ci (b); les lymphocytes T spécifiques doivent proliférer en réponse aux antigènes (c); les lymphocytes T spécifiques doivent circuler et s’infiltrer dans la tumeur (d); une fois pénétrés dans l’environnement tumoral, les cellules T spécifiques doivent surpasser les molécules immuno-suppressives présentes localement afin de reconnaître et tuer leur cible (e); des cellules mémoires doivent être générées pour obtenir une réponse durable (f).

1.5 Tolérance immunitaire et mécanismes d'évasion tumorale

Les mécanismes d'évasion tumorale empêchant le processus menant à la destruction des cellules tumorales cibles sont un domaine d'intense recherche. En plus d'être impliquées dans la progression naturelle de la maladie, ces mécanismes d'évasion tumorale pourraient expliquer en grande partie les faibles taux de réponses cliniques suivant un traitement d'immunothérapie anti-tumorale. Ces nombreux mécanismes imposant une barrière aux fonctions des TIL peuvent affecter plusieurs aspects de l'immunité en se manifestant autant chez les cellules tumorales que chez les TIL eux-mêmes.

1.5.1 Défauts dans la machinerie d'apprêtement et de présentation des antigènes

La lyse d'une cellule cible, telle une cellule tumorale, par un lymphocyte T effecteur se produit suite à la reconnaissance par le TCR d'un antigène présenté sous forme de peptide à la surface de la cellule cible par le CMH (Figure 3, section 1.2). Lorsque l'une des composantes impliquées dans cette étape critique fait défaut, la reconnaissance antigénique en est altérée. La promotion d'une réponse immunitaire par des CTL est ainsi compromise, ce qui ouvre la porte à une progression tumorale protégée contre la destruction par ceux-ci.

Différents défauts impliquant des éléments de la reconnaissance antigénique ont été documentés dans la littérature. D'une part, l'absence complète de molécules de classe I du CMH est fréquente chez plusieurs types de tumeurs dont le mélanome, le carcinome colorectal, l'adénocarcinome de la prostate, ainsi que dans environ 50% des cas de cancer du sein (98,99). Une telle diminution ou absence totale de molécules de classe I du CMH est par ailleurs associée avec des cancers invasifs et métastatiques. Une perte totale des molécules de classe I du CMH a entre autres été observée dans des métastases de mélanomes récurrents chez des patients ayant précédemment bénéficié d'une réponse clinique suite à une immunothérapie (100). Cette perte des molécules de classe I du CMH

peut résulter d'une l'altération des protéines clés dans la machinerie d'apprêtement et de présentation des antigènes, dont TAP (*transporter associated with antigen processing*), la tapasin (*TAP-associated protein*), la β_2 -microglobuline, ainsi que les *low-molecular weight protein 2* (LMP2) et LMP7 (Figure 6).

Pour permettre la formation d'un complexe CMH-peptide, les peptides sont d'abord transloqués du cytosol au réticulum endoplasmique (RE) par TAP, une protéine de transport hétérodimérique composée de 2 sous-unités, TAP-1 et TAP-2. La perte de l'une ou l'autre des sous-unités de TAP est fréquemment rapportée dans plusieurs types de cancers (101-103). En plus des mutations menant à la perte d'expression de TAP, une mutation près de son site de liaison à l'ATP a aussi été décrite, entraînant ainsi une perte de fonction de TAP (104). Une mutation sur le gène de la tapasine, molécule chaperone qui a pour rôle d'amener TAP à proximité de la molécule de classe I du CMH a aussi été identifiée dans des cellules cancéreuses. Cette mutation entraîne une perte de fonction de la tapasine, ce qui mène à une diminution de la stabilité du transporteur TAP et à une réduction de l'expression des molécules de classe I du CMH en surface des cellules (105,106).

Une altération de l'expression de la β_2 -microglobuline, la chaîne légère de la molécule de classe I du CMH survient aussi dans différents cancers (107,108). En l'absence de la β_2 -microglobuline, il survient un mauvais assemblage des molécules de classe I du CMH et une perte de l'expression de celles-ci. Des évidences cliniques ont démontré qu'une réapparition des lésions après qu'une réponse clinique à une immunothérapie dirigée ait été observée chez des patients atteints de mélanome métastatique était associée avec une perte du CMH de classe I dans une grande proportion des cas. Cette perte était causée par une mutation dans une copie du gène de la β_2 -microglobuline et par une perte de l'autre copie (100,109).

Deux sous-unités induites par l'IFN- γ pouvant s'associer au protéasome, LMP-2 et LMP7, favorisent la génération de peptides antigéniques capables de lier les molécules de classe I du CMH. Une régulation négative de ces sous-unités a été observée dans plusieurs lignées cellulaires tumorales (110).

De multiples mutations impliquant plusieurs des gènes responsables de l'apprêtement et de la présentation des antigènes peuvent affliger une cellule tumorale (109) et ainsi lui conférer un fort avantage sélectif vis-à-vis du système immunitaire.

1.5.2 Perte d'antigènes tumoraux

En plus des conséquences liées aux mutations et/ou délétions de différents gènes associés à la présentation antigénique, la perte d'AT peut survenir. Celle-ci est par ailleurs associée à une progression de la maladie. Une absence ou une faible expression des protéines cibles peut nuire à une immunité anti-tumorale durable. Il a été démontré que les AT reconnus par les CTL isolés de lésions métastatiques de mélanomes récurrents sont différents de ceux reconnus par les CTL provenant de lésions primaires autologues (111). De plus, un traitement immunothérapeutique ciblant un antigène particulier peut favoriser l'émergence de certains autres antigènes. Des biopsies prélevées pré- ou post-transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques à un antigène du mélanome, MART-1, ont révélé que les lésions résiduelles ou récurrentes avaient perdu l'expression de l'antigène ciblé, alors que l'expression d'autres antigènes bien connus du mélanome était restée intacte (112). Ceci suggère que plusieurs AT devraient être ciblés lors d'essais immunothérapeutiques.

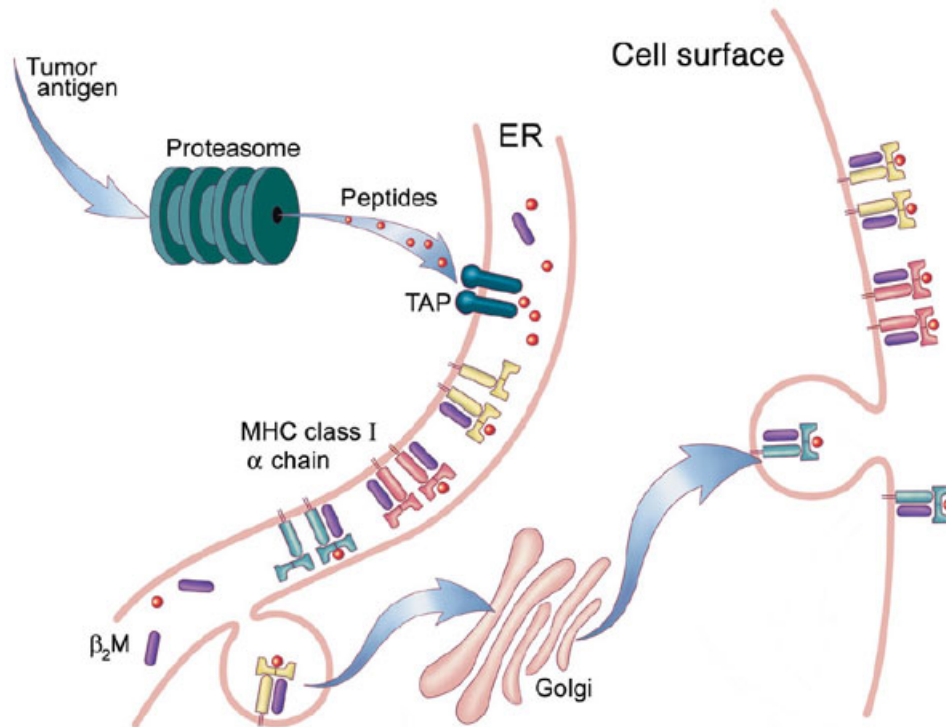


Figure 6 Mécanismes moléculaires responsables des déficiences en CMH de classe I. (Figure tirée de (113))

Légende: Les AT sont apprêtés dans le protéasome ce qui génère des peptides qui sont ensuite transportés par TAP au RE où ils se lient à certains CMH de classe I. Les complexes CMH-peptide sont transportés via l'appareil de Golgi vers la surface cellulaire. Plusieurs défauts sont associés avec l'évasion tumorale de la reconnaissance par le système immunitaire: **(a)** Perte d'hétérogénéité, défaut dans la régulation transcriptionnelle ou mutations spontanées impliquant le gène des molécules de classe I du CMH; **(b)** des défauts dans le transporteur peptidique TAP causent une diminution des molécules de classe I du CMH; **(c)** défauts dans les composants de la machinerie d'apprêtement des antigènes, telles les sous-unités du protéasome LMP-2 et LMP-7, résultent en une diminution d'expression des CMH de classe I; **(d)** des délétions ou mutations dans le gène de la β_2 -microglobuline résultent en une perte totale des molécules de classe I du CMH.

1.5.3 Défaut de signalement par les récepteurs de mort cellulaire et expression de ligands pour les récepteurs de mort cellulaire

Le ligand de Fas (FasL) et le *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) exprimés par les lymphocytes T sont deux systèmes impliquant le signalement par des récepteurs de mort cellulaire qui contribuent à l'immunosurveillance tumorale. La liaison de ces ligands à leur récepteur à la surface des cellules tumorales engendre la transmission de signaux via le « domaine de mort » présent sur la portion cytoplasmique du récepteur. Il s'en suit l'activation d'une cascade de signaux impliquant plusieurs caspases et menant à la mort cellulaire. Les cellules tumorales peuvent devenir résistantes à cette mort cellulaire de différentes façons. En plus de présenter des mutations dans le domaine cytoplasmique de Fas qui empêche son signalement (114), elles peuvent produire un inhibiteur de la caspase 8 pour échapper à l'apoptose (115). De plus, des mutations peuvent inactiver des éléments nécessaires pour le signalement qui se situent en aval du récepteur de mort cellulaire, dont FADD et la caspase 10. La perte d'expression du récepteur de TRAIL ou de composantes impliquées dans le signalement par TRAIL peuvent aussi survenir (116).

Il a aussi été proposé que ce mécanisme de mort cellulaire soit une arme à double tranchant et puisse être mis à profit des cellules tumorales afin de s'évader du système immunitaire. L'expression du FasL par les cellules tumorales a initialement été décrite dans le cancer du côlon, puis dans plusieurs autres types de cancers (117,118). Selon ces études, l'expression de FasL conférerait aux cellules tumorales la capacité d'activer des signaux menant à la mort des lymphocytes T présents dans l'environnement tumoral exprimant le récepteur Fas. Une controverse entoure cependant cette hypothèse dans la littérature, puisque d'autres études ont démontré que les cellules tumorales exprimant FasL n'induisent pas l'apoptose de cibles exprimant Fas (119).

1.5.4 Co-inhibition et manque de co-stimulation

Pour être convenablement activé, un lymphocyte T doit recevoir 2 signaux; le premier fourni par la reconnaissance d'un complexe CMH-peptide par son TCR spécifique, et le second est issu d'une liaison entre la molécule CD28 en surface du lymphocyte T et l'un de ses ligands, soit B7-1 ou B7-2. En absence de ce second signal, la cellule T deviendra anergique plutôt qu'activée (120). Cette condition est aussi requise pour l'activation et l'expansion des TIL. Cependant, la majorité des tumeurs solides n'expriment pas ces ligands de co-stimulation.

Les bénéfices que peut procurer la présence de B7 sur les cellules tumorales ont été évalués à l'aide de modèles précliniques et lors d'essais cliniques. Chez la souris, des cellules tumorales transfectées avec des molécules de co-stimulation B7 sont rejetées *in vivo* alors que les cellules de type sauvage s'établissent pour former des tumeurs (121). De plus, un vaccin basé sur des vecteurs encodant B7 permet le traitement de tumeurs établies. Cependant chez l'humain, des vaccins basés sur des vecteurs viraux encodant des antigènes associés aux tumeurs (TAA) et des molécules de co-stimulation entraînent une augmentation des cellules T spécifiques à l'antigène en périphérie, mais les régressions tumorales sont peu fréquentes (122,123). Les tumeurs humaines étant généralement peu immunogéniques, le manque de co-stimulation n'est pas le seul mécanisme expliquant l'évasion tumorale.

Il existe par ailleurs d'autres molécules de co-stimulation qui, à l'inverse de CD28, ont pour rôle d'atténuer la réponse immunitaire en antagonisant l'action de CD28. Ainsi, la balance des signaux positifs et négatifs que procurent les molécules de co-stimulation est cruciale pour déterminer l'activation ou l'inactivation des lymphocytes T. Lorsque la balance favorise la co-inhibition, le signalement permet d'amoindrir la réponse des lymphocytes T, ce qui n'est pas souhaitable dans le contexte d'une réponse anti-tumorale qui doit perdurer. L'une de ces molécules inhibant le signalement par B7 et qui auraient un

rôle à jouer dans l'évasion tumorale est le CTLA-4, qui a une meilleure affinité que CD28 pour un même ligand, les molécules B7. Contrairement au CD28 qui est exprimé de façon constitutive à la surface des lymphocytes T, le CTLA-4 est induit de façon transitoire suite à une activation des lymphocytes T. Cela fait d'elle une molécule intéressante à cibler, ce qui est réalisable en clinique grâce à des anticorps monoclonaux destinés à bloquer son engagement avec B7. Cependant, ayant un rôle à jouer dans le maintien de la tolérance périphérique, le blocage de cette molécule entraîne des conséquences indésirables telles des réactions auto-immunes (124).

L'interaction entre la molécule *programmed death receptor ligand-1* (PD-L1) et son récepteur PD-1 présent à la surface des lymphocytes T est une autre voie de co-inhibition conférant un avantage aux tumeurs. En effet, le signalement par PD-1 entraîne un état de tolérance des lymphocytes T envers les cellules tumorales, les rendant moins susceptibles à la lyse *in vitro*, et plus invasives *in vivo* (125). Une expression accrue de PD-1 est retrouvée en surface des TIL par rapport aux PBMC correspondant (126). De plus, une surexpression des ligands de PD-1 est rapportée dans plusieurs cancers murins et humains, et corrèle avec un pronostic défavorable (127,128). Une telle surexpression est non seulement retrouvée chez les cellules tumorales mais aussi chez les APC, ce qui a pour effet d'altérer l'activation des lymphocytes T (129).

1.5.5 Diminution de la transduction du signal par le récepteur des cellules T

Des défauts intrinsèques aux lymphocytes T peuvent aussi affecter la réponse anti-tumorale en entraînant leur dysfonction. Une prolifération diminuée des lymphocytes T infiltrant les tumeurs en réponse à une stimulation par le TCR a été rapportée dans différentes études (130) laissant supposer un signalement défectueux par celui-ci. Il a en effet été démontré que des altérations dans le complexe du récepteur des cellules T peuvent survenir. Une diminution du niveau d'expression de la chaîne CD3 ζ , qui est responsable de

la transduction du signal lors d'une activation par le TCR, peut survenir et affecter négativement la réponse de ceux-ci.

Des défauts associés à des composantes du TCR ont d'abord été identifiés dans des modèles murins de carcinomes rénaux ou colorectaux (131). Une perte d'expression de la chaîne zêta du TCR ainsi que de d'autres molécules intracellulaires impliquées dans le signalement des lymphocytes T, telles les tyrosines kinases p56^{lck} et p59^{fyn} ont alors été décrites chez les lymphocytes T de la rate de ces souris porteuses de tumeurs. Chez l'humain, une telle perte d'expression de la chaîne CD3ζ des TIL a été rapportée pour la première fois chez des patients atteints d'un carcinome rénal (132), puis colorectal (133). Une diminution marquée ou une absence complète de p56 caractérisait aussi les TIL, alors qu'elle n'affectait pas les cellules du sang périphérique (132). Lorsque présentes chez les lymphocytes T, ces altérations affectant le signalement par le TCR diminuent leur activation et donc la réponse anti-tumorale. Ainsi, chez des patients atteints d'un mélanome ou d'un carcinome gastrique, une diminution du taux de survie a été associée avec une perte de CD3ζ (134,135).

Un autre type de défaut impliquant la signalisation par le TCR a récemment été élucidé par le groupe de van der Bruggen (136), alors qu'ils ont identifié une perte de la proximité entre le TCR et son co-récepteur, le CD8, à la surface des TIL. Pour l'activation d'un lymphocyte T, ces deux molécules doivent se concentrer dans la région de contact entre la cellule cible et le lymphocyte T, soit la synapse immunologique. Lorsqu'une proximité ne peut s'installer entre le TCR et le CD8 suite à un stimulus, il en résulte l'anergie des lymphocytes T. L'absence de co-localisation entre le TCR et son co-récepteur CD8 observée sur des TIL de carcinome mammaire et ovarien résulte d'une séquestration des molécules de TCR par des treillis de galectine-3. Ce phénomène de séquestration peut être renversé par la présence de ligands de la galectine-3, tels la N-acetyllactosamine, permettant la libération des molécules de TCR et ainsi une activation adéquate des TIL.

1.5.6 Les cellules immunorégulatrices

L'accumulation de différents types d'effecteurs immunosuppresseurs dans le microenvironnement tumoral et les ganglions drainant les tumeurs est fréquemment observée et peut contribuer à l'inhibition de la réponse anti-tumorale.

Les Treg

Un avancement majeur dans la compréhension de la suppression de l'immunité anti-tumorale est sans contredit l'identification d'une population de lymphocytes T ayant une activité régulatrice. Cette population cellulaire aujourd'hui reconnue par l'expression à sa surface cellulaire de différents marqueurs associés aux lymphocytes T activés tels CD25, GITR et CTLA-4, se distingue généralement par son expression du facteur de transcription *forkhead box P3* (FoxP3). Ce sous-type cellulaire ayant des propriétés suppressives a été décrit pour la première fois en 1972, mais a retenu l'intérêt que plusieurs années plus tard alors que Sakaguchi et collègues (137) l'ont associée à un rôle dans le maintien de la tolérance périphérique et de prévention de l'auto-immunité. Considérant que les antigènes dérivés des cellules tumorales proviennent généralement de protéines du soi, les mécanismes maintenant la tolérance immunologique aux composantes du soi permettent aussi l'établissement d'une tolérance immunitaire envers les tumeurs. Ainsi, un rôle dans la suppression de l'immunité anti-tumorale leur a été attribué alors que le groupe de Sakaguchi a démontré des régressions tumorales complètes chez des souris ayant préalablement subi une déplétion des cellules CD25⁺ par l'administration d'un anticorps anti-CD25 (138).

Chez l'humain, les Treg sont retrouvées en plus forte proportion dans le sang périphérique de patients atteints de cancer par rapport à des individus sains, et peuvent induire une tolérance périphérique envers les cellules tumorales, ce qui faciliterait la dissémination de métastases (27,139). De plus, ces cellules aux propriétés suppressives ont une fréquence plus élevée parmi les lymphocytes T CD4⁺ infiltrant les tumeurs en

comparaison avec le sang périphérique des patients atteints de cancer (27). Les Treg s'accumulent aussi de façon substantielle dans le tissu tumoral de différents types de cancers (140), ainsi que dans les ascites associées dans le cas du cancer de l'ovaire. Ces cellules régulatrices sont recrutées spécifiquement à ces sites par un mécanisme impliquant une interaction entre la chémokine CCL22 produite par les cellules tumorales et son récepteur CCR7 présent sur les Treg (28).

L'élimination de ces cellules suscite donc beaucoup d'intérêt d'un point de vue thérapeutique pour les patients atteints de cancer. Celle-ci peut s'accomplir grâce à des anticorps anti-CD25 ou la denileukin diftotox, qui consiste en une protéine de fusion entre l'IL-2 et les domaines de translocation et d'activité enzymatique de la toxine de diphtérie, entraînant l'apoptose des cellules qui internalisent cette chimère. Ce dernier traitement s'est montré inefficace chez les patients atteints de mélanome tant pour éliminer les Treg que pour améliorer la réponse anti-tumorale (141). Il a cependant permis une diminution des $CD4^+CD25^+$ ainsi qu'une augmentation de la réponse des CTL spécifiques à la tumeur lorsque combiné à un vaccin basé sur des DC transfectés administré à des patients atteints de carcinome des cellules rénales (142).

Les DC tolérogéniques

De par leur multiples propriétés dont leur forte expression des molécules du CMH et de co-stimulation, leur capacité à capter des antigènes et à migrer aux ganglions lymphatiques, ainsi que leur production de cytokines immuno-stimulatrices, les DC sont considérées comme les APC les plus efficaces. Cependant, selon leur état d'activation ou de maturation, elles peuvent à l'inverse engendrer la tolérance. En effet, selon les stimuli présents dans l'environnement auquel elles sont exposées, ces cellules dotées d'une grande plasticité peuvent promouvoir l'activation ou la suppression de la réponse immunitaire. Bien que les DC dites plasmacytoïdes soient plus souvent associées à un profil tolérogénique, les DC d'origine myéloïde peuvent elles aussi être associées à la tolérance

lorsqu'elles ne reçoivent pas les signaux nécessaires à leur maturation. D'ailleurs, chez l'humain, une faible infiltration de DC a été rapportée dans différents cancers, et celles qui y sont présentes se trouvent dans un état immature (143). Il a été observé que les DC matures sont retenues dans la zone péri-tumorale (143), alors qu'un recrutement actif de DC immatures dans la tumeur se produit dans plusieurs types de cancers. Ce recrutement serait causé certains facteurs produits par les tumeurs, tels la chémokine CCL20 ayant été identifiée comme un attractant pour les DC immatures (144). D'autres facteurs provenant de la tumeur, dont l'IL-6, l'IL-10, le *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) et le VEGF, bloquent quant à eux la différenciation et la maturation des DC (145,146). En plus d'être retrouvés localement dans le tissu tumoral, les DC tolérogéniques constituent potentiellement un mécanisme de tolérance systémique. En effet, les DC retrouvées dans le sang périphérique de patients atteints cancer ont une fréquence plus faible par rapport aux donneurs contrôles (147), ou ont des capacités stimulatrices atténuées (148).

Les Tumor-associated macrophages (TAM) et Myeloïd-derived suppressor cells (MDSC)

Une autre population de cellules immunitaires pouvant infiltrer les tumeurs est associée avec une promotion de la croissance tumorale et une suppression de la réponse immunitaire contre la tumeur : les macrophages associés aux tumeurs (TAM). Ces macrophages exposés aux facteurs présents dans le microenvironnement tumoral se polarisent vers un profil dit M2 qui sécrètent des facteurs pro-inflammatoires supportant l'angiogénèse, l'invasion et le pouvoir métastatique des tumeurs, ainsi que des facteurs qui suppriment la prolifération et l'activité des lymphocytes T (revu dans (149)). Pour plusieurs types de cancers, une association a été trouvée entre la densité des TAM infiltrant et une diminution de la survie des patients, et apparaît comme un facteur pronostique indépendant (revu dans (150)). Ces données sont en accord avec des études réalisées dans des modèles murins de carcinome mammaire dans lesquels le M-CSF, essentiel à la prolifération, la

différentiation et la survie des macrophages est absent. Il en résulte un ralentissement de la progression tumorale et une diminution des métastases (151,152).

Une grande proportion des patients atteints de cancer se caractérise aussi par l'accumulation de MDSC (153,154). Ces cellules d'origine myéloïde regroupant les sous-types granulocytaires et monocytaires, ayant une expression commune de CD33, CD11b et IL-4R α (155)), ont un fort potentiel inhibiteur sur l'immunité anti-tumorale. Elles ont la capacité d'exercer un effet suppresseur autant sur l'immunité innée qu'adaptative. D'une part, l'interaction des MDSC avec des macrophages entraîne la reprogrammation de ceux-ci vers un type M2 qui favorise la progression tumorale (156). Ainsi, les macrophages produisent moins d'IL-12, une cytokine importante pour l'activité tumoricide des cellules NK (157). De par leur interaction avec les lymphocytes T, tant CD4⁺ que CD8⁺, les MDSC sont aussi des cellules supprimant l'immunité adaptative. Elles le font entre autre via leur expression de l'arginase, une enzyme qui dégrade l'arginine et réduit ainsi sa disponibilité pour la synthèse protéique, bloquant le cycle cellulaire des lymphocytes T (mécanisme discuté plus en détails dans la section 1.5.7.) Les MDSC opèrent aussi en séquestrant la cystéine, un acide aminé essentiel aux lymphocytes T, et plus particulièrement requis pour leur activation (158). De plus, les MDSC entraînent une diminution de l'expression de la L-sélectine à la surface des lymphocytes T, une molécule clé permettant la migration des lymphocytes T vers les ganglions où ils rencontrent leur antigène et sont activés (159).

1.5.7 Production de molécules immunosuppressives

Plusieurs molécules ayant des propriétés suppressives sur le système immunitaire peuvent être produites dans le microenvironnement tumoral. Deux cytokines, le TGF- β et l'IL-10, qui sont généralement associées aux fonctions suppressives des Treg peuvent aussi être produites par les tumeurs malignes. À priori, le TGF- β a un pouvoir inhibiteur sur la prolifération des tumeurs. Il perd cependant cette capacité au fil de la progression tumorale, alors que les cellules cancéreuses acquièrent des mutations soit directement sur le récepteur

du TGF- β ou sur des molécules en aval dans son signalment. Cette cytokine qui est donc associée à la progression tumorale (160), inhibe l'activation, la prolifération et la fonction des lymphocytes *in vivo* (161).

La croissance tumorale est aussi favorisée par une autre cytokine, l'IL-10 (162), dont la concentration sérique est fréquemment plus élevée chez les patients atteints de cancer (163). La présence de cette cytokine dans l'environnement tumoral peut avoir des conséquences immunosuppressives sur plusieurs types cellulaires. D'une part, elle peut biaiser la réponse immune de façon à ce qu'elle s'éloigne d'une réponse Th1 (revu dans (164)), généralement reconnue comme étant la plus favorable à une immunité anti-tumorale. L'IL-10 peut aussi interférer avec l'induction d'une réponse anti-tumorale en affectant non seulement la différenciation des DC à partir de leurs cellules souches précurseurs, mais aussi en compromettant leur maturation et leur fonction de présentation antigénique et leur production d'IL-12 (165-167). Des effets similaires ont aussi été attribués au facteur pro-angiogénique VEGF. Ce facteur fréquemment retrouvé dans l'environnement tumoral favorise non seulement la croissance de la tumeur par la formation de nouveaux vaisseaux destinés à l'apport de nutriments, mais diminue aussi l'immunité anti-tumorale en altérant les fonctions des APC professionnelles.

Parmi les molécules immunosuppressives produites dans l'environnement tumoral se retrouvent aussi des enzymes responsables du métabolisme de certains acides aminés, principalement le tryptophane et l'arginine. L'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), dont il sera question dans la section suivante, est l'enzyme responsable du métabolisme du tryptophane. Quant à l'arginine, sa dégradation peut être accomplie par l'arginase (ARG) qui existe sous deux formes, ARG1 et ARG2, ou par les *nitric-oxyde synthases* (NOS1, NOS2 et NOS3). Une activité accrue de ces enzymes a été observée dans plusieurs lignées cellulaires tumorales (168) ainsi que dans différents cancers primaires humains (169,170). De par leur activité, ces enzymes ont la capacité de promouvoir la progression tumorale. En effet, l'ornithine, un produit de dégradation de la L-arginine qui résulte de l'activité des

arginases ou des NOS, est le précurseur pour la synthèse des polyamines, servant à la prolifération cellulaire (171). De plus, le métabolisme de la L-arginine a des effets immunosuppresseurs bien documentés. Des inhibiteurs de l'arginase et de NOS permettent d'ailleurs de rétablir la prolifération et la fonction cytolytique des lymphocytes T infiltrant des tissus cancéreux (172).

Basé sur l'existence de tous ces mécanismes d'évasion et sur la pression sélective exercée par le système immunitaire sur les cellules tumorales, il apparaît peu probable qu'une immunothérapie fondée sur la reconnaissance et la destruction des cellules tumorales soit efficace à long terme sans que des mesures soient prises pour bloquer les mécanismes inhibiteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale. Les mécanismes d'évasion propres aux cancers de différents types histologiques se doivent d'être définis et bien caractérisés pour mieux y faire face dans un processus immunothérapeutique.

1.6 Indoleamine 2,3-dioxygénase

1.6.1 Description

Description du gène

L'IDO est une enzyme monomérique cytosolique contenant une molécule d'hème et dont l'activité consiste à catalyser l'étape limitante de la dégradation du tryptophane, qui est un acide aminé essentiel. Cette enzyme isolée pour la première fois en 1963 est retrouvée chez différentes espèces de mammifères. Chez l'humain, son expression ubiquitaire est distribuée dans différents organes dont la rate, l'estomac, le rein, mais principalement dans le poumon, l'intestin et le placenta (173).

L'IDO possède un homologue nommé tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO), découvert en 1936. Cette enzyme induite par le tryptophane est responsable de la dégradation du tryptophane selon la voie de la kynurénine, tout comme l'IDO. Elle se distingue par contre de l'IDO de par son expression restreinte au foie, où elle gère l'excès de tryptophane provenant de la diète.

Ce n'est qu'en 2007 que le gène de l'*indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein*, ou l'IDO2 a été identifié et caractérisé (174,175). Son expression est plus restreinte que celle de l'IDO puisque l'ARNm pleine longueur de l'IDO2 est retrouvé seulement dans le placenta et le cerveau humain. Chez la souris, son expression se limite au foie, aux tubules rénaux, et à l'épididyme (174), mais est aussi retrouvée de façon constitutive dans les DC, lesquelles peuvent l'exprimer à un niveau plus élevé suite à une stimulation par l'IFN- γ , l'IL-10 ou le lipopolysaccharide (LPS) (175). Bien que la protéine codée par le gène de l'IDO2 ne possède que 43% d'homologie avec l'IDO, les résidus critiques pour leur activité catalytique sont hautement conservés entre les deux protéines.

Rôles biologiques de l'IDO

La première fonction biologique à avoir été attribuée à l'IDO est du domaine de l'immunité innée et consiste principalement en une activité anti-microbienne. Il a d'abord été découvert que l'activité de l'IDO était induite *in vivo* dans les poumons des souris suite à une infection virale par l'influenza, et coïncidait dans le temps avec l'apparition marquée d'un infiltrat lymphocytaire (176). Ceci suggérait qu'une telle augmentation de l'activité de l'IDO était liée à la réponse inflammatoire. Le rôle précis joué par l'IDO dans la défense de l'hôte contre les pathogènes a par la suite été confirmé dans des cellules fibroblastiques capables d'inhiber la réplication de *Toxoplasma gondii* lorsqu'elles étaient traitées à l'IFN- γ suite à leur infection par le pathogène. Cette étude a permis de démontrer que les propriétés anti-microbiennes conférées aux cellules par le traitement à l'IFN- γ étaient attribuables au métabolisme du tryptophane puisque l'ajout de tryptophane exogène leur faisait perdre leur capacité à supprimer la prolifération du pathogène (177). Ces résultats s'expliquent par le fait que les microorganismes auxotrophes ne peuvent synthétiser leur propre tryptophane et sont donc particulièrement sensibles à la dégradation du tryptophane par l'IDO.

L'activité de l'IDO semblant être étroitement liée avec des conditions pathologiques et des mécanismes de défense de l'hôte, sa présence chez des patients atteints de cancer a rapidement été une source d'intérêt. Une activité *in situ* de l'IDO cinq fois supérieure dans les poumons cancéreux humains par rapport aux poumons contrôles ayant été mesurée (178), il a été proposé que cette enzyme puisse contribuer à la réponse de l'hôte contre le cancer. Dans un même courant, des propriétés anti-tumorales ont été attribuées à l'IDO sur la base d'observations *in vitro*. Il avait alors été observé que la prolifération de lignées cellulaires tumorales était inhibée par un traitement à l'IFN- γ seulement lorsqu'une augmentation du métabolisme du tryptophane était induite chez ces cellules en réponse au traitement (179). Par contre, la prolifération n'était pas affectée suite au traitement des cellules par l'IFN- γ pour les lignées n'ayant engendré aucune dégradation du tryptophane

en son sous-produit, la kynurénine. L'ajout de L-tryptophane au milieu de culture permettait de rétablir la prolifération des cellules traitées à l'IFN- γ , alors que la prolifération n'était pas augmentée par l'ajout d'autres acides aminés essentiels ou aromatiques (180). De ces études avait alors été avancé le principe que les effets anti-tumoraux de l'IFN- γ étaient attribuables à un métabolisme accru du tryptophane, et donc que l'IDO agissait négativement sur la tumeur.

La théorie selon laquelle l'IDO contribuait à la défense de l'hôte contre le cancer a été renversée par une étude pivot du groupe de David H. Munn portant sur le rôle central joué par l'IDO durant la grossesse. Le fœtus implanté dans l'utérus de la mère lors de la grossesse possède des gènes d'héritage paternel qui codent des antigènes d'histocompatibilité étrangers à la mère. Ainsi, les fœtus sont susceptibles à une reconnaissance et à une attaque par les lymphocytes T maternels. Munn et collègues ont démontré que l'IDO exprimé dans le placenta était impliquée dans la prévention du rejet du fœtus en protégeant celui-ci d'une attaque par les lymphocytes T maternels (181). Par l'administration d'un inhibiteur de l'IDO à des souris gestantes, ce groupe a démontré qu'une perte complète des embryons allogéniques se produit en moins de dix jours. L'activité de l'IDO dans le placenta est donc essentielle à la survie des fœtus. Cette étude a permis de mettre en évidence le caractère immunosuppressif de l'IDO, ouvrant la porte à des recherches se penchant sur le potentiel immuno-modulateur de cette enzyme dans des contextes allant de l'auto-immunité à l'évasion tumorale.

1.6.2 Rôle de l'IDO dans l'évasion tumorale

L'expression de l'IDO par les tumeurs leur confère une protection

L'importance de l'IDO dans le processus permettant aux tumeurs de s'évader du système immunitaire a été démontrée grâce à différents modèles murins possédant des

conditions propices à l'élimination des tumeurs. D'abord, Friberg et ses collègues (182) ont démontré que des cellules de carcinome pulmonaire exprimant l'antigène H-2K^b pouvaient former des tumeurs même lorsqu'injectées à des souris transgéniques possédant une majorité de lymphocytes T dont le TCR est spécifique à cet antigène. Ces observations laissaient supposer la participation d'un mécanisme induisant la tolérance des lymphocytes T envers les cellules tumorales. Cet état tolérogénique des lymphocytes T a d'ailleurs pu être expliqué par la présence de cellules exprimant l'IDO se retrouvant dans les tumeurs, puisque l'inhibition de l'activité de l'IDO a permis de retarder le développement des tumeurs.

Une autre évidence d'un mécanisme d'évasion tumorale impliquant l'IDO a été apportée par Uyttenhove et ses collègues (183), grâce à un modèle murin de mastocytome P815. L'injection intra-péritonéale de cellules P815 mène généralement à la production de tumeurs progressives, bien qu'elles soient fortement immunogéniques. Lorsque les souris sont préalablement immunisées avec l'antigène P1A dérivé des tumeurs P815, elles rejettent les cellules tumorales injectées. Cependant, lorsque les cellules tumorales sont transfectées avec l'IDO, elles résistent au rejet par le système immunitaire et une croissance tumorale est mesurable. Celle-ci s'accompagne d'une forte diminution du nombre de cellules T spécifiques à P1A dans la cavité péritonéale. L'administration d'un inhibiteur de l'IDO aux souris permet de ralentir la progression tumorale.

De façon similaire, une xénogreffe de cellules tumorales SKOV3 surexprimant l'IDO entraîne une augmentation de la dissémination intrapéritonéale et une progression tumorale accélérée *in vivo* en comparaison avec les cellules SKOV3 natives (184).

Les effets d'une surexpression de l'IDO par les cellules tumorales *in vivo* convergent donc tous vers une contribution à la progression tumorale et à l'évasion du système immunitaire. Par contre, les conséquences directes sur les propriétés *in vitro* des cellules tumorales liées au fait qu'elles expriment ou non l'IDO sont controversées. D'une

part, la transfection stable de l'IDO chez la lignée de cancer de l'ovaire SKOV3 ne provoque aucun changement quant à la prolifération, la migration, l'invasion et la chimio-sensibilité au paclitaxel *in vitro* lorsqu'elle est comparée à la même lignée ne surexprimant pas l'IDO (185). Cependant, d'autres études ont plutôt démontré que le potentiel prolifératif des cellules tumorales se voit diminué lorsque celles-ci expriment l'IDO (179,186). Il est toutefois concevable que les effets observés *in vitro* soient différents de ce qui peut se produire *in vivo* alors que les cellules tumorales exprimant l'IDO se retrouvent en contact étroit avec des cellules immunes. Dans un tel contexte, la balance des effets intrinsèques de l'IDO sur les cellules tumorales et extrinsèques sur l'immunité pourrait donner l'avantage aux cellules tumorales. D'autre part, les divergences observées *in vitro* quant aux conséquences d'une surexpression de l'IDO par les différentes lignées cellulaires tumorales pourraient s'expliquer par l'expression différentielle d'une autre enzyme co-induite avec l'IDO, dont le rôle serait de protéger l'activité cellulaire.

Co-induction de la tryptophanyl-tRNA synthétase avec l'IDO

Bien que la déplétion du tryptophane dans l'environnement des cellules exprimant l'IDO puisse être nuisible au point de vue de la synthèse protéique et de la prolifération de celles-ci, elles peuvent bénéficier d'un mécanisme d'auto-protection. En effet, une autre enzyme peut être co-induite avec l'IDO et ainsi prévenir une carence en tryptophane chez ces mêmes cellules (187). La tryptophanyl-tRNA synthétase catalyse la liaison entre le tryptophane libre et son ARN de transfert (ARNt) correspondant, permettant ainsi de générer un réservoir de complexes tryptophane-ARNt prêts à être utilisés pour la synthèse protéique (188,189). Les cellules deviennent ainsi moins susceptibles aux effets néfastes engendrés par leur propre production d'IDO.

Expression de l'IDO étendue aux ganglions lymphatiques drainant les tumeurs

Non seulement l'activité de l'IDO peut être détectée dans les cellules tumorales elles-mêmes, mais tant chez la souris que chez l'humain, des APC exprimant l'IDO ont été retrouvées au sein des tumeurs ou dans les ganglions lymphatiques drainant les tumeurs. Ces dernières consistent principalement en un sous type particulier de DC plasmacytoïdes qui, même en ne constituant qu'une infime fraction de l'ensemble des cellules d'un ganglion (0,5%), ont le pouvoir de supprimer la réponse des lymphocytes T aux antigènes (190). Des études réalisées chez des souris IDO knockout suggèrent que l'activité de l'IDO aurait une importance biologique à deux sites anatomiques différents, soit le foyer tumoral et les ganglions lymphatiques drainant la tumeur (TDLN). L'activation de l'IDO dans les cellules tumorales elles-mêmes ou dans les DC régulatrices des TDLN apparaissent comme étant suffisant pour faciliter l'évasion tumorale (191).

1.6.3 Mécanismes menant à l'immunosuppression par l'IDO

L'IDO peut créer un environnement tolérogénique en ayant des conséquences néfastes sur la prolifération, la fonction, la survie et le phénotype des lymphocytes T environnants. Ces effets peuvent être une conséquence directe de l'activité de l'IDO ou être provoqués indirectement par celle-ci. La figure 7 résume les effets immunosuppresseurs liés à la dégradation du tryptophane par l'IDO.

Les 2 théories expliquant l'immunosuppression directe des lymphocytes T par l'IDO

Deux principales théories ont été proposées pour expliquer les effets immunosuppresseurs de l'IDO sur les lymphocytes T : celle d'une carence en tryptophane et celle des métabolites immunomodulateurs dérivés du tryptophane.

D'une part, la disponibilité réduite du tryptophane engendrée par l'activité de l'IDO aurait des effets similaires sur les lymphocytes T à ceux observés chez les bactéries exposées à cette enzyme. Les lymphocytes T mis en présence de cellules exprimant de l'IDO fonctionnelle sont exposés à une diminution du tryptophane disponible dans leur environnement et il en résulte l'arrêt de leur prolifération en raison d'un point de contrôle sensible au tryptophane. En absence de tryptophane, les lymphocytes T peuvent s'engager dans le cycle cellulaire, mais ils sont bloqués à mi-chemin dans la phase G1 (192). Une addition de tryptophane leur permet de poursuivre dans le cycle cellulaire seulement dans des conditions où le TCR est restimulé. Une telle privation en tryptophane provoque aussi l'anergie des lymphocytes T. En effet, en absence de tryptophane, ils ne parviennent pas à être activés par un antigène qui leur est présenté (190).

Ces effets induits chez les lymphocytes T seraient provoqués par l'activation d'une voie de stress cellulaire impliquant la kinase *general control non-depressible 2* (GCN2), sensible aux faibles concentrations d'acides aminés. Une carence en l'un des acides aminés cause une augmentation du nombre d'ARNt non chargés. Ceux-ci se lient donc à un domaine de régulation présent sur la kinase GCN2, ce qui entraîne son activation. Il s'en suit la phosphorylation du facteur d'initiation ribosomal eIF2 α qui initie un programme de réponse au stress, l'*Integrated Stress Response*. Selon Munn et ses collègues, lorsque la concentration de tryptophane descend sous le seuil critique de 3 μ M, la kinase GCN2 est activée chez les lymphocytes T (193). De la même façon, cette voie est activée lorsque les lymphocytes T sont mis en présence de cellules exprimant l'IDO. Par ailleurs, l'effet inhibiteur d'une absence de tryptophane sur la prolifération des lymphocytes T est renversé par l'ajout de tryptophane en excès, ce qui supporte fortement la théorie de la carence en tryptophane.

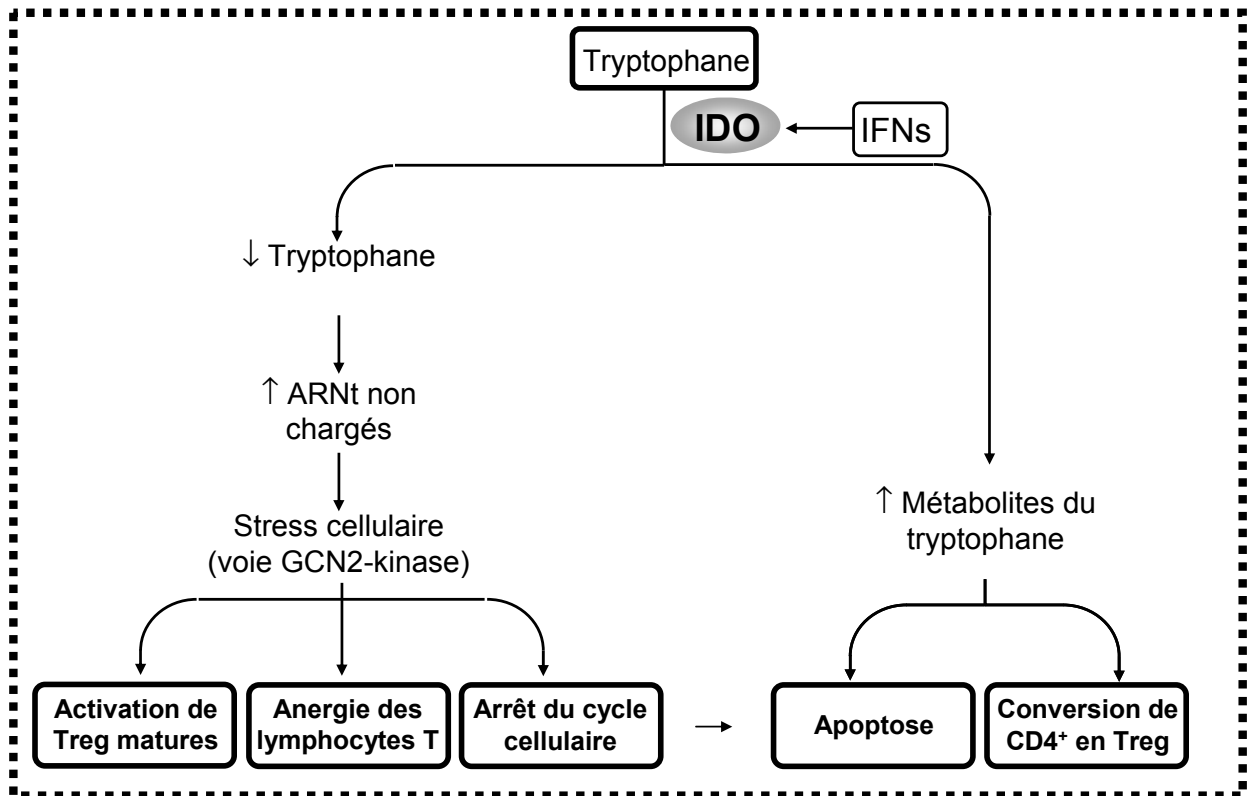


Figure 7 Mécanismes d’immunosuppression médiés par l’IDO (figure inspirée de (194))

Légende: L’activité enzymatique de l’IDO résulte en la déplétion locale du tryptophane et l’augmentation locale de la concentration des métabolites issus de cette dégradation. Le faible niveau de tryptophane peut causer une élévation dans le niveau d’ARNt non chargés dans les lymphocytes T environnants, résultant en l’activation de la voie de stress cellulaire de la kinase GCN2 sensible aux acides aminés. Le signalement par cette voie cause l’arrêt du cycle cellulaire et l’induction de l’anergie chez les lymphocytes T répondeurs, en plus de l’activation de Treg matures. L’augmentation locale des métabolites du tryptophane peut causer l’arrêt du cycle cellulaire, l’apoptose des lymphocytes T et la conversion de lymphocytes T CD4⁺ naïfs en Treg.

Il est connu que l'IDO est l'enzyme responsable de la première étape du catabolisme du tryptophane, dont le produit principal est la kynurénine, mais pouvant générer plusieurs autres sous-produits globalement appelés les kynurénines (Figure 8). L'implication des métabolites du tryptophane dans l'effet immunosuppresseur de l'IDO découle de la toxicité de certains sous-produits dérivés de la dégradation du tryptophane observée chez les lymphocytes T. D'une part, des effets anti-prolifératifs ont été attribués à certains métabolites du tryptophane, dont la kynurénine, la 3-hydroxykynurénine, l'acide 3-hydroxyanthranilique et l'acide picolinique (195,196). Ces effets négatifs sur la prolifération des lymphocytes T sont additifs lorsqu'une combinaison de métabolites est utilisée. En plus de l'arrêt de leur prolifération, lorsque les lymphocytes T sont exposés de façon prolongée aux différents métabolites du tryptophane, leur survie s'en trouve affectée de façon dépendante au temps (195). Une observation importante concerne le fait que les lymphocytes T activés sont plus affectés par les produits provenant de la dégradation du tryptophane que les lymphocytes T non activés (195,196). Contrairement aux effets d'une carence en tryptophane qui nécessitent une re-stimulation du TCR pour être renversés, les effets causés par les métabolites du tryptophane peuvent être renversés par le retrait des métabolites, sans égard à une re-stimulation des lymphocytes T (196).

Les produits de dégradation du tryptophane ont des conséquences sur la prolifération et la survie des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺, mais aussi des cellules NK et des lymphocytes B (195,196). Cependant, il a été démontré que la sous-population de lymphocytes T CD4⁺ Th2 chez la souris n'est pas assujettie à la mort cellulaire par apoptose suite à une exposition aux métabolites du tryptophane (197).

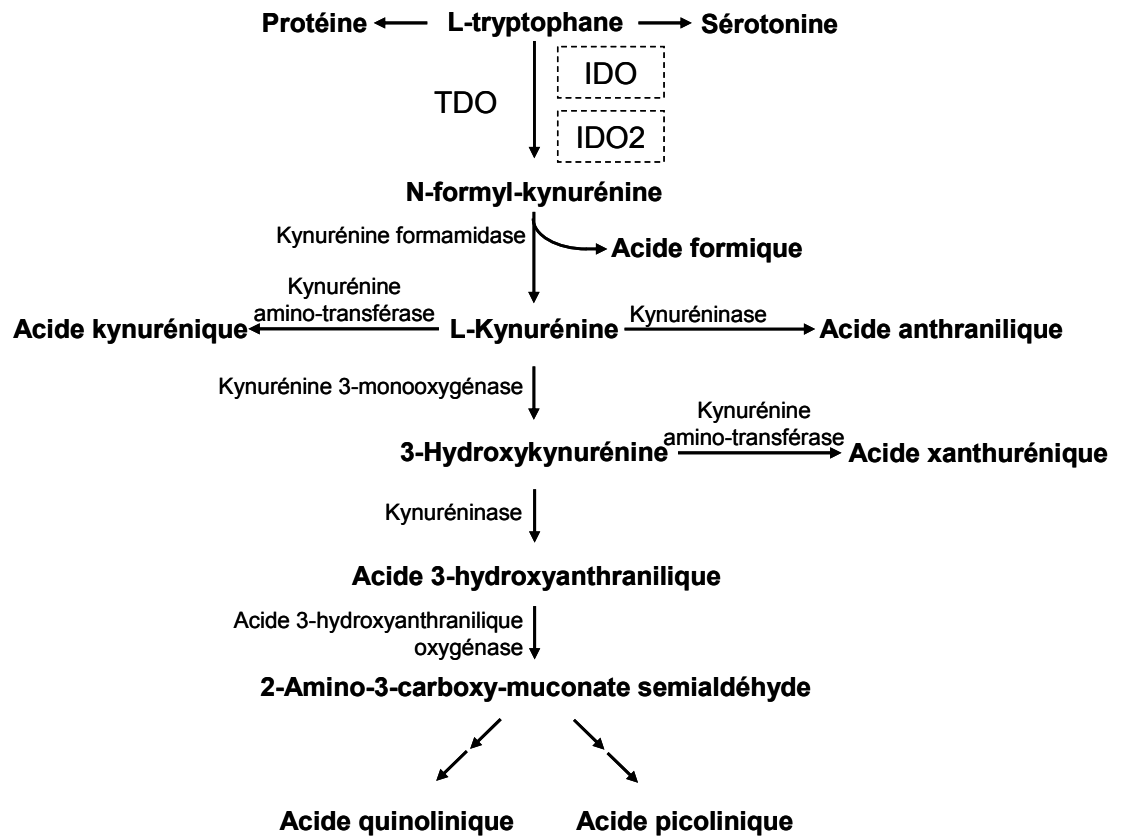


Figure 8 Métabolisme du tryptophane par la voie de la kynurénine (*Figure inspirée de (198)*)

Légende: Le L-tryptophane non utilisé pour la synthèse protéique est métabolisé suivant la voie de la kynurénine. L'étape initiale et limitante est catalysée par l'enzyme hépatique TDO ou, dans d'autres tissus, par l'IDO ou l'IDO2. La *N*-formyl-kynurénine est alors convertie en acide formique et en kynurénine, laquelle peut être métabolisée en différents sous-produits.

Les théories de la carence en tryptophane et celle des métabolites du tryptophane ne s'excluent pas mutuellement. Ces deux mécanismes pourraient même se compléter, puisqu'il a été observé qu'une faible concentration en tryptophane sensibilise davantage les cellules aux effets de ses métabolites toxiques (196). Par ailleurs, une autre conséquence de l'IDO sur les lymphocytes T est la diminution d'expression de la chaîne ζ du TCR parmi la population $CD8^+$. La perte réversible de cette molécule essentielle au signalement par le TCR, rendant les lymphocytes T anergiques, ne survient seulement que lorsque les cellules sont exposées à la fois à une faible concentration de tryptophane et à la présence des kynurénines (199). Une contribution de ces deux mécanismes à l'immunosuppression engendrée par l'IDO serait donc fort plausible.

Effets indirects de l'IDO sur les fonctions des lymphocytes T : induction d'un phénotype régulateur

En plus des conséquences directes de l'activité de l'IDO sur les lymphocytes T, cette enzyme peut engendrer des effets immunosuppresseurs en favorisant l'émergence de Treg. En effet, il existe chez la souris une population de DC qui, lorsqu'elle exprime l'IDO, peut provoquer la reprogrammation de lymphocytes T $CD4^+$ naïfs en Treg ayant des fonctions suppressives (199). Cette conversion se produit suite à une exposition prolongée des lymphocytes T $CD4^+CD25^+$ à l'IDO. En plus de générer des Treg *de novo*, les DC- IDO^+ ont aussi la capacité d'activer fortement les fonctions suppressives des lymphocytes T possédant déjà un phénotype de Treg mature dans les TDLN (200). Ceci leur confère un caractère immunosuppresseur dominant pouvant s'installer très rapidement. Une telle activation dépend non seulement de la liaison entre les molécules B7 des DC et le CTLA-4 des Treg, mais aussi d'une interaction impliquant le CMH (200). Cependant, le profil régulateur induit par les DC IDO^+ peut être renversé par le blocage de l'IDO. Cette inhibition résulte en une conversion *in vitro* et *in vivo* des Treg en des lymphocytes T ayant des propriétés non-suppressives, pro-inflammatoires et dont le profil s'apparente à la sous-population lymphocytaire Th17 (201). Une amélioration de la réponse anti-tumorale est

d'ailleurs provoquée *in vivo* dans un modèle murin lorsque les conditions permettent la reprogrammation des Treg en Th17.

Chez l'humain, des interactions entre des Treg FoxP3⁺ et des DC IDO⁺ ont été observées dans des ganglions lymphatiques métastatiques provenant de patients atteints d'un cancer du col de l'utérus (202). Ces interactions pourraient être à l'origine de mécanismes similaires à ce qui est observé chez la souris, quant à la complémentarité entre l'expression de l'IDO et les Treg.

Par ailleurs, chez l'humain, des évidences claires de l'existence d'un tel mécanisme de conversion induit par des cellules tumorales IDO⁺ ont été amenées par Curti et ses collègues (203). En effet, il a été démontré que des lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ sont convertis en CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ ayant des fonctions suppressives suite au contact *in vitro* de cellules tumorales provenant de patients atteints de leucémie myéloïde aigüe (AML) exprimant l'IDO (203). Un milieu conditionné par ces mêmes cellules entraîne aussi cet effet. Cette conversion se produit suite à la dégradation du tryptophane par l'IDO puisqu'elle est bloquée par l'ajout d'un inhibiteur de l'IDO. La privation en tryptophane n'aurait pas d'effet dans ce phénomène de conversion, mais l'apparition des métabolites du tryptophane serait en cause. De plus, la conversion en CD4⁺CD25⁺ *in vitro* est stable puisque les cellules ne retrouvent pas leur phénotype CD25⁻ après le retrait des cellules AML IDO⁺, contrairement à ce qui a été observé dans le cas des Treg induits par les DC IDO⁺.

1.6.4 Régulation de l'expression de l'IDO

Effets de différentes cytokines sur l'expression de l'IDO

Les IFN de type I (IFN- α/β) et de type II (IFN- γ) sont reconnus pour leurs effets inducteurs sur l'expression de l'IDO dans plusieurs types cellulaires (204). De ceux là, l'IFN- γ est le principal inducteur de l'IDO et peut engendrer une expression et une activité enzymatique d'environ dix fois supérieure à celle induite par l'IFN- α (178,205), selon le type cellulaire. Ceci peut s'expliquer en partie par le fait qu'en réponse à l'IFN- α , l'IDO est induit rapidement, mais de façon transitoire. Son expression atteint un sommet à 6h et retourne au niveau basal en moins de 12h. De son côté, l'IFN- γ continue d'induire l'expression de l'IDO à plus long terme, et cette expression reste stable dans le temps lors d'une exposition soutenue à l'IFN- γ . De plus, la transcription de l'IDO en réponse à l'IFN- γ est bloquée par des inhibiteurs de la synthèse protéique, ce qui n'est pas le cas pour l'induction en réponse à l'IFN- α (205,206). Ce mécanisme d'induction passe donc par la stimulation de la production *de novo* d'un autre facteur protéique, possiblement un facteur de transcription, requis pour l'activation transcriptionnelle de l'IDO en réponse à l'IFN- γ . Chez les DC, cette induction transcriptionnelle de l'IDO dépend du signalement par le *signal transducer and activator of transcription-1* (STAT-1), essentielle au signalement en réponse aux IFNs (207).

Par ailleurs, d'autres cytokines ont été décrites pour leur action sur le niveau d'expression de l'IDO. Certaines cytokines pro-inflammatoires n'induisent pas à elles seules l'expression de l'IDO, mais parviennent à potentialiser l'effet inducteur des IFNs. Dans les cellules épithéliales, l'expression de l'IDO induite par l'IFN- γ est augmentée par des cytokines pro-inflammatoires telles l'IL-1 β et le *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α). L'IL-1, le TNF- α et le LPS exacerbent aussi les effets de l'IFN sur l'induction de l'IDO par les macrophages (208,209). Une démonstration de l'importance de ces signaux pour l'induction de l'IDO *in vivo* a été faite grâce à des souris injectées avec du phorbol

myristate acétate (PMA), qui induit une inflammation locale marquée. Chez ces souris, il en résulte une apparition de DC plasmacytoïdes IDO⁺ dans les ganglions drainant le site d'injection. Les signaux provenant des IFNs de type I et de type II, mais aussi de l'IL-1 sont d'ailleurs requis pour que l'IDO exprimée par les DC dérivés des TDLN soit fonctionnelle (210). Un autre fait intéressant à noter concerne l'expression de l'IDO dans le cancer hépatocellulaire humain, dont le niveau d'expression de l'ARNm a été corrélé positivement avec celui de l'IFN- γ , du TNF- α et de l'IL-1 β (211).

À l'inverse, des cytokines anti-inflammatoires, telles le TGF- β , l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 contrôlent l'expression de l'IDO. Bien qu'à elles seules elles n'influencent pas le niveau d'expression de l'IDO (212,213), ces cytokines agissent comme antagonistes sur l'action de l'IFN- γ chez différents types cellulaires, dont les monocytes et les fibroblastes humains (214-216). Cependant, ces effets antagonistes ne se produisent pas dans tous les types cellulaires. À l'inverse, dans les cellules de la microglie murine, l'IL-4 et l'IL-13 ont une action conjointe avec l'IFN- γ , menant à une augmentation de l'induction de l'expression de l'IDO (213).

Induction de l'IDO par les Treg

En plus des différentes cytokines régulant l'expression de l'IDO, les Treg CD4⁺CD25⁺ murins peuvent aussi activer le métabolisme du tryptophane dans les DC. Ce mécanisme est dépendant de la liaison des molécules B7 et de CTLA-4 présents respectivement à la surface des DC et des Treg, et passe par une induction de la production d'IFN- γ par les DC. Suite à l'activation de cette voie chez les DC, celles-ci acquièrent des propriétés suppressives *in vivo* (217).

Un mécanisme similaire d'induction de l'IDO a été rapporté *in vitro* pour les DC humaines, mais par la voie des lymphocytes T CD4⁺ non-régulateurs plutôt que par les Treg. Une liaison entre la molécule B7 des DC et le CD28 ou le CTLA-4 des lymphocytes

T CD4⁺ est requise pour que l'IDO exprimée par les DC soit sous une forme active (218). Par contre, on n'a pas encore élucidé si un tel mécanisme avait une incidence biologique chez l'humain. En effet, dans une étude visant à déterminer les mécanismes d'action d'un vaccin à anticorps anti-CTLA-4, des biopsies ont été prélevées avant ou après le traitement chez des patients atteints de mélanome. Ces échantillons n'ont pas permis de démontrer que le niveau d'expression de l'IDO dans les APC présents au site de la biopsie est modulé à la baisse suite à un blocage du CTLA-4 (219). Cependant, le faible nombre d'échantillons disponibles pour cette étude ne permet pas de tirer des conclusions définitives quant à l'importance *in vivo* chez l'humain d'un tel mécanisme d'induction de l'IDO.

1.6.5 Expression de l'IDO dans le cancer et pronostic

Bien qu'il soit connu que le niveau sérique de tryptophane est significativement diminué chez les patients atteints de cancer (220), ce n'est qu'en 2003 qu'on a mis en évidence que des cellules exprimant l'IDO sont retrouvées dans la majorité des cas de cancer, après qu'une importante étude ait révélé l'expression de l'IDO dans des échantillons cliniques provenant de 25 types de cancers différents (183). Depuis, plusieurs études ont tenté d'établir une corrélation entre l'expression de l'IDO dans le tissu tumoral ou dans les ganglions lymphatiques drainant les tumeurs et différentes variables clinico-pathologiques des patients. Les observations découlant de ces études sont résumées dans le tableau 1.

Selon les études, une expression cytoplasmique élevée de l'IDO dans les cellules tumorales et parfois une expression par des cellules immunitaires infiltrant la tumeur ou le stroma est observée (211,221). De façon globale, la plupart des études présentées dans le tableau 1 concluent à une contribution de l'IDO à un pronostic moins favorable pour les patients dont la tumeur l'exprime fortement.

Type de cancer	Méthode d'analyse	IDO corrèle avec	Référence
Colorectal	IHC	↑ Métastases au foie ↓ CD3 infiltrant	(222)
	Tryptophane sérique	↑ Métastases au foie	(220)
Col de l'utérus	IHC	Caractère invasif des tumeurs	(202)
Endométrial	IHC et Western blot	Stade avancé métastases aux LN ↓ survie globale et sans progression	(223)
	IHC	↓ CD3, CD8, CD57 infiltrant ↓ survie sans progression	(224)
Hépatocellulaire	RT-PCR et IHC	↑ Survie sans progression ↑ IFN- γ ; TNF- α ; IL-1 β	(211)
	IHC	Présence de métastases ↓ Survie globale	(225)
Leucémie	RT-PCR et ICC	↑ fréquence des CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	(203)
Mammaire	IHC	LN métastatiques lorsque FoxP3 est co-exprimé	(226)
Mélanome	IHC	↓ Survie à long terme	(190)
Ovarien	IHC	Stade avancé ↓ CD8 infiltrant ↓ survie globale et sans progression	(185)
	Microarray et IHC	Résistance au paclitaxel ↓ survie globale	(227)
Pancréatique	IHC	Treg dans LN métastatique	(228)
Pulmonaire	IHC	↓ Survie	(221)
Rénal	RT-PCR quantitatif Western blot IHC	↓ De la prolifération des cellules tumorales	(229)

Légende: IHC, immunohistochimie; LN, ganglion lymphatique; ICC, immunocytochimie

Tableau 1. Paramètres cliniques corrélant avec une forte expression de l'IDO dans des cancers de différents types histologiques.

L'IDO provoque une diminution de certaines populations de cellules immunitaires dans certaines tumeurs

Les différentes populations de cellules immunitaires infiltrant les tumeurs ou les ganglions lymphatiques drainant les tumeurs peuvent être affectées par la présence de l'IDO. Dans le cancer colorectal, une forte expression de l'IDO a été associée avec une diminution du nombre de TIL CD3⁺ (222). De façon similaire, les lymphocytes T CD8⁺ sont retrouvés en plus faible nombre dans les cancers ovariens chez lesquels on décèle une forte expression de l'IDO (185). De plus, une réduction de l'infiltrat de lymphocytes T CD3⁺, CD8⁺ et de cellules NK CD57⁺ est liée à l'expression élevée de l'IDO dans le cancer endométrial (224). Vu l'importance de cet infiltrat immunitaire pour la réponse anti-tumorale, tel que décrit précédemment, de telles diminutions de certaines populations cellulaires suggèrent que l'expression de l'IDO par les tumeurs humaines favorise leur évvasion du système immunitaire.

Étonnamment, l'expression de l'IDO par les tumeurs et l'ampleur de l'infiltrat de lymphocytes T CD4⁺ n'ont jamais été directement évalués, malgré les effets nuisibles bien connus de l'IDO sur cette population cellulaire et en particulier le sous-type Th1. Une seule étude a rapporté une diminution significative des CD8⁺, mais aucune différence significative sur les lymphocytes T CD3⁺ totaux, ce qui laisse supposer que le nombre de lymphocytes T CD4⁺ infiltrant soit inchangé ou augmenté. Considérant l'absence d'un marqueur spécifique aux CD4⁺ dans cette étude, rien ne permet de conclure à un effet sur leur abondance. Il pourrait même être postulé que ces observations soient causées par une augmentation du nombre de Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, qui sont connus pour être favorisés par un environnement riche en IDO.

L'IDO entraîne une présence accrue de Treg

Une augmentation de la fréquence des Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ a été observée chez des patients atteints de leucémie myéloïde aigüe chez qui on retrouve une expression de l'IDO par les cellules cancéreuses (203). Par ailleurs, chez des patients atteints d'un adénocarcinome pancréatique, un nombre accru de Treg infiltrant les ganglions métastatiques a été observé en comparaison aux ganglions lymphatiques non métastatiques (228). De plus, ces mêmes ganglions métastatiques exprimaient tous l'IDO à différentes intensités. Il a ainsi été proposé que l'expression de l'IDO par les ganglions métastatiques des patients atteints d'un adénocarcinome canalaire pancréatique entraîne un recrutement des Treg. Cependant, il n'est pas clair si l'expression de l'IDO permet effectivement le recrutement de telles cellules ou plutôt la conversion de lymphocytes T CD4⁺ naïfs en Treg. À l'inverse, rien n'indique si la présence de ces cellules régulatrices soit en fait à l'origine de l'expression de l'IDO dans les ganglions métastatiques. Enfin, dans le cancer du sein, une expression simultanée de l'IDO et de Foxp3 dans les ganglions lymphatiques sentinelles a été mesurée chez plusieurs patients et a été corrélée avec la présence de métastases dans ces ganglions (226).

Agressivité des tumeurs

Différents facteurs reliés à l'agressivité des tumeurs ont été positivement corrélés avec une forte expression de l'IDO dans les tumeurs. D'une part, une fréquence significativement plus élevée de métastases au foie survient chez les patients atteints d'un carcinome colorectal lorsqu'une expression élevée de l'IDO est retrouvée dans la tumeur (222). La présence de métastases à distance corrèle aussi avec une forte expression de l'IDO dans le cancer hépatocellulaire (225). Des métastases aux ganglions lymphatiques drainant les tumeurs sont aussi retrouvées préférentiellement lorsque l'IDO est fortement présent dans les tumeurs des patientes atteintes d'un cancer endométrial (223). Pour cette même pathologie ainsi que pour le carcinome ovarien, un haut niveau d'expression de l'IDO a été détecté dans les tumeurs à stade avancé de la maladie (185,223). Enfin, une

expression de l'IDO est retrouvée dans la totalité des cancers micro-invasifs et invasifs du col de l'utérus, alors que l'enzyme est présente dans une proportion beaucoup plus faible de cancers non invasifs (202).

Influence sur la survie des patients

Dans la majorité des études menées sur l'expression de l'IDO dans le cancer chez l'humain, il a été déterminé que les patients présentant une forte expression de l'IDO ont une survie globale ou sans progression significativement diminuée (185,223-225,227).

Cependant, deux études font exception. D'une part, une amélioration de la survie sans récurrence a été associée avec l'expression de l'ARNm de l'IDO dans l'une des études réalisée avec des échantillons de carcinomes hépatocellulaires (211). D'autre part, les courbes de Kaplan-Meier résultant de la seule étude conduite sur des échantillons de carcinomes rénaux n'ont pas permis de démontrer de façon significative une différence dans la survie des patients dont la tumeur exprimait faiblement ou fortement l'IDO. Un fait par ailleurs intéressant à noter est que cette étude est la première et l'unique à avoir rapporté une expression de l'IDO presque exclusive aux microvaisseaux nouvellement formés dans la tumeur. Cette expression de l'IDO a d'ailleurs été inversement corrélée avec la densité de cellules tumorales positives pour le marqueur de prolifération Ki-67, laissant supposer une diminution de la prolifération des cellules tumorales en présence de cellules endothéliales vasculaires exprimant l'IDO (229). Les résultats de cette étude laissent croire que l'IDO pourrait agir au détriment de la tumeur lorsqu'une réponse anti-tumorale inefficace s'installe.

Les associations entre l'expression de l'IDO par les tumeurs ou les métastases et les différents paramètres cliniques suggèrent fortement que l'IDO pourrait contribuer à la progression tumorale. De plus, l'expression de l'IDO ayant été identifiée comme étant un facteur pronostique indépendant dans plusieurs types de cancers, cette molécule pourrait

éventuellement servir de marqueur permettant de classer les patients selon leur susceptibilité à rechuter et leur pronostic moins favorable. De plus, il pourrait permettre d'identifier les patients les plus susceptibles de bénéficier de traitements adjuvants en plus d'en prévenir l'usage superflu chez les patients qui n'en nécessiteraient pas.

1.6.6 Cibler l'IDO pour améliorer l'efficacité d'une réponse anti-tumorale

1.6.6.1 Justification

Considérant son expression répandue à une grande proportion des cas de cancer, l'IDO apparaît comme une cible intéressante au point de vue clinique. De plus, l'induction de son expression a été rapportée suite à des manipulations cliniques de l'immunité visant à générer une réponse anti-tumorale, et cette expression compromet ainsi l'efficacité de la réponse anti-tumorale. Ceci laisse supposer que certains vaccins anti-cancer pourraient avoir une efficacité accrue lorsque combinés à une inhibition de l'IDO. Chez la souris, cette hypothèse a été validée par un modèle de vaccin constitué de DC fusionnées à des cellules de carcinome du poumon. L'administration de ce vaccin à des souris porteuses d'un carcinome pulmonaire de Lewis induit l'expression de l'IDO dans la rate des souris, limitant la réponse anti-tumorale des CTL (230). Des éléments CpG, incorporés dans les vaccins à ADN afin d'en augmenter l'immunogénéité, ont aussi été rapportés pour induire l'expression de l'IDO principalement dans la rate et dans les ganglions lymphatiques drainant les tumeurs des souris (231,232). Dans des essais cliniques réalisés chez des patients atteints d'un mélanome, il a aussi été rapporté que la maturation *in vitro* des DC utilisées pour la vaccination induit l'expression de l'IDO chez celles-ci. De plus, des cellules exprimant l'IDO sont retrouvées dans les biopsies prélevées 24 heures suivant l'administration du vaccin, indiquant que les observations faites *in vitro* peuvent avoir une importance *in vivo*. Tous les patients inclus dans cette étude ont montré une rapide

progression de la maladie ainsi qu'une courte survie post-traitement (233), suggérant un manque d'efficacité du vaccin possiblement lié à l'activité de l'IDO.

1.6.6.2 Utilisation d'inhibiteurs pour bloquer l'activité de l'IDO

L'IDO est une enzyme ayant une large spécificité de substrats pour différents composés dont la structure contient un anneau pyrrole. De par cette caractéristique, l'activité de l'IDO peut se voir inhibée par des petites molécules ayant une structure analogue au tryptophane (Figure 9) et qui peuvent ainsi occuper le site actif de l'enzyme, sans toutefois entraîner une production de métabolites immunosuppresseurs ni une diminution de la disponibilité du tryptophane.

Le 1-méthyltryptophane

L'inhibiteur le plus fréquemment utilisé, tant *in vitro* qu'*in vivo*, pour bloquer l'activité de l'IDO est le 1-méthyltryptophane (1-MT). Il existe deux isomères de cette molécule, soit le D-1MT et le L-1MT, dont l'efficacité respective a longtemps été source de controverse. Selon le type cellulaire ou le modèle murin étudié, l'efficacité de l'un ou l'autre des isomères est prédominante (191), ce qui s'expliquait difficilement jusqu'à récemment. Les discordances quant à l'efficacité de l'un ou l'autre des isomères ont cependant été résolues par l'identification de l'IDO-2, une enzyme analogue à l'IDO. Suite à cette découverte, il a été mis en évidence que l'IDO-2 était la cible préférentielle du D-1MT (175), alors que l'IDO serait principalement inhibée par le L-1MT, isomère pour lequel il possède une affinité dix fois plus forte que pour le D-1MT.

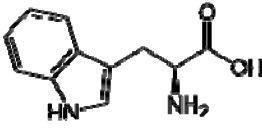
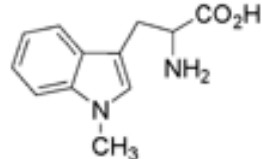
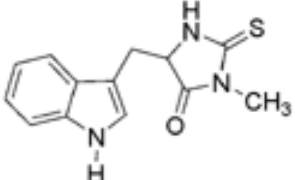
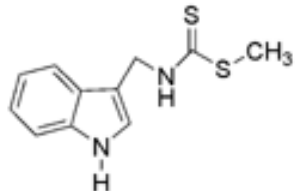
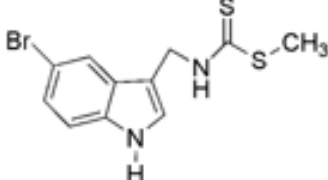
Composé	Structure
L-tryptophane	
1-Méthyl-Tryptophane	
MTH-Tryptophane	
Brassinine	
5-Bromo-Brassinine	

Figure 9 Structure moléculaire du tryptophane et de molécules analogues.
(Figure modifiée de (234))

Légende: Structure moléculaire du L-tryptophane ainsi que des molécules naturelles ou leur dérivé synthétique possédant une structure analogue composée d'un indole pouvant servir d'inhibiteur à l'enzyme IDO.

Les différentes études *in vivo* chez la souris ont démontré que lorsqu'utilisé comme seul agent thérapeutique, le 1-MT permet généralement de retarder l'apparition de tumeurs ou de limiter la croissance tumorale (182,183), mais n'entraîne pas la régression complète de tumeurs établies (235). L'absence de lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ du système immunitaire abolit l'effet anti-tumoral attribué au 1-MT, démontrant leur rôle central dans le mécanisme d'action de cet inhibiteur. Cependant, les effets du 1-MT apportent un bénéfice considérable à d'autres thérapies lorsqu'ils sont combinés, entre autre les effets anti-tumoraux d'agents chimiothérapeutiques. Spécifiquement, une combinaison du 1-MT avec la cyclophosphamide ou le paclitaxel augmente significativement la réponse anti-tumorale et la survie chez des souris porteuses de tumeurs établies (191,235). Les mécanismes moléculaires par lesquels l'inhibition de l'IDO contribue de façon bénéfique à l'efficacité de la chimiothérapie demeurent cependant inconnus. Le 1-MT a aussi fait l'objet de plusieurs essais en combinaison avec des traitements immuno-thérapeutiques. Dans un modèle murin de carcinome pulmonaire, l'administration combinée du 1-MT et d'un vaccin composé de cellules dendritiques fusionnées avec des cellules tumorales pulmonaires permet une réponse cytotoxique ainsi qu'une inhibition de la progression tumorale significativement plus élevée qu'avec l'administration du vaccin seul (230).

Des essais cliniques visant à déterminer l'efficacité anti-tumorale du D-1MT chez l'humain ont été amorcés à la fin de l'année 2007 et sont toujours en cours. L'utilisation de cet isomère chez l'humain est toutefois discutable bien qu'une certaine efficacité ait été démontrée chez la souris. En effet, le D-1MT qui cible l'IDO2 pourrait être inefficace chez environ 50% de la population puisque 2 polymorphismes affectent son activité enzymatique. L'un d'eux affecte le contact entre l'IDO2 et l'anneau indole du tryptophane, réduisant ainsi son activité enzymatique de 90%. L'autre polymorphisme génère un codon STOP prématuré qui abolit complètement l'activité de l'IDO2 (175). De récentes études ont permis d'établir que l'utilisation de l'isomère *levo* du 1MT serait préférable pour inhiber l'activité de l'IDO produite tant par les DC que par les cellules tumorales humaines. Il a aussi été récemment observé que l'IDO et l'IDO2 sont exprimées chez les DC dérivées des

monocytes matures humains, mais que seul l'IDO participe au catabolisme du tryptophane et que le L-1MT est l'unique isomère capable d'abolir cette activité (236). Des résultats similaires ont été obtenus avec différentes lignées cellulaires tumorales humaines ainsi qu'avec les cellules d'un carcinome primaire du côlon (237). Lors d'une étude réalisée sur les lymphocytes T provenant du sang, d'ascites ou de tumeurs de patientes atteintes d'un cancer épithélial de l'ovaire, il a été démontré que leur prolifération était inhibée par des cellules cancéreuses ovariennes exprimant l'IDO. Seul le L-1MT ou un mélange racémique de DL-1MT ont permis de rétablir la prolifération, alors que le D-1MT était inefficace (238). Il est probable que le D-1MT amène un certain bénéfice aux patients, mais ceci serait causé par des effets de l'inhibiteur non spécifiques à l'IDO.

Autres petites molécules inhibitrices

L'identification ou le développement d'inhibiteurs ayant une forte spécificité pour l'IDO et dont l'efficacité est supérieure au 1-MT est un champ de recherche en pleine effervescence. Différentes molécules ont été identifiées jusqu'à maintenant, mais des essais cliniques n'ont pas encore été entrepris.

De ces molécules, on retrouve le méthyl-thiohydantoin (MTH) tryptophane, dont la structure est analogue au tryptophane. Le MTH-tryptophane permet d'inhiber efficacement l'IDO, et *in vitro*, son potentiel inhibiteur est 20 fois supérieur à celui du 1-MT (235). De plus, cette molécule permet d'inhiber à la fois l'IDO et l'IDO2 (175), ce qui la soustrait à toute controverse en lien avec les isoformes inhibés.

La brassinine faisant parti de la famille des phytoalexines, une classe de produits naturels dérivée des plantes a aussi été identifiée comme inhibiteur potentiel de l'IDO. De plus, un dérivé synthétique de ce composé, soit la 5-bromo-brassinine possède de meilleures propriétés pharmacologiques puisque son niveau sérique est maintenu plus longtemps que son analogue naturel suite à son administration orale. Les propriétés anti-

cancéreuses de la 5-bromo-brassinine ont récemment été démontrées *in vivo* grâce au modèle murin *mouse mammary tumor virus* (MMTV)-*neu* qui développe spontanément des adénocarcinomes mammaires (234). Il a aussi été démontré que son action inhibitrice sur la progression tumorale passe par le blocage de l'IDO. De plus, lorsqu'administré en combinaison avec un agent chimiothérapeutique, la brassinine ou son dérivé synthétique la 5-bromo-brassinine permettent une régression tumorale plus prononcée qu'avec un traitement de chimiothérapie seul. De plus, la 5-bromo-brassinine utilisée comme simple agent freine de façon significative la progression tumorale d'un mélanome B16-F10 établi 7 jours avant le début du traitement. En considérant le fait que le 1-MT n'inhibe pas la croissance tumorale de façon significative lorsqu'il est utilisé comme seul traitement, la 5-bromo-brassinine pourrait constituer un inhibiteur de l'IDO ayant un potentiel clinique plus intéressant.

Quel que soit l'inhibiteur ayant la plus haute efficacité, son utilisation en clinique pourrait offrir des effets bénéfiques dépassant largement les effets néfastes, si l'on considère ce qui a pu être observé chez la souris. En effet, contrairement à d'autres thérapies visant à contrer certains mécanismes menant à l'évasion tumorale, l'inhibition pharmacologique ou génétique de l'IDO chez la souris n'entraîne pas d'auto-immunité préoccupante. Cependant, basé sur les résultats de différents modèles murins, l'usage mono-thérapeutique d'inhibiteurs de l'IDO en clinique pourrait améliorer la réponse anti-tumorale de façon peu efficace.

1.6.6.3 Immunothérapie dirigée contre l'IDO à l'aide de CTL

L'utilisation de l'IDO comme cible antigénique a également été proposée. Une étude a récemment identifié des CTL capables de reconnaître spécifiquement l'IDO dans le sang de patients atteints de mélanome, de carcinome mammaire ou de carcinome rénal (239). La présence de tels lymphocytes T n'a pas été retrouvée dans le sang de donneurs

sains. Cependant, certaines contraintes pourraient limiter l'efficacité de cette approche immunothérapeutique. D'une part, malgré le potentiel lytique *in vitro* des CTL spécifiques à l'IDO, l'activité enzymatique de l'IDO exprimée par les lignées cellulaires tumorales ciblées n'a pas été démontrée. Ainsi, *in vivo*, une telle immunothérapie dirigée contre des cellules IDO⁺ pourrait mener à une inhibition des fonctions des cellules T spécifiques à l'IDO lorsqu'elles rencontreraient leur cible. De plus, considérant le fait que les APC peuvent elles aussi exprimer l'IDO, elles seraient donc aussi susceptibles d'être lysées par les CTL spécifiques à l'IDO. Par conséquent, l'inhibition de l'activité de l'IDO chez ces cellules serait plus avantageuse pour qu'elles deviennent immuno-stimulatrices et qu'elles puissent ensuite aider la réponse anti-tumorale. Par ailleurs, les cellules normales IDO⁺ de l'organisme seraient aussi ciblées et lysées par une immunothérapie dirigée contre IDO, ce qui n'est pas souhaitable. Cette approche aurait cependant un avantage non négligeable. Advenant que suite au traitement émergent des variants tumoraux ayant perdu l'expression de l'antigène, soit l'IDO, les cellules tumorales ne seraient plus reconnues par les lymphocytes T spécifiques à l'IDO, mais la tolérance induite par l'IDO serait toutefois supprimée.

1.7 Objectifs du projet de doctorat

Plusieurs mécanismes contribuent à la non-réponse du système immunitaire face aux tumeurs, mais aussi à l'échec des essais cliniques d'immunothérapie anti-tumorale. Parmi ces mécanismes de contre-régulation, l'IDO joue un rôle important dans la progression tumorale puisque tel que démontré par des modèles murins, cette enzyme est exploitée par les tumeurs au détriment de la réponse immunitaire anti-tumorale. De plus, cette molécule immunosuppressive est retrouvée dans une grande proportion des cancers humains et sa présence dans les tumeurs est associée à un pronostic défavorable pour les patients. La régulation de l'expression de l'IDO a été étudiée dans plusieurs types cellulaires, mais principalement dans les DC. Cependant, plusieurs questions quant à la régulation de l'IDO chez l'humain, et particulièrement dans les cancers, restent à être élucidées.

Ce projet de doctorat vise de façon globale à caractériser cette molécule immunosuppressive en identifiant les facteurs impliqués dans la régulation de son expression dans les cellules tumorales humaines et dans les lymphocytes B. Précisément, les travaux présentés répondent à 3 objectifs correspondant chacun à un chapitre de cet ouvrage.

1) Compte tenu que l'expression de l'IDO est induite par des stimuli inflammatoires, nous avons posé l'hypothèse que l'induction de l'IDO dans les cellules tumorales dépend des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs. Le premier objectif fait donc le point sur la capacité des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs à induire l'expression de l'IDO dans les cellules tumorales. Il s'intéresse aussi à la caractérisation des facteurs dérivés de ces cellules immunitaires, spécifiquement les lymphocytes T activés, et impliqués dans la régulation de l'IDO. Cette étude revêt une importance quant à la planification des essais d'immunothérapie, puisqu'une vaccination visant à stimuler l'immunité pour provoquer une réponse anti-tumorale pourrait aussi mener à une expression de l'IDO dans les tumeurs.

2) Le deuxième objectif consiste à étudier les voies de signallement cellulaires qui régissent la régulation de l'expression de l'IDO dans les cellules tumorales en réponse aux lymphocytes T activés. Les travaux relatifs à cet objectif se concentrent particulièrement sur l'évaluation des effets engendrés par un agent chimiothérapeutique qui est à la fois un inhibiteur de la voie de STAT1, la fludarabine. La compréhension des effets de ce composé sur la régulation de l'IDO et sur le signallement impliqué dans cette régulation est d'un intérêt clinique, compte tenu de son utilisation dans le traitement de certains cancers et des bénéfices que procure la combinaison de la chimiothérapie avec un inhibiteur de l'IDO.

3) Enfin, le troisième objectif s'attarde à étudier l'expression et l'activité de l'IDO dans les lymphocytes B, une population cellulaire qui est retrouvée parmi les cellules immunitaires infiltrant les tumeurs. Tant chez l'humain que chez la souris, les DC expriment l'IDO lorsqu'ils sont mis en présence de lymphocytes T, et ces DC-IDO⁺ participent à la suppression de la réponse anti-tumorale *in vivo*. En plus de s'apparenter aux DC de par leur capacité à capter et à présenter les antigènes, les lymphocytes B interagissent étroitement avec les lymphocytes T CD4⁺ dans l'élaboration d'une réponse humorale. Nous croyons ainsi que la régulation négative de la réponse immunitaire engendrée par l'expression de l'IDO par les DC pourrait aussi être exploité par les lymphocytes B.

SECTION 2. MANUSCRIT 1

Human activated T lymphocytes modulateIDO expression in tumors through
Th1/Th2 balance

The Journal of Immunology, 2009 Dec 15; 183(12):7752-60

Jessica Godin-Ethier,* Sandy Pelletier,* Laïla-Aïcha Hanafi,* Philippe O. Gannon,* Marie-Andrée Forget,* Jean-Pierre Routy,[†] Mohamed-Rachid Boulassel,[†] Urszula Krzemien,* Simon Tanguay,[‡] Jean-Baptiste Lattouf,* Nathalie Arbour,* and Réjean Lapointe*¹

* Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) – Hôpital Notre-Dame, Université de Montréal and Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1

[†] Immunodeficiency Service and Division of Hematology, Royal Victoria Hospital, McGill University Health Centre, McGill University, Montréal, Quebec, Canada, H3A 1A1

[‡] McGill University Health Centre, Montréal General Hospital, Montréal, Quebec, Canada, H3G 1A4

¹ Corresponding author: Réjean Lapointe, Centre de recherche, CRCHUM – Hôpital Notre-Dame, Pavillon J.A. DeSève, Room Y-5605, 1560 Sherbrooke Street East, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1; Tel: (514) 890-8000 #25489 (off), 25504 (lab); Fax: (514) 412-7591.

Running title: IDO expression by tumors is regulated by T cells

Keywords: Human; Tumor immunity; T cells; Cytokines.

Non standard abbreviations used: tumor-infiltrating immune cells (TIIC); renal cell carcinoma (RCC); regulatory T cells (Treg); dendritic cell (DC); 1-methyl-tryptophan (1MT)

Contribution des auteurs

J. Godin-Ethier est responsable de la majorité de la réalisation des travaux de recherche et de la rédaction de cet article.

S. Pelletier, L.-A. Hanafi et M.-A. Forget ont apporté une contribution technique à l'étude.

M. R. Boulassel, J.-P. Routy, U. Krzemien, S. Tanguay et J.-B. Lattouf ont contribué à l'obtention des échantillons biologiques utilisés pour les travaux de recherche.

P. O. Gannon, et N. Arbour ont participé à la planification expérimentale.

R. Lapointe a supervisé l'ensemble de l'étude.

Abstract

Previous cancer vaccination approaches have shown some efficiency in generating measurable immune responses, but they have rarely led to tumor regression. It is therefore possible that tumors emerge with the capacity to downregulate immune counterparts, through the local production of immunosuppressive molecules, such as indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). While it is known that IDO exerts suppressive effects on T cell functions, the mechanisms of IDO regulation in tumor cells remain to be characterized. Here, we demonstrate that activated T cells can induce functional IDO expression in breast and kidney tumor cell lines, and that this is partly attributable to interferon-gamma (IFN- γ). Moreover, we found that interleukin (IL)-13, a Th2 cytokine, has a negative modulatory effect on IDO expression. Furthermore, we report IDO expression in the majority of breast and kidney carcinoma samples, with infiltration of activated Th1-polarized T cells in human tumors. These findings demonstrate complex control of immune activity within tumors. Future immune therapeutic interventions should thus include strategies to counteract these negative mechanisms.

Introduction

Immune cell infiltration is frequently observed in numerous types of tumors during both development and progression of cancer, including tumor antigen (TA)-specific T lymphocytes (240). These tumor-infiltrating immune cells (TIIC) have been linked to prognostic value in several cancer types, such as ovarian (19), colorectal (241), breast (242), hepatocellular (243), renal cell (244), and prostate (245) carcinomas. However, the functions of antigen-specific T lymphocytes appear to be negatively controlled, indicating that mechanisms of immune tolerance to human tumors are dominant in patients with progressive disease. Although successful immune vaccinations leading to increasing numbers of peripheral tumor-specific T lymphocytes (62,246-248) have been demonstrated, beneficial clinical responses are generally observed in a small proportion of patients (81). This suggests that tumors can negatively affect T lymphocyte anti-tumor activity. Therefore, tolerizing immune mechanisms not only impact the natural course of the disease, but also interfere with the eradication of tumors after vaccination.

TA-targeted immunotherapy is certainly effective from an immunological point of view. The actual challenges are to increase the proportion of clinical responders, improve the duration of the response, and extend immunotherapy to common and aggressive cancers, such as breast carcinoma and renal cell carcinoma (RCC). In the last few years, this has led to an intense search, for major mechanisms mediating immune tolerance controlled by tumors. Potential mechanisms are diverse and include the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) enzyme in the tumor environment (194,249).

IDO is a tryptophan-catabolizing enzyme with immunosuppressive effects on T cell functions. It has been described as a key molecule in protecting the fetus against the mother's T cell aggression (181). In murine models, IDO has been demonstrated to be an important mediator of tumor escape when expressed by tumor cells and antigen-presenting

cells (APC) found in tumor-draining lymph nodes (182,194). IDO mediates its immunosuppressive functions through the depletion of tryptophan from the microenvironment and the accumulation of toxic tryptophan metabolites (190,250). This culminates in the inhibition of T cell proliferation and functions, and in the induction of apoptosis (190,195,196,250-253). IDO has been detected in different cancer cell lines and in a variety of human primary tumors (183). Moreover, in ovarian, endometrial and colorectal carcinomas, IDO expression by tumor cells has been associated with poor prognosis (222,223,227). Some studies have linked IDO-expressing endometrial tumors with reduced lymphocyte infiltration (223,224). In human melanoma, the presence of IDO-expressing cells in tumor-draining lymph nodes correlates with decreased long-term survival (190).

However, factors regulating IDO expression in human tumor cells and the possible influence of T cells on IDO expression in tumor cells are currently unknown. In some normal cell types, IDO expression, which is known to be induced by both type I (α) and type II (γ) interferons (IFN), can also be modulated by the Th1/Th2 cytokine profile. Anti-inflammatory cytokines, such as transforming growth factor-beta (TGF- β), interleukin (IL)-4, and IL-13 have been shown to control IDO expression by antagonizing the IFN- γ effect in human fibroblasts and monocytes (214-216), whereas the opposite has been reported in eosinophils (254) and microglia (213). Th1 and Th2 cytokines were reported in human breast tumors, but the impacts of this cytokine cocktail on IDO expression in tumor cells are currently unknown. A better understanding of these interactions is crucial, considering that tumor-derived IDO can negatively control T cell-mediated specific responses and thus impair immune-mediated tumor destruction.

In this study, we first characterized TIIC from human breast and kidney carcinomas and found that tumor-associated T lymphocytes bore a Th1-activated phenotype. We then demonstrated that activated T lymphocytes induced IDO in human breast and kidney tumor

cell lines. This induction was partly mediated by IFN- γ secretion from T lymphocytes, but was negatively modulated by IL-13, a Th2 cytokine. These findings indicate that the Th1/Th2 balance provided by activated T lymphocytes may influence immuno-modulatory mechanisms in tumors, and thus could have a tremendous impact on immunotherapies aimed at fighting cancers. Our study constitutes the first analysis of IDO expression regulation by activated T cells, which needs to be better understood.

Materials and Methods

Patients and samples

This study was approved by the institutional Ethics Committee, and informed consent was obtained from each donor or patient before collection of the samples. Freshly-resected breast cancer specimens from 61 patients, who had undergone radical or partial mastectomy, were obtained from the FRSQ-CHUM breast cancer tissue bank of the FRSQ Cancer Network. RCC tissues were obtained after radical or partial nephrectomy, from 29 patients of the McGill University Health Center. Collected tissues were mechanically homogenized with a MedimachineTM (Dako Cytomation), and single-cell suspensions were centrifuged on a lymphocyte separation medium cushion (Wisent). THIC were recovered from the interface and stained for flow cytometry. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors recruited by the Division of Hematology and Immunodeficiency at the Royal Victoria Hospital and from cancer patients were isolated as described previously (255).

Flow cytometry

Conjugated monoclonal antibodies used: CD3-fluorescein isothiocyanate (FITC), CD3-AlexaFluor 700, CD4-Pacific Blue, CD8-allophycocyanine (APC)-Cy7, CD8-FITC, HLA-DR-PE, CD62L-APC, IFN- γ -APC, IL-4-PE, Perforin-FITC from BD Biosciences (Mississauga, ON, Canada), CD3-APC, CD4-FITC, CD8-PE, CD45RA-PE, CD45RO-APC, from Caltag and CCR7-PE from R&D Systems (Minneapolis, MN). Dead cells were excluded by staining with 7-AAD (BD Biosciences). For Th1/Th2 polarization and lytic granule content analysis, THIC and PBMC were thawed and incubated for 5 h with 20 ng/ml phorbol myristate acetate (Sigma-Aldrich), 1 μ g/ml ionomycin (Sigma-Aldrich) and 5 μ g/ml Brefeldin A (Sigma-Aldrich). Intracellular staining was performed as described

previously (255). Samples analysis was performed on Becton Dickinson FACS-Calibur or LSRII instruments.

Cells and reagents

All cell lines were obtained from the American Type Culture Collection. MDA-MB-231 and MCF-7 cells were cultured in RPMI 1640 complete medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin/100 µg/ml streptomycin and 10 µg/ml gentamicin (all from Wisent). KTCL and 786-0 cell lines were cultured in DMEM complete medium (Wisent), whereas MEME complete medium (Wisent) was used to cultivate the BT-20 cell line.

T lymphocytes were purified from PBMC by negative selection with EasySep human CD4 or CD8 cell enrichment kits (StemCell Technologies Inc.). Isolated T cell subset purity was between 90 and 98%.

Monocyte-derived dendritic cells (DC) were generated from PBMC of healthy donors (256), followed by 24 h stimulation with 500 ng/ml soluble trimeric CD40 ligand (CD40L, Immunex, Seattle, WA) and/or 10^3 U/ml IFN- γ (Pierce Endogen, Rockford, IL) and/or 5 µg/ml LPS (Sigma-Aldrich).

IL-13 was from Peprotech and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) from Pierce Endogen. Neutralizing anti-human IFN- γ and IL-13 antibodies were obtained from R&D Systems. The IDO inhibitor D-1-methyl-tryptophan (D-1MT) was purchased from Sigma-Aldrich. CFSE was obtained from Molecular Probes.

Co-culture assays

TIIC isolated from RCC patients or T cells isolated from healthy donor PBMC were incubated for 24 h on 5 µg/ml plate-bound anti-CD3 (clone OKT3, eBioscience) or isotypic control, at a concentration of 2×10^6 cells/ml in Iscove's modified Dulbecco's complete medium (Invitrogen) supplemented with 7.5% human serum (heat-inactivated, prepared from at least 3 normal donors). Unstimulated or activated T cells or TIIC were then cultured with MDA-MB-231 cells at a 2:1 ratio in "V"-bottom 96-well plates (Costar, Corning Life Sciences) for 24 h. Neutralizing antibodies were added to T cells 20 min before co-culture. Supernatants were harvested after 24-h incubation, and human IFN-γ was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with 0.4 µg/ml anti-IFN-γ monoclonal antibody and 0.2 µg/ml biotinylated anti-IFN-γ antibody (Pierce Endogen) (255). Cells were collected for RNA or protein extraction.

RT-PCR

RNA from co-cultures was prepared with RNeasy™ mini or micro kits (Qiagen) from breast and kidney specimens (257) and cDNA was synthesized from 500 ng mRNA (255). Sequences of the PCR primers spanning distinct exons were: β-actin (5': AAGCCAACCGCGAGAAGATGAC; 3': TAATGTCACGCACGATTTCCCG, amplicon 300-bp), 18S ribosomal subunit (5': ATCAACTTTCGATGGTAGTCG; 3': TCCTTGGATGTGGTAGCCG, amplicon 111-bp) and IDO (5': CGCTGTTGGAAATAGCTTCTTGC; 3': CTCCCAGAACCCTTCATACACC, amplicon 167-bp). Classical RT-PCR amplification was undertaken with HotStartTaq DNA Polymerase (Qiagen). Cycling conditions were 15 min at 95°C, 24 (β-actin) or 32 (IDO) cycles of 45 s at 94°C, 45 s at 55°C, and 1 min at 72°C, then 10 min at 72°C, in a T3 Thermocycler™ system (Biometra, Goettingen, Germany).

Quantitative realtime RT-PCR, amplifications were performed with 0.5 μM of each IDO or 18S primer, 10 μl of 2X SYBR Green mix (Qiagen), 4 μl of cDNA (1:20 dilution) and water (257). The cycling conditions were 10 min at 95°C, then 35 cycles of 30 s at 94°C, 45 s at 60°C, 30 s at 72°C for 18S or 40 cycles of 30 s at 94°C, 60 s at 55°C, 30 s at 72°C for IDO, and a melting curve from 72 to 95°C. IDO expression was established relative to the housekeeping gene 18S, according to Pfaffl's method (258).

Western blotting

Protein extracts from the above-mentioned pelleted cell lines were prepared, quantified, resolved by 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (257). Membranes were incubated with specific antibodies for β -actin (257) and IDO (sheep polyclonal anti-human IDO antibody 1:100 from Hycult Biotechnology, Uden, The Netherlands, and 1 h with a secondary peroxidase-conjugated rabbit anti-sheep 1: 5 x 10⁴ from Chemicon). Proteins were detected as described previously (257).

Functional assessment of IDO impact

To evaluate the enzymatic activity of IDO, effects of conditioned media from tumor/IDO⁺ or tumor/IDO⁻ on T cell functions were evaluated. Briefly, supernatants from activated T cells were prepared from enriched CD8⁺ T cells, stimulated for 24 h with anti-CD3 or an isotype-matched control. To induce IDO expression in tumor cells, the KTCL cell line was incubated for 24 h in activated T cell supernatant. To prepare IDO conditioned medium, the supernatant was replaced by fresh medium in which 250 μM D-1MT was added or not to confirm IDO specific activity. To assess effects on T lymphocytes, CFSE-labeled CD4⁺ responder T cells were activated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ plate-bound anti-CD3 and 300 U/ml IL-2 (Peprotech) and cultured in tumor/IDO⁺ or /IDO⁻ conditioned medium for 5 days. Cells were harvested, and CFSE dilution was assessed by flow cytometry.

Statistical analyses

Group comparisons for flow cytometry data were analyzed by Tukey's parametric multiple comparison test. Normal distribution and homogeneity of variance for these values were satisfied. To compare experimental groups to controls in the IDO conditioned medium experiment, the non-parametric Mann-Whitney U test was used. Statistically significant differences were determined as P values less than 0.05. Statistics were performed with SPSS 13.0 software for Windows (LEAD Technologies).

Results

Infiltration of activated immune cells in tumors

To determine whether infiltrating immune cells in human breast carcinomas and RCC display an activated or resting/anergic state, we undertook an extensive phenotyping assessment of their activation status. Expression of several surface markers on TIIC and PBMC from cancer patients were compared by flow cytometry. A representative flow cytometric profile is provided (supplemental Figure 1^{m1}). The infiltrates comprised a diversity of immune cells, and the most abundant cells present in TIIC were T cells (56.9% in breast vs. 53.4% in RCC) (Figure 1^{m1}A, top). Among the CD3⁺ T cell subset, we observed significantly increased expression of the activation marker HLA-DR, in both breast carcinoma (p=0.001) and RCC (p<0.001) TIIC in comparison to PBMC (Figure 1^{m1}A, bottom). Tumor infiltrating T cells had a memory phenotype when considering the significantly higher CD4⁺CD45RO⁺/CD4⁺CD45RA⁺ ratio in TIIC than in PBMC (45.3±39.0% and 6.6±11.5%, p=0.006 for breast carcinoma vs. 39.9±52.4% and 1.1±0.9%, p=0.001 for RCC; Figure 1^{m1}B, top). These data were also supported by a decreased proportion of CD4⁺CCR7⁺CD62L⁺ in TIIC from breast cancer vs. PBMC from the same donors (p=0.021; Figure 1^{m1}C, top). A similar profile was noted among CD8⁺ T cells (Figure 1^{m1}B and 1^{m1}C, bottom). Taken together, these data strongly suggest that tumor-infiltrating T lymphocytes have an activated phenotype: HLA-DR⁺, CD45RO⁺, CCR7⁻, CD62L⁻.

Th1-polarized T cells infiltrate RCC

To dissect the nature of tumor-infiltrating T cells, we selected one prototypic Th1 cytokine (IFN- γ), one prototypic Th2 cytokine (IL-4) and one lytic enzyme (perforin) to evaluate the effector functions of kidney TIIC. Intracellular flow cytometric analysis

revealed a significantly higher percentage of IFN- γ -secreting CD4⁺ T cells in TIIC (53.0%) than in PBMC (19.3%) from RCC patients (Figure 2^{m1}A, left). However, the percentage of IL-4⁺/CD4⁺ T cells was similarly low in each group (Figure 2^{m1}A, right). Moreover, IFN- γ -secreting CD8⁺ T cells were in significantly higher proportion in TIIC and PBMC from cancer patients compared to healthy donor PBMC (Figure 2^{m1}B, left). Interestingly, we found a significantly higher number of perforin-producing CD8⁺ T cells in PBMC from RCC patients than from healthy donors (Figure 2^{m1}B, right). Altogether, these data show that T cells infiltrating kidney tumors display an IFN- γ /Th1 profile. However, it is still unresolved how tumor cells respond to such cytokines from activated T cells present in the tumor environment.

Immune cells prepared from RCC induce IDO expression in human renal carcinoma cells

To evaluate the effects of these TIIC on tumor cells upon interaction, *in vitro* experiments have been performed co-culturing RCC TIIC with human renal carcinoma cells in order to evaluate the expression of immunosuppressive genes. Given the increased proportion of IFN- γ -expressing T cells that we detected in TIIC, and that IDO is an IFN- γ inducible gene, we sought to determine whether TIIC isolated from renal cell carcinomas could lead to IDO expression in tumor cells. These experiments revealed the induction of IDO in tumor cells after co-culture with TIIC from 3 donors pre-treated with isotype control (Figure 3^{m1}, top panel; RCC53, RCC70, and RCC75). This induction was specific to the tumor environment since PBMC did not induce similar levels of IDO expression. As expected, TIIC as well as PBMC from RCC53 and RCC70 cancer patients activated with anti-CD3 induced IDO expression in the tumor cell line (Figure 3^{m1}, bottom panel), whereas TIIC from donor RCC75 failed to induce similar levels of IDO expression, after activation with anti-CD3.

In summary, this experiment illustrates that TIIC prepared from different RCC patients had the capacity to upregulate IDO.

Activated T lymphocytes induce IDO expression in human tumor cells

Although parameters measured from freshly-resected tumors provided crucial information, TIIC extraction rarely leads to sufficient amount of cells to study the effects of TIIC interaction with tumor cells. Because we wanted to further investigate tumor cell responses to human activated T cells, we pursued our study with *in vitro* experiments using human activated T lymphocytes similar to lymphocytes found in human tumors to evaluate the expression of immunosuppressive genes. In our experimental system, we detected IDO mRNA in MDA-MB-231 co-cultured with activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and also at a lower level with unstimulated CD8⁺ T cells (Figure 4^{m1}A). Surprisingly, IFN- γ levels in supernatants from activated CD8⁺ T cell and MDA-MB-231 co-cultures were low in comparison to levels obtained from CD4⁺-activated T cells (Figure 4^{m1}A), suggesting that IFN- γ is not the only molecule produced by activated T cells responsible for IDO induction. These data supports other findings in this paper shown in figure 7^{m1}B.

To evaluate whether our model was representative of what can be encountered in breast and kidney cancers, we next investigated IDO induction in different breast and kidney cancer cell lines. We found IDO in all cell lines after co-culture with activated CD8⁺ T cells. IDO mRNA was also detected in both kidney cancer cell lines when co-cultured with non-activated CD8⁺ T cells (Figure 4^{m1}B). IDO transcription was induced in response to rhIFN- γ in all cell lines evaluated, whereas no mRNA was revealed without T cells or with anti-CD3 alone (Supplemental Figure 2^{m1}). To determine whether tumor cells expressed other immunosuppressive genes in response to activated T cells, we analyzed the expression of arginase 2 (Arg2), cyclooxygenase-2 (COX-2) and prostaglandin E synthase

(PGES). None of the tested genes had an expression pattern similar to that of IDO (Figure 4^{m1}B).

We also confirmed IDO protein expression in co-cultures of activated CD4⁺ T cells with MDA-MB-231, KTCL or 786-0 (Figure 4^{m1}C). Though IDO transcript could be detected from all the cell lines tested (Figure 4^{m1}B), protein was mostly found in MDA-MB-231 and KTCL, suggesting differential regulation at the translational level. As expected, IDO protein expression was positively controlled in stimulated monocyte-derived DC (259), and in DC co-cultured with activated T cells (Figure 4^{m1}C). Finally, the colon carcinoma cell line HCT-116 acted as a negative control of IDO expression, as reported (259).

Altogether, these data demonstrate that both activated CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes upregulated IDO mRNA and protein expression in breast and kidney cancer cell lines.

IDO expressed by human cancer cells inhibits T cell functions

To assess IDO functional activity, we then evaluated the consequences of IDO-expressing tumor cells on T cell functions. Activated CD4⁺ T cells were cultured in conditioned medium from IDO-expressing KTCL cells. Proliferation and IFN- γ production were then examined. When cultured in tumor/IDO⁺-conditioned medium, activated T cell proliferation was decreased by 33.3% compared to T cells cultured in control medium ($p=0.04$), as indicated by the CFSE dilution (Figure 5^{m1}B). Importantly, T cell proliferation was rescued to the control level by adding the IDO inhibitor 1MT ($p<0.05$), therefore illustrating a direct role of IDO in the reduced T cell proliferation (Figure 5^{m1}A). Similar results were obtained for IFN- γ secretion (data not shown). Thus, enzymatically-active IDO

protein detected in tumor cell lines in response to activated T cells exerted an inhibitory effect on T cell functions.

IDO expression in breast and kidney cancers

Considering the Th1-polarized nature of tumor-infiltrating activated T cells (Figure 2^{m1}) and IDO upregulation in cancer cell lines in response to activated T lymphocytes, we next wanted to confirm whether IDO was detected in a substantial proportion of human breast and kidney cancer clinical samples. We evaluated IDO expression in cancer samples and normal tissues, by quantitative real time RT-PCR. IDO mRNA was detected in several normal tissues (Figure 6^{m1}A), including breast and kidney. IDO expression in breast cancer samples was normalized to one representative normal breast sample. Almost half (27/57) of the breast cancer samples expressed twice the IDO level found in the normal reference breast sample (Figure 6^{m1}B). Furthermore, 24 RCC clinical samples were analyzed. The IDO mRNA level was two-fold higher in 75% of these samples than in an untreated kidney cancer cell line (Figure 6C^{m1}). No correlation was found between IDO mRNA expression and the patients' clinico-pathological parameters for breast carcinoma samples. Among RCC samples, IDO expression correlated with the clear cell histological type, since clear cell constituted 89% (16/18) of IDO-positive samples (Spearman correlation coefficient= 0.766, $p < 0.001$). All of the 6 IDO-negative clinical samples were not clear cell RCC, for instance, they were either papillary, chromophobe or carcinoid. These data indicate that IDO is present in a high proportion of cancer samples. As such, we must better understand the mechanisms by which activated T lymphocytes modulate IDO expression in tumor cells, and the potential involvement of IFN- γ , which was previously shown to be an important IDO-inducer.

Activated T cells provide both positive and negative signals for IDO expression in cancer cells

To understand the relative importance of IFN- γ in the induction of IDO in tumors from the interaction with activated T cells, we assessed IDO expression while blocking IFN- γ with a neutralizing antibody. When stimulated with 100 U/ml of exogenous recombinant IFN- γ (corresponding to 4 ng/ml), IDO expression by MDA-MB-231 was completely abolished by anti-IFN- γ (Figure 7^{m1}A), thus determining the threshold of the blocking antibody. In contrast, IDO expression was only partly inhibited by the same amount of anti-IFN- γ in MDA-MB-231 co-cultured with activated CD4⁺ T cells secreting a measured level of 500 pg/ml IFN- γ (Figure 7^{m1}B). Similar results were obtained with CD8⁺ T cells (data not shown in original article, see figure in annex 1). We thus suspected that other factors may be implicated in the regulation of IDO expression in tumor cells.

To explore whether IDO induction was dependent on cell-cell contact or solely on soluble factors, we incubated the MDA-MB-231 cell line in activated T cell supernatant, or with activated T cells separated by a tissue culture insert. These results revealed that IDO induction in tumor cells in response to activated T cells was cell-contact independent (Supplemental Figure 3^{m1}).

To identify soluble factors modulating IDO expression, we performed a cytokine array on supernatant from activated CD4⁺ T cells vs. control CD4⁺ T cells. We observed an upregulation of IL-13 and GM-CSF secretion by activated T cells (Supplemental Figure 4^{m1}). We evaluated their impact on IDO modulation by treating the MDA-MB-231 cell line with IFN- γ alone or in combination with these cytokines. The results revealed that neither IL-13 nor GM-CSF alone was able to induce IDO in MDA-MB-231 (Figure 7^{m1}C). However, when stimulated with exogenous IFN- γ , decreases of 58% and 84% in IDO relative expression were observed with the addition of IL-13 (at 10 and 50 U/ml,

respectively). A 57% decrease of IFN- γ -induced IDO expression was also seen with GM-CSF (100 U/ml) (Figure 7^{m1}C). Although IL-4 shares a common receptor with IL-13, no difference in IFN- γ -dependent IDO mRNA levels was observed in response to IL-4 (data not shown).

To further establish the role of IL-13 in modulating IDO expression in cancer cells from activated T cells, we used an IL-13 blocking antibody. Our results demonstrate that the IL-13-blocking antibody increased IDO mRNA expression (Figure 7^{m1}D). We thus confirmed the inhibitory action of IL-13 on IDO expression by the MDA-MB-231 breast cancer cell line. Taken together, these results indicate that cytokines (GM-CSF and IL-13) produced by activated T cell can attenuate IFN- γ -mediated IDO expression induced in human tumor cells. Thus, IDO expression appears to be regulated by a complex balance of Th1/Th2 cytokines secreted by activated T cells.

Discussion

The inability of tumor-infiltrating lymphocytes to control tumor progression highlights the importance of understanding factors emerging from tumors, which negatively control the anti-tumoral response. IDO, an important immunosuppressive molecule, has been identified as one of the mechanisms leading to immune response down-regulation. Indeed, the negative feedback provided by IDO expression in DC after contact with activated T cells (260) is a necessary immune regulatory mechanism of T cell deactivation. It is now clear that this control mechanism can also emerge in tumor cells, leading to the inhibition of the T cell response and proliferation. Such an active process of tolerance induction in the tumor microenvironment has an obvious negative impact on immune functions, and potentially on the effectiveness of clinical manipulation of the anti-tumor response by immunotherapeutic approaches. Inhibiting IDO or the factors controlling its expression may increase the efficacy of immune-based cancer therapy. However, such factors are not well-characterized in human cancer. This study is the first report on the mechanisms of IDO regulation in tumor cells in response to activated T cells in human cancer.

We first examined the phenotype of immune cells infiltrating breast cancer and RCC, and observed memory T cells expressing the surface marker CD45RO. These T cells also had an activated phenotype, which was illustrated by their high expression of HLA-DR. These results are in line with previous reports on the activation marker HLA-DR from the surface of breast carcinoma (261) and RCC (262) TIIC. Moreover, the memory profile among T cells from TIIC is consistent with the intense CD45RO expression seen by Cózar and colleagues (263) in RCC. Considering the phenotypically-activated T cells present in the tumor microenvironment, inhibitory mechanisms must be responsible for their impaired functions.

From the ineffectiveness of the anti-tumor response and the activated state of TH1C from RCC samples that we analyzed by flow cytometry, we hypothesized that activated T cells could induce immunosuppressive genes expression by tumor cells. Of the different suppressive genes we tested, we found that only the expression of IDO was induced in tumor cell lines in response to activated T cells in our experimental model. The protein expression of IDO was confirmed in a subset of cell lines, and we also corroborated IDO-negative biological effects on T lymphocyte functions. In their study, Brandacher and colleagues (222) noted that high IDO expression in colorectal cancer correlated with a decrease in CD3⁺-infiltrating T cells. To explain this observation, they proposed that IDO expression in human tumors could result from IFN- γ produced by host immune cells after the recognition of early-stage tumor cells, which could lead to tryptophan starvation and inhibition of T cell proliferation and functions in the tumor environment. We thus consider that our study supports their hypothesis, the role of IFN- γ in this process needing to be determined.

We expected IFN- γ to play a major role in the expression of IDO by cancer cell lines in response to activated T cells. Using a neutralizing antibody, we demonstrated IFN- γ 's importance for IDO induction in our co-cultures. However, our data suggest the presence of one or multiple factors, other than IFN- γ , produced by activated T cells and which could contribute to IDO induction in tumor cells. These factors have not been identified and are currently under investigation, but we speculate that type I IFNs could be involved in this process.

We did identify two factors, GM-CSF and IL-13, which negatively control IFN- γ -induced IDO expression. Strikingly, even if the Th2 cytokine IL-13 was found to downregulate IDO, we did not observed any regulatory functions for IL-4 on IDO expression. The different roles of IL-4 and IL-13 may reflect the involvement of different pathways in the signaling events leading to IDO expression (264). The effects of IL-13 on

IDO expression correlated with the antagonizing effect of Th2 cytokines on IFN- γ that has been noted in other cell types, such as fibroblasts and monocytes. Moreover, in a recent study, IL-13 has been detected in breast tumor clinical samples (265,266). Aspod et *al.* (265) also demonstrated that CD4⁺ T cells infiltrating breast tumors produce IFN- γ as well as IL-4 and IL-13. Obviously, IDO expression in tumors is modulated by several factors from activated T lymphocytes, which need to be identified.

While T helper cells have been shown to play a major role in anti-tumor immunity, both in mice and humans, the nature of this Th response is of major importance. In murine cancer models, it has been established that predominant Th1 responses are associated with tumor resistance, whereas Th2 or Th1/Th2 mixed responses correlate with tumor progression (267). However, such correlation has not been strongly shown in humans. Th1 infiltration frequently correlates with better prognostic value (18). Also, Th1 responses are linked to a stronger anti-tumor immunity but without being associated with tumor regression. Failure of Th1 responses to wane tumors might be explained by different immunosuppressive mechanisms, such as IDO, which could block effector functions of T cells. Our results suggest that Th2 cytokines down-regulate IDO expression in cancer cells. This does not support evidences suggesting that Th1 responses are more capable to generate an effective anti-tumor immune response. Since IDO is thought to preferentially induce Th1 cell apoptosis (254), its expression in tumor cells could subvert the immune response toward a Th2 profile. We thus think that a Th1 anti-tumor response with the concomitant inhibition of IDO expression or activity to overcome immunosuppression, would still be the most appropriate strategy to eradicate tumors, rather than using Th2 polarizing anti-tumor immunizations.

We analyzed IDO mRNA in breast carcinoma and RCC clinical samples and found a high expression in a large proportion of tumor specimens. However, since IDO expression was measured from bulk tumor specimens, we cannot exclude the possibility

that part of the IDO in our breast and kidney cancer clinical samples originated from infiltrating immune cells. Though the analysis of RCC samples revealed a positive correlation between IDO expression and clear cell histological type, we could not correlate IDO mRNA expression in breast cancer specimens with clinical parameters. In other studies, IDO expression was correlated with a poor clinical outcome in different human cancers, such as melanoma (190), endometrial (223), colorectal (222) and ovarian (227) cancers. Our inability to link IDO to clinico-pathological parameters could be attributed to the bias introduced in our tissue bank toward high grade and large tumor size.

Our data show that activated T cells can induce IDO expression in tumor cells and negatively impact the immune response. In melanoma, it has been demonstrated that IDO can affect DC-based vaccines since IDO-positive cells were detected by immunohistochemistry in tumor biopsies 24 h after the administration of a DC-based vaccine (233). Furthermore, IDO expression led to increased expression of FoxP3, and thus possibly Treg cells (233). The complementarities between these two immunosuppressive mechanisms have been demonstrated recently by Munn and colleagues (207,218) as they showed that IDO-expressing plasmacytoid DC can activate resting Treg in mice. Inversely, Treg can induce IDO expression in DC after CTLA-4 ligation (207,218). IDO is certainly not the sole immunosuppressive factor facilitating tumor escape from the immune system, but these evidences indicate that immunosuppressive mechanisms could be closely related. Considering that immunotherapy leading to accumulation of activated specific T cells at tumor sites could result in IDO-induced tolerance, its clinical relevance is obvious, and this should be considered in the development of vaccination strategies.

In conclusion, although the immunosuppressive role of IDO is already established, it is still unclear to what extent host IDO-expressing APC or tumor cells contribute to the induction of tolerance in cancer. IDO⁺ DC may exert their immunoregulatory effects, not only at the tumor site but also in lymph nodes, where APC prime specific T cells (268).

This could explain the powerful effects of IDO in downregulating the immune response against tumors. The present study demonstrates for the first time that human activated T cells can positively and negatively modulate IDO expression in tumor cell lines through Th1 and Th2 cytokine secretion. Furthermore, these IDO-positive tumor cells can impair T cell responses. This mechanism of IDO induction provides new evidence as to the complexity and vast potency of this immunosuppressive molecule in human cancer. Our study also gives clear evidence that the Th1/Th2 cytokine balance provided to the tumor is an important aspect to consider in future immunotherapies.

Acknowledgements

Breast cancer samples were obtained from the Breast Cancer Bank of the CHUM, a component of the FRSQ Cancer Network. We thank Diane Beauseigle for technical support. The text editing of Ovid Da Silva, Research Support Office, CRCHUM, is acknowledged. This work was supported by grants from the Cancer Research Society (CRS) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). Financial support: R.L. and J.P.R. are recipients of Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) scholarships. N.A. holds a Donald Paty Career Development Award from the Multiple Sclerosis Society of Canada and a Chercheur-Boursier from the FRSQ.

Figures

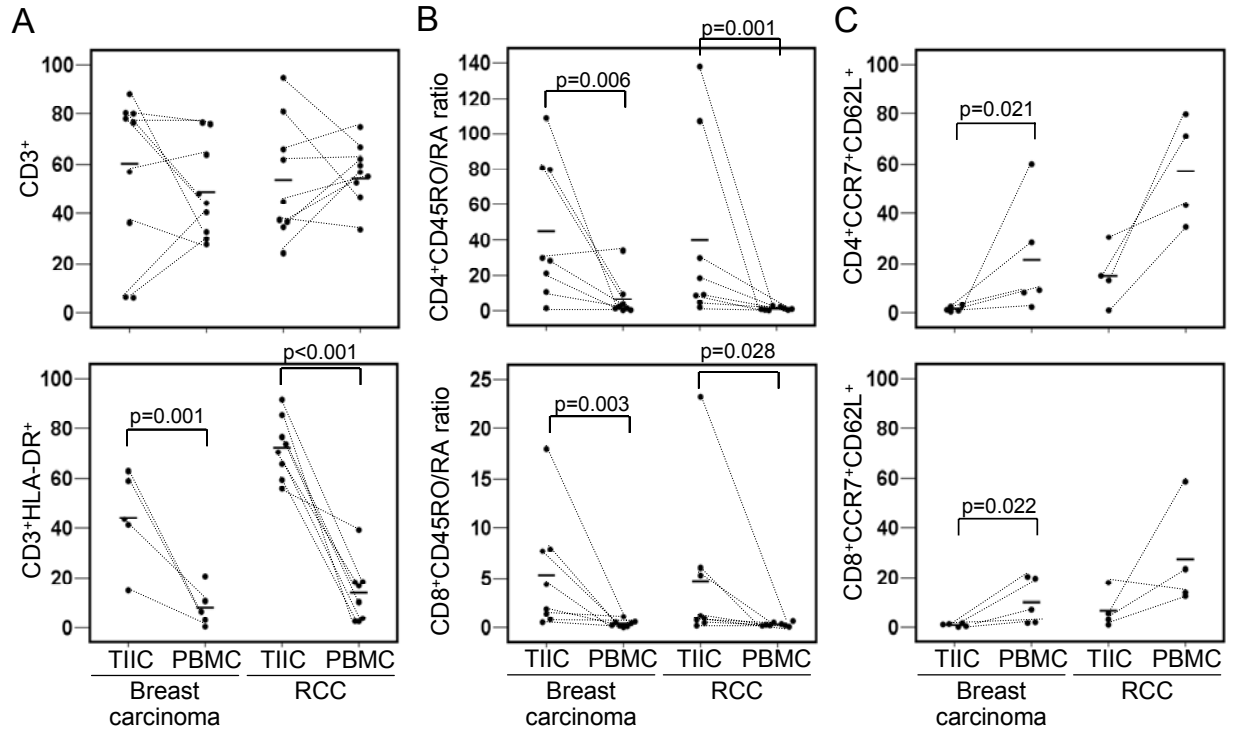


Figure 1^{m1} Infiltration of activated T lymphocytes in breast and kidney tumors.

Single-cell suspensions obtained from tumor tissues and peripheral blood of breast and kidney cancer patients were incubated with antibodies specific to various lymphocyte markers to evaluate the proportion of (A) CD3⁺ and CD3⁺HLA-DR⁺, (C) CD4⁺CCR7⁺CD62L⁺ and CD8⁺CCR7⁺CD62L⁺ cells, or (B) CD4⁺CD45RO/RA and CD8⁺CD45RO/RA ratios. Analyses were gated on the lymphocytic population and dead cells were excluded by 7-AAD staining. Dotted lines link samples from the same patient and the mean is represented by a bar.

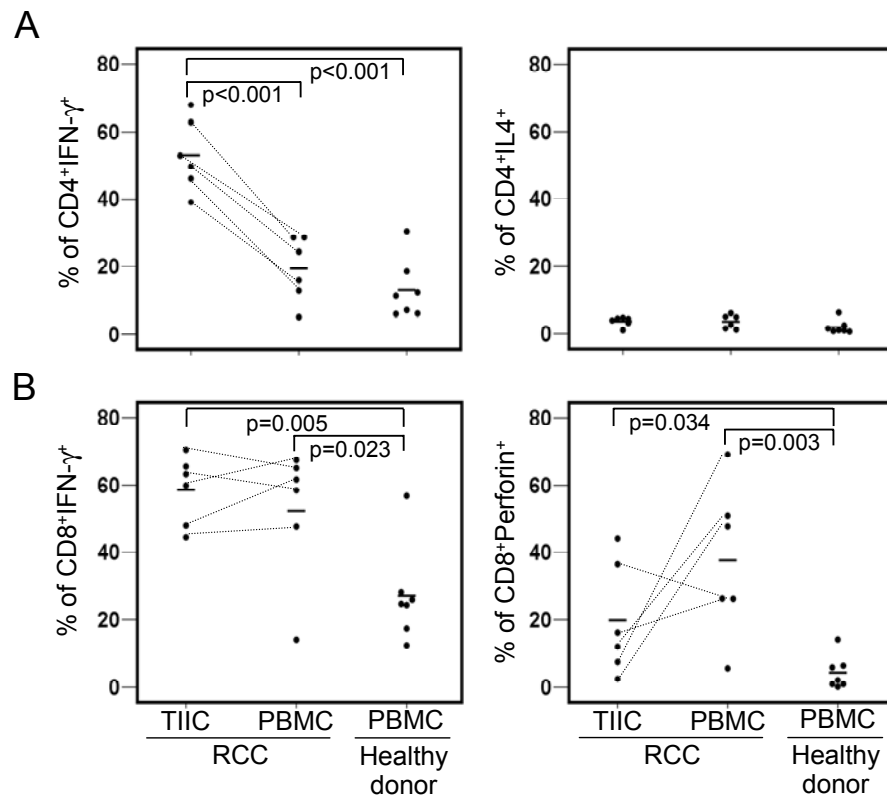


Figure 2^{m1} Th1-polarized T cells infiltrate kidney cancers.

TIIC and PBMC from kidney cancer patients and PBMC from healthy donors were stained for flow cytometry, and percentages of (A) IFN- γ - or IL-4-producing cells among CD3⁺CD4⁺ T cells and (B) IFN- γ or perforin CD3⁺CD8⁺ T cells are represented by dots (●). The mean value for each group is indicated by a bar (-). TIIC and PBMC from the same patients are linked by dotted lines.

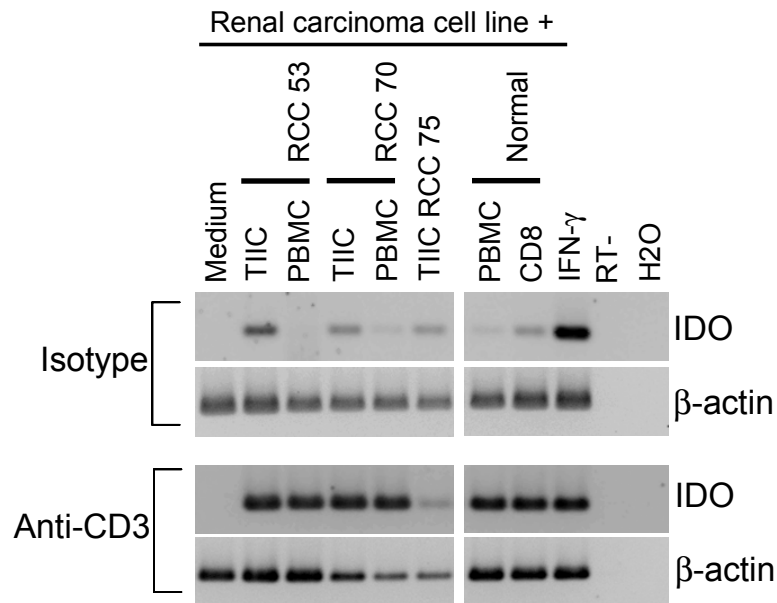
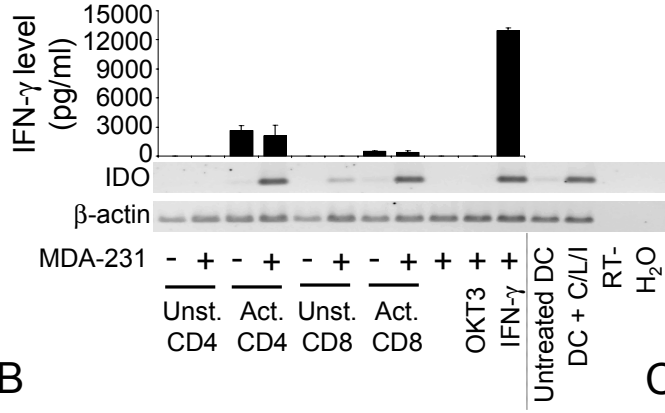


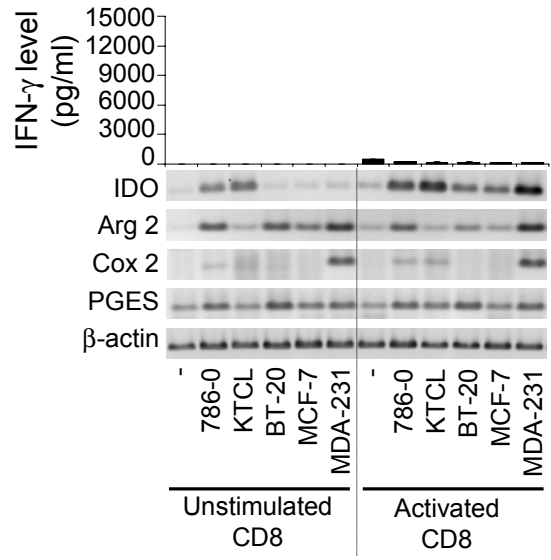
Figure 3^{m1} Immune cells prepared from RCC induce IDO expression in renal carcinoma cell line.

TIIC and PBMC from kidney cancer patients and PBMC from an healthy donor were stimulated with plate bound anti-CD3 or isotype-matched control for 24 h, and co-cultured with the renal carcinoma cell line KTCL for 24 h. IDO and β -actin mRNA expression was determined by RT-PCR

A



B



C

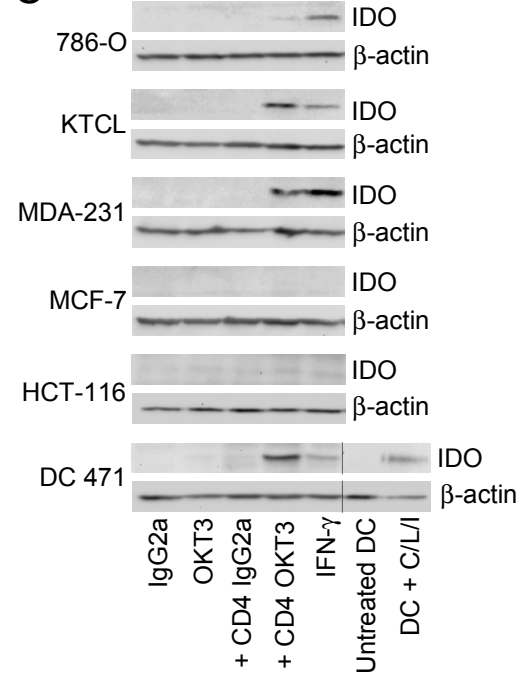
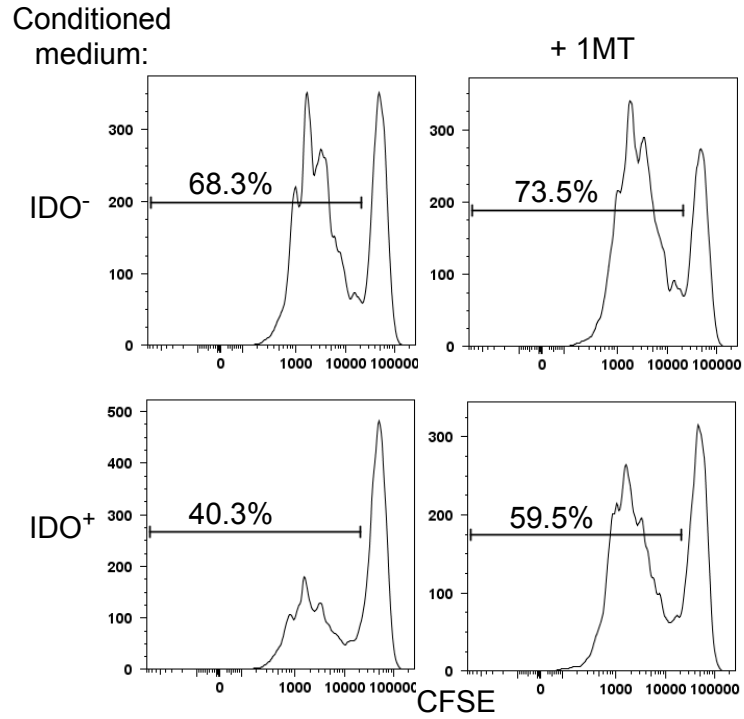


Figure 4^{m1} Activated T cells induce IDO expression in human breast and kidney cancer cell lines.

(A-C) CD4⁺ and/or CD8⁺ T cells isolated from healthy donor PBMC were stimulated or not with plate-bound anti-CD3 for 24 h, and co-cultured with kidney or breast cancer cell lines for 24 h. (A-B) Immunosuppressive genes (IDO, Arg2, COX-2, PGES) and β -actin mRNA expression was evaluated by RT-PCR and IFN- γ levels in co-culture supernatants were determined by ELISA. MDA-MB-231 cells stimulated with plate-bound anti-CD3 or IFN- γ were used as negative and positive controls for IDO expression. (C) IDO protein expression was evaluated by Western blotting. DC and HCT-116 were respectively positive and negative controls for IDO expression. Legend: C/L/I; CD40L/LPS/IFN- γ .

A



B

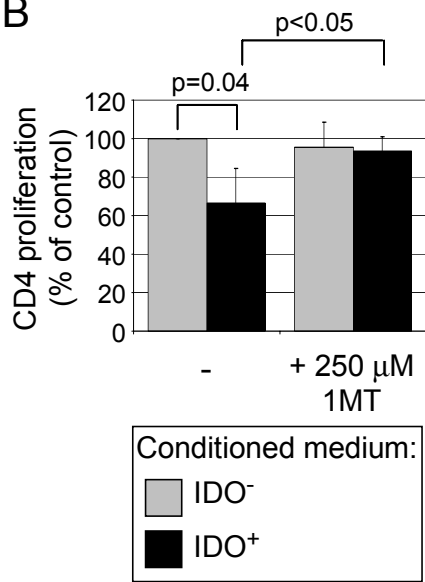


Figure 5^{m1} IDO-expressing tumor cells decrease T cell functions.

OKT3 or isotype control activated CD8⁺ T cell supernatants were used to induce IDO expression in the KTCL cell line. Conditioned medium was obtained from IDO⁺ or IDO⁻ KTCL cells cultured 24 h in fresh medium with or without 250 μ M D-1MT. Proliferation from OKT3/IL-2-activated CD4⁺ T cells cultured in these conditioned media was assessed by CFSE dilution. (A) One representative experiment. (B) Average proliferation \pm SD (n=3).

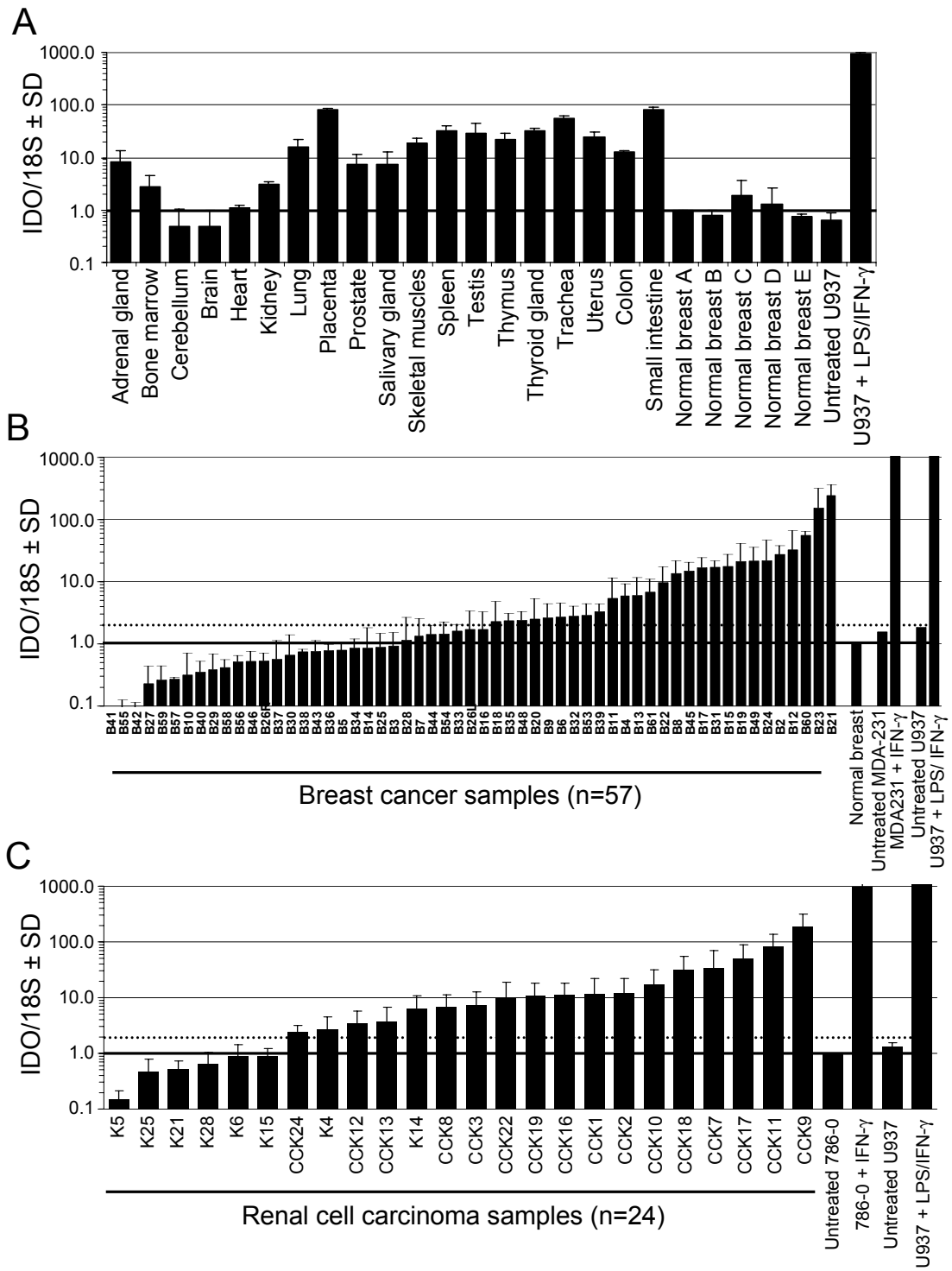


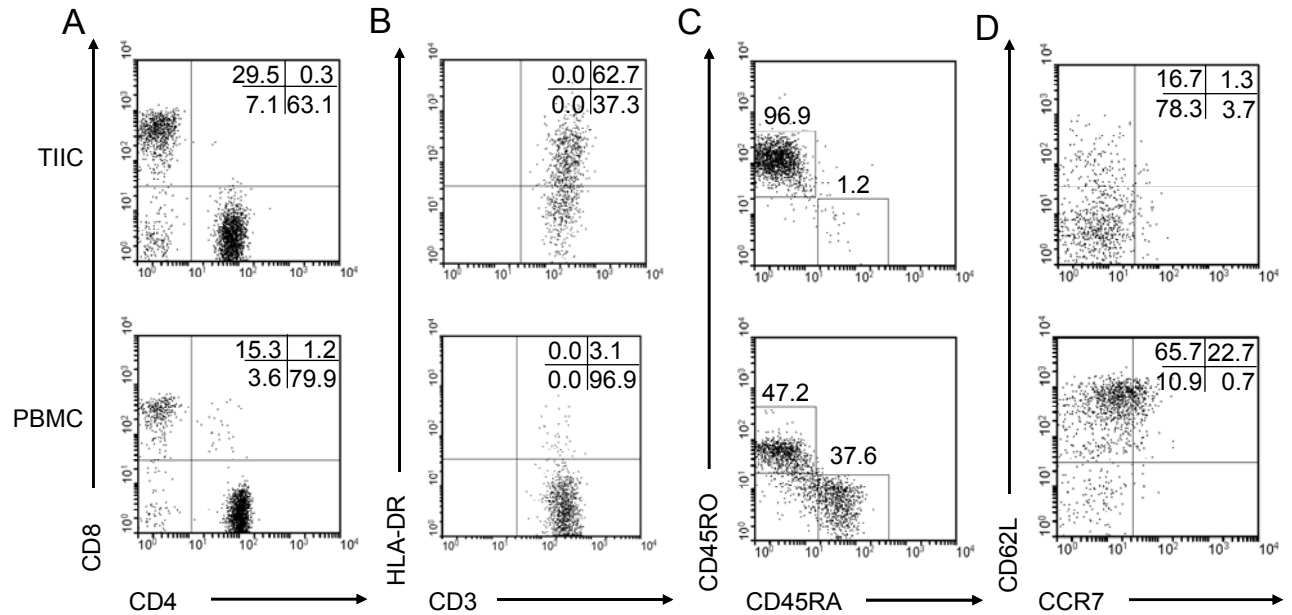
Figure 6^{m1} IDO is expressed from human breast and kidney cancers.

RNA was extracted from normal tissues or from resected breast and kidney cancer clinical specimens. cDNA was prepared, and IDO expression from (A) normal tissues, (B) breast and (C) kidney cancer samples was evaluated by quantitative real time RT-PCR, and normalized with 18S RNA. Clear cell RCC samples are identified by CC before the sample number.

Figure 7^{m1} IDO expression in tumors is modulated by Th1/Th2 cytokine balance.

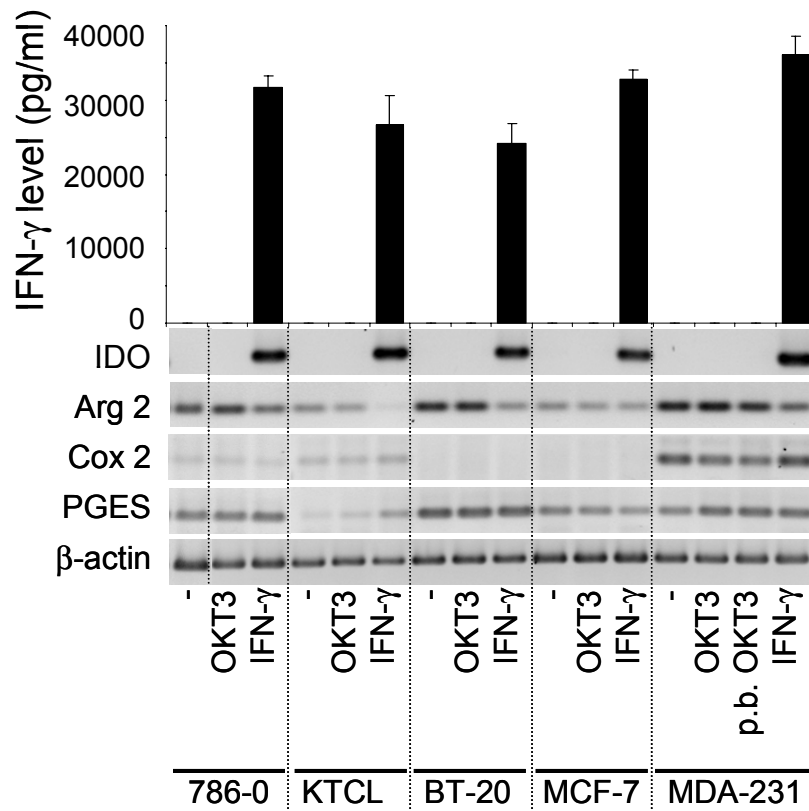
(A) The MDA-MB-231 cell line was cultured with various amounts of exogenous rhIFN- γ (1,000; 100; 10; 1 U/ml) to evaluate the blocking threshold of anti-IFN- γ neutralizing antibody. (B) MDA-MB-231 was co-cultured with un-activated or anti-CD3-activated CD4⁺ T cells in the presence of anti-IFN- γ antibody or isotype control. (A-B) IDO mRNA expression was determined by RT-PCR. (C) The MDA-MB-231 cell line was treated or not with 50 U/ml IFN- γ alone or in combination with different amounts of rhIL-13 or rhGM-CSF. (D) CD4⁺ T cells were treated with anti-CD3 or isotype control and co-cultured with MDA-MB-231 in the presence of a neutralizing antibody to IL-13 (50 μ g/ml). (C-D) Relative IDO expression was assessed by real time quantitative RT-PCR with 18S as reference. Monocyte derived DC untreated or treated with 10³ U/ml IFN- γ were used respectively as negative or positive controls.

Supplemental figures



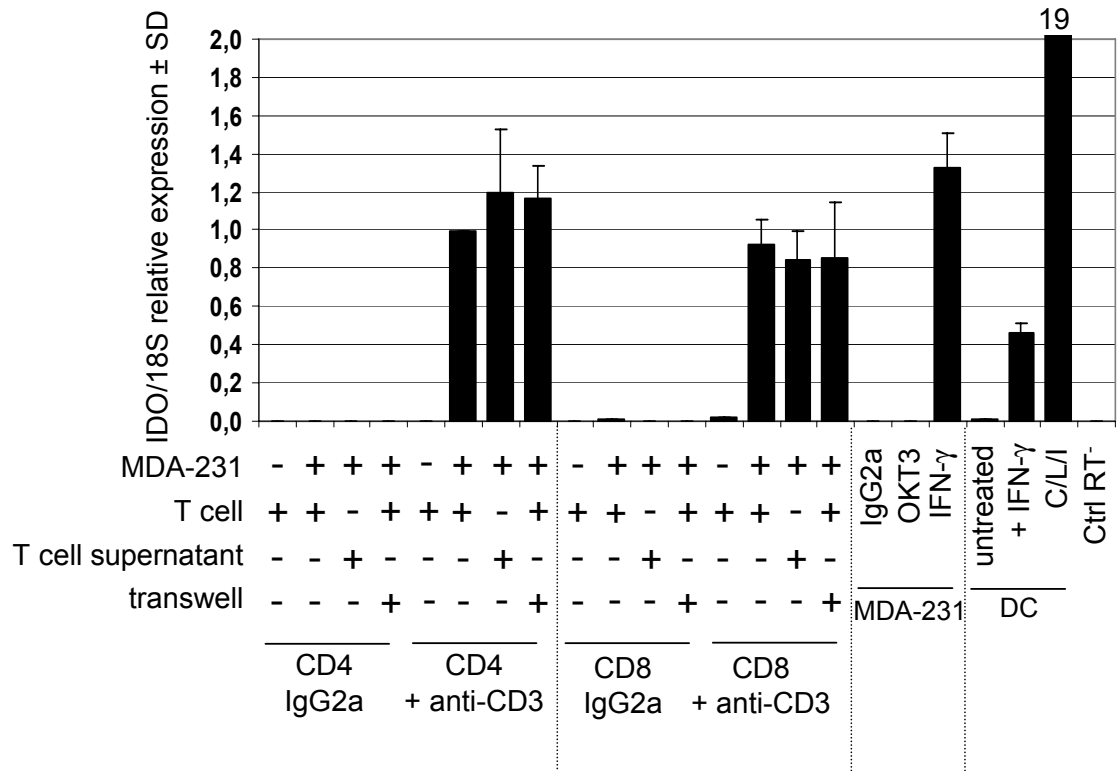
Supplemental figure 1^{m1} Phenotyping of immune cell populations in breast and renal cell carcinoma samples.

TIIC and PBMC obtained from breast and kidney cancer patients were incubated with conjugated specific antibodies. The expression of various lymphocyte markers was evaluated by FACS to determine the proportion of (A) $CD4^+$ and $CD8^+$, (B) $CD3^+HLA-DR^+$, (C) $CD45RA^+$ and $CD45RO^+$, (D) $CCR7$ and $CD62L$, cells. Dead cells were excluded by 7-AAD staining. A, B and D are gated on $CD3^+$ cells, and C is gated on $CD4^+$ cells. Typical flow cytometric profiles are illustrated.



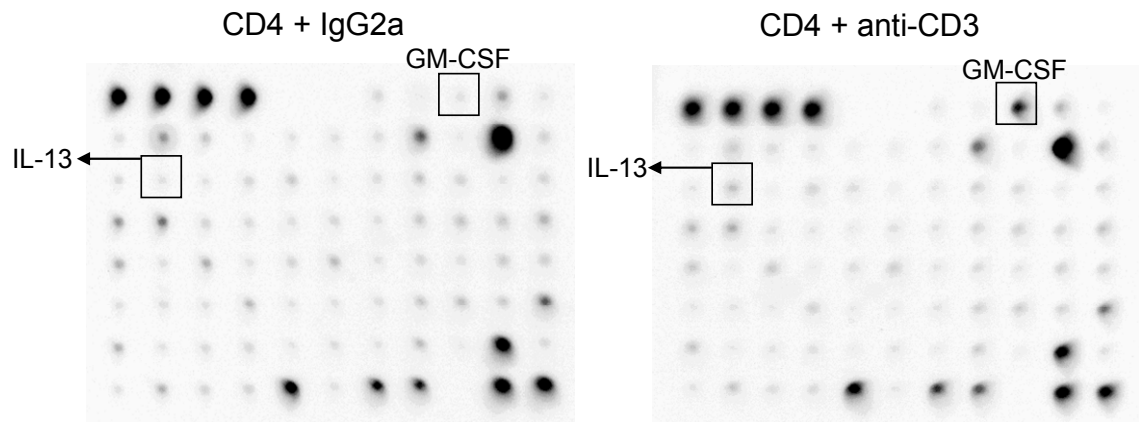
Supplemental figure 2^{m1} IDO is expressed in breast and kidney cancer lines in response to IFN- γ .

Kidney (786-O or KTCL) and breast (BT-20, MCF-7 or MDA-MB-231) cancer cell lines were either untreated, treated with OKT3-conditioned supernatant without T cells or with 1×10^3 U/ml IFN- γ for 24 h. The cells were harvested, and IDO, Arg2, COX-2, PGES and β -actin mRNA was detected by RT-PCR. IFN- γ levels from supernatants were determined by ELISA. Legend: p.b.: plate-bound.



Supplemental figure 3^{m1} IDO induction in tumor lines is cell-contact independent.

CD4⁺ or CD8⁺ T cells from PBMC were activated with anti-CD3 or isotype-matched control for 24 h. MDA-MB-231 were left untreated, co-cultured with activated T cells or their supernatant alone, or cultured with activated T cells in 2-compartment wells. Cells were harvested, and IDO mRNA expression was quantified relative to 18S by real time RT-PCR. Legend: p.b.: plate-bound.



Supplemental figure 4^{m1} Cytokine secretion profile of activated T cells.

Isolated CD4⁺ T cells were stimulated for 24 h with anti-CD3 or isotype-matched control. Supernatants were collected and cytokines produced were determined using a RayBio Human Cytokine Antibody Array (RayBiotech, Inc.).

SECTION 3. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

L'expression de l'IDO dans les cellules tumorales humaines est inhibée par un agent chimiothérapeutique, la fludarabine, de manière STAT1-indépendante

Cette partie contient des résultats n'ayant pas été soumis pour publication qui sont complémentaires au manuscrit précédent. Cette étude qui devait à l'origine permettre une compréhension des voies de signalament cellulaire impliquées dans la régulation de l'expression de l'IDO dans les cellules tumorales en réponse aux lymphocytes T activés jette finalement un regard sur les effets négatifs d'un agent chimiothérapeutique sur l'induction de l'expression de l'IDO. Nous jugeons pertinente la présentation de ces résultats puisque ceux-ci sont en lien direct avec la première partie relative à l'induction de l'IDO dans les cellules tumorales par les lymphocytes T activés infiltrant les tumeurs. De plus, ces résultats complémentaires s'intègrent de toute évidence dans un contexte d'immunothérapie du cancer conjuguée à l'inhibition de mécanismes permettant l'évasion tumorale. L'implication des résultats présentés ci-dessous sera abordée plus en profondeur dans la section Discussion et Perspectives (SECTION 5).

3.1 Justification

Dans le chapitre précédent, nous avons démontré que les cellules immunitaires infiltrant les tumeurs de même que les lymphocytes T activés induisent l'expression de l'IDO dans des lignées cellulaires tumorales. De par l'analyse des facteurs solubles produits par ces lymphocytes, nous avons confirmé que l'IFN- γ est un des facteurs majeurs

influençant l'expression de l'IDO. L'expression de gènes induite par l'IFN- γ est en association étroite avec la voie *Janus-activated kinase* (Jak)-STAT. En effet, cette voie de signallement cellulaire est activée suite à la liaison de l'IFN- γ à son récepteur à la surface des cellules (Figure 10). Les tyrosine kinases Jak1 et Jak2 sont d'abord activées, puis phosphorylent le résidu tyrosine en position 701 sur STAT1, ce qui permet la dimérisation de phospho-STAT1. Ce complexe peut ensuite être transloqué au noyau, puis se lier à l'*IFN- γ activated site* (GAS) présent sur le promoteur des gènes inductibles par l'IFN- γ . Il s'en suit une activation de la transcription de ces gènes. Pour que l'activation transcriptionnelle soit à son plein potentiel, un deuxième site, le résidu sérine en position 727, peut être phosphorylé sur STAT1 par l'entremise de la protéine kinase C-delta (PKC- δ), qui est elle-même activée par la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) lors d'une liaison entre l'IFN- γ et son récepteur (revu dans (269)).

Par ailleurs, l'importance d'un autre facteur impliqué dans la régulation de l'expression de l'IDO par les cellules tumorales a été mise en évidence par notre étude présentée dans la section 2. La cytokine IL-13, à l'inverse de l'IFN- γ , a été associée à une modulation négative de l'expression de l'IDO. Le signallement cellulaire déclenché par la liaison de cette cytokine au récepteur composé des deux sous-unités IL-4R α et IL-13R α 1 passe quant à lui par une phosphorylation de STAT6. Cette étape qui requiert l'activation de Jak1 et de Tyk2 résulte en l'homodimérisation de phospho-STAT6, puis en la translocation de ce complexe au noyau afin que celui-ci puisse activer la transcription de ses différents gènes cibles (270).

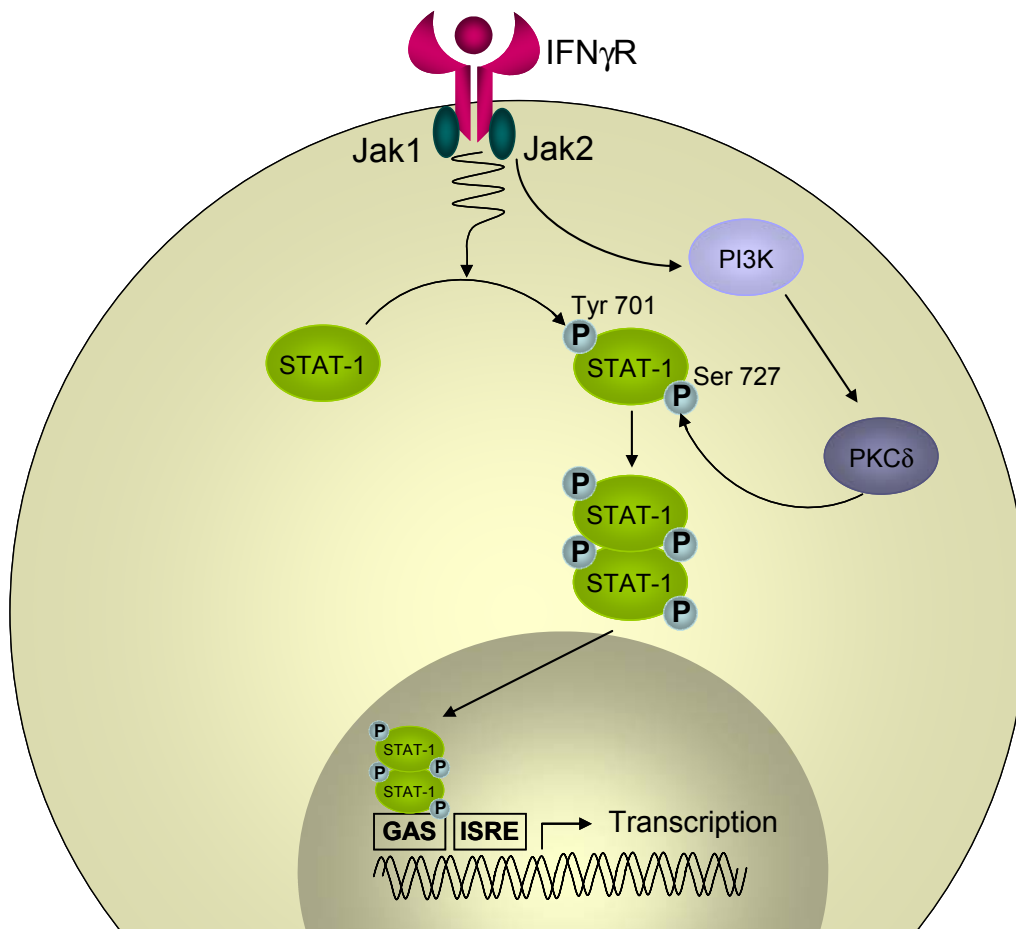


Figure 10 Signalement par la voie JAK-STAT en réponse à l'IFN- γ . (Figure inspirée de (269))

Légende: Suite à la liaison de l'IFN- γ au récepteur des interférons de type II, JAK1 et JAK2 sont activées et phosphorylent STAT1 sur le résidu tyrosine en position 701. Il se forme ensuite des homodimères de STAT1 phosphorylé qui transloquent au noyau et se lient à l'élément GAS qui est présent dans le promoteur des gènes régulés par l'IFN γ . Les JAK activées mènent aussi à l'activation de la sous-unité catalytique de la PI3K, ce qui résulte en l'activation subséquente de la PKC- δ . Cette dernière régule la phosphorylation de STAT1 sur le résidu sérine en position 727 qui permet une activation transcriptionnelle complète.

Bien que le signalement par les voies STAT1 et STAT6 soit classiquement impliqué dans la réponse respectivement à l'IFN- γ et à l'IL-13, il est possible que d'autres voies interviennent dans ce processus. Les travaux publiés par Yadav et ses collègues ont permis de mettre en évidence que la modulation de l'expression de l'IDO dans les cellules gliales était indépendante de STAT, mais impliquait plutôt la PI3K (213).

D'autre part, en plus de varier d'un type cellulaire à l'autre, les voies impliquées dans la régulation de l'IDO peuvent différer en fonction du stimulus responsable de l'expression de l'IDO. De fait, le LPS induit une augmentation de l'expression de l'IDO qui est indépendante de la voie de l'IFN- γ , dans des DC dérivées de la moelle osseuse de souris. Cette étude a permis de démontrer que, contrairement à l'expression de l'IDO induite par l'IFN- γ dépendante de Jak1, le signalement responsable de l'induction de l'IDO en réponse au LPS est quant à lui renversé par un inhibiteur de la PI3K (271).

Compte tenu de ces régulations différentielles, il apparaît important d'étudier l'état d'activation de ces voies de signalement Jak-STAT dans les cellules tumorales en réponse aux facteurs produits par les lymphocytes T activés et les TIL. Ainsi, nous pourrions établir son importance relative dans la régulation de l'expression de l'IDO dans des cellules de tumeurs solides humaines. Le rôle de cette voie de signalement dans la régulation de l'expression de l'IDO peut être étudié via l'inhibition de certains éléments clés de la voie, dont STAT1. Pour ce faire, les cellules à l'étude peuvent être traitées à la fludarabine, un composé ayant été décrit dans la littérature pour ses effets inhibiteurs sur STAT1 (272). La fludarabine est en fait un analogue de la purine qui inhibe la synthèse de l'ADN en interférant avec la ribonucléotide réductase et la DNA polymérase. Ainsi, elle est couramment utilisée comme agent chimiothérapeutique entre autre pour le traitement d'hémopathies malignes telles la leucémie lymphoïde chronique (273). L'administration de fludarabine aux patients entraîne une immunosuppression prolongée chez ceux-ci (274).

Considérant le fait que ce composé affecte à la fois les cellules en division et les cellules au repos, il a été spéculé que la fludarabine n'agisse pas seulement en s'intercalant dans l'ADN. En effet, la fludarabine a été associée à une inhibition du signalement par la voie de STAT1 (272). L'exposition de PBMC à la fludarabine affecte fortement l'induction de STAT1 en réponse à leur stimulation avec de l'IFN- α . De plus, la fludarabine inhibe la transcription de gènes dépendante de STAT1 dans les PBMC. Cet agent est donc largement utilisé comme inhibiteur de STAT1 (275) et constituera un outil important pour l'étude présentée dans cette section.

3.2 Matériel et Méthodes

Donneurs normaux et patients

Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique institutionnel, et le consentement éclairé de chaque donneur a été obtenu avant la collecte des échantillons. Les PBMC des donneurs sains recrutés par la Division d'Hématologie et d'Immunodéficience de l'Hôpital Royal-Victoria ont été obtenus par aphérèse, puis enrichis par centrifugation sur du *lymphocyte separation medium* (Wisent). Les patients atteints de cancer du sein ont été recrutés par la banque de cancer du sein du Réseau Cancer FRSQ. Les PBMC ont été préparés à partir du sang prélevé, par la même méthode que pour les donneurs sains.

Cellules et réactifs

La lignée cellulaire tumorale MDA-MB-231 a été obtenue de l'American Type Culture Collection et la lignée 624.38mel a été établie et obtenue par le Surgery Branch (NCI/NIH). Les lignées cellulaires ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 auquel ont été ajoutés 10% de sérum bovin fœtal inactivé par la chaleur 30 min à 56°C, 2 mM de L-glutamine, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 10 µg/ml de gentamicine (Wisent).

Les lymphocytes T ont été purifiés à partir des PBMC des donneurs sains par sélection négative à l'aide du système d'enrichissement *EasySep* pour les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ humains (StemCell technologies Inc.).

L'IFN-γ et l'IL-13 recombinants humains ont été achetés respectivement de Pierce Endogen et de Peprotech. La fludarabine a été obtenue de Toronto Research Chemicals et de Tocris Cookson Inc et la cyclophosphamide de Calbiochem.

Préparation des surnageants de lymphocytes T activés

Pour la préparation des surnageants de lymphocytes T activés de donneurs sains, des lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ ont été isolés tel que décrit ci-haut, puis ont été stimulés pendant 24 h avec un anticorps anti-CD3 (clone OKT3, eBioscience) lié à la plaque (5 µg/ml dilué dans le PBS) ou avec le contrôle isotypique correspondant (eBioscience). Le surnageant a ensuite été récolté, puis centrifugé pour éliminer les cellules ou les débris cellulaires et a été conservé à -20°C.

Les TIL ont été préparés, selon un protocole adapté de Yannelli et collègues (276). Les échantillons cliniques de cancer du sein ont été coupés en petits morceaux de 1 mm², puis ont été digérés enzymatiquement dans 10 mL de RPMI contenant 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 10 µg/ml de gentamicine avec un mélange de collagénase IV, hyaluronidase, DNase pendant 16 h à température pièce pour le patient 1, ou de collagénase I, collagénase IV et DNase pendant 2 h à 37°C pour le patient 2. La suspension obtenue a été filtrée sur un *Cell strainer* de 40 µm (BD Falcon), suivi par deux lavages avec du PBS. Les TIL ont été enrichis par centrifugation sur du *lymphocyte separation medium* (Wisent) et ont été cultivés à une concentration maximale de 2×10⁶ cellules par ml dans un milieu de culture Iscove contenant 7,5% de sérum AB inactivé par la chaleur (Gemini) dans une plaque à 24 puits. À tous les 5 jours, la moitié du milieu a été remplacée par du milieu frais contenant 1×10³ CU/ml d'IL-2. Lorsque le nombre de lymphocytes a atteint un minimum de 2×10⁶ (entre les jours 17 et 25), les cultures ont subi un protocole d'expansion rapide (277,278). Brièvement, 1-5×10⁵ TIL ont été cultivées avec 2,5×10⁷ PBMC irradiées provenant d'un minimum de 3 donneurs sains, 30 ng/ml d'anti-CD3 (clone OKT3), 300 IU d'IL-2 dans du milieu Iscove contenant 7,5% de sérum AB. Au jour 2, 300 IU d'IL-2 ont été ajoutées et au jour 5, le surnageant a été remplacé par du milieu complet frais contenant 300 IU d'IL-2. Entre les jours 8 et 10, le nombre atteint de lymphocytes était de l'ordre de 1-2×10⁸ cellules. Les lymphocytes T CD8⁺ ont été isolés

par sélection négative, et les cellules restantes ont servi à préparer les surnageants de TIL, tel que décrit pour les lymphocytes T de donneurs sains, par stimulation avec de l'anti-CD3 ou le contrôle isotypique correspondant.

Traitement des cellules

Environ 2×10^5 cellules ont été distribuées dans des plaques à 12 puits et laissées à 37°C pour la nuit dans 1 ml de milieu de culture RPMI complet. Le lendemain, le milieu de culture a été retiré, puis remplacé par du milieu frais contenant 10, 50 ou 100 μ M de fludarabine, ou des quantités équivalente de DMSO servant de contrôle. Après 6 ou 24 h de traitement, le milieu a été retiré, puis remplacé par du milieu frais contenant ou non différentes concentrations d'IFN- γ recombinant humain, ou par du surnageant de lymphocytes T activés de donneurs normaux ou de lymphocytes T infiltrant la tumeur provenant d'échantillons cliniques du cancer du sein. Des stimulations d'une durée de 30 minutes ont été exécutées pour déterminer l'effet d'un traitement à la fludarabine sur la phosphorylation de STAT1, alors que des stimulations de 24 h ont servi à vérifier les effets sur l'induction de l'IDO. Après la période de stimulation, les cellules ont été placées sur glace, puis le milieu de culture a été retiré pour être remplacé par du PBS froid. Les cellules ont été récoltées à l'aide de grattoirs (policeman), puis ont été centrifugées à 4°C pendant 1 min à vitesse maximale (14 926 g). Les culots cellulaires ont été congelés dans un bain composé de glace sèche et d'éthanol, puis conservés à -80°C jusqu'à l'extraction protéique.

Immunobuvardage de type western

Les extraits protéiques ont été préparés dans du tampon de lyse Nonidet P-40, tel que décrit précédemment par Solis et al. (279). Brièvement, les culots cellulaires ont été resuspendus dans le tampon de lyse et ont été incubés sur glace pendant 20 min, suivi par 3 cycles de congélation dans un bain de glace sèche/éthanol puis de décongélation à 37°C.

Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation à vitesse maximale (14 926 g) pendant 30 min à 4°C. Les concentrations protéiques des surnageants ont été mesurées par la méthode de Bradford à l'aide du Dye reagent concentrate de Bio-Rad. Pour évaluer la phosphorylation de STAT1 et de STAT6 ainsi que l'expression totale de ces protéines, 7,5 à 10 µg des extraits ont été assujettis à une électrophorèse sur des gels d'acrylamide à 7,5%. Pour mesurer l'expression protéique de l'IDO, des gels d'acrylamide à 10% ont été utilisés. Suite à l'électrophorèse, les protéines ont été transférées sur des membranes de polyvinylidene fluoride (Immun-Blot, Bio-Rad), lesquelles ont été bloquées 1 h avec 5% de lait écrémé dilué dans du PBS/0,1% Tween 20. Les membranes ont été incubées pendant la nuit à 4°C avec des anticorps primaires de lapin (Cell Signaling technology) spécifiques à STAT1 (1:1000, clone 9172), STAT6 (1:1000, clone 9362), ou des anticorps phosphospécifiques dirigés contre STAT1 tyr⁷⁰¹ (1:3000, clone 9171), STAT1 ser⁷²⁷ (1:1000, clone 9177), STAT6 (1:1000, clone 9361), tous dilués dans du PBS/0,05% Tween 20/5% BSA. Les membranes ont ensuite été incubées pendant 1 h à température ambiante avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin (clone AP156P, Millipore, dilué dans PBS/0,1% Tween 20/, 5% lait; 1:2000 pour les phospho-STAT1, et 1:10000 pour STAT1, phospho-STAT6 et STAT6). L'expression de l'IDO a été évaluée avec un anticorps primaire polyclonal de mouton, anti-IDO humain (Hycult Biotechnology) dilué 1:100 dans du PBS/0,1% Tween 20, suivi d'un anticorps secondaire de lapin anti-mouton couplé à la peroxidase (1:10000, de Chemicon). Les bandes ont été révélées par une solution de détection chémiluminescente ECL Plus (Amersham) et visualisées par exposition sur autoradiogramme. Entre chaque révélation, les membranes ont été dépouillées de leur anticorps avec une solution Re-Blot Plus Mild (Millipore), selon les directives du manufacturier et bloquées de nouveau avec du lait.

3.3 Résultats et conclusions

Activation des voies STAT1 et STAT6

Les résultats découlant de l'étude précédente nous avaient permis d'établir que certaines cytokines produites par les lymphocytes T activés étaient impliquées dans la régulation de l'expression de l'IDO dans les cellules tumorales humaines. Plus précisément, nous avons démontré que l'IL-13, une cytokine de type Th2, avait la capacité d'inhiber l'induction de l'IDO dépendante de l'IFN- γ chez les cellules tumorales humaines (Figure 7^{m1}, section 2). Pour faire suite à ces résultats, nous avons donc déterminé si les voies classiquement impliquées dans le signalement par l'IFN- γ et l'IL-13, respectivement STAT1 et STAT6, étaient activées chez les cellules tumorales suite à leur culture dans un milieu conditionné par des lymphocytes T activés. Ainsi, nous avons procédé à l'évaluation de la phosphorylation de ces deux intermédiaires de signalement dans la lignée cellulaire tumorale MDA-231 en réponse à une stimulation par du milieu conditionné par des lymphocytes T activés. Dans un premier temps, nous avons confirmé la phosphorylation de STAT1 en réponse à un traitement des cellules avec de l'IFN- γ recombinant (Figure 11, section du haut) et, de façon similaire, la phosphorylation de STAT6 par l'IL-13 recombinant (Figure 11, section du bas). Les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ activés par l'anti-CD3 ont induit la phosphorylation de STAT1, tel qu'attendu. Par contre, aucune activation de la voie de STAT6 n'a été détectée, puisqu'aucune bande correspondant à phospho-STAT6 n'a pu être détectée dans les échantillons de cellules MDA-231 stimulées avec du surnageant de lymphocytes T activés. Dans les cellules stimulées avec de l'IL-13 recombinant, utilisées comme contrôle positif, une phosphorylation de STAT6 a été observée. Ces résultats laissent supposer que l'activation de STAT1 est prédominante dans notre modèle cellulaire en réponse aux lymphocytes T activés et interfère possiblement avec l'activation de la voie de STAT6.

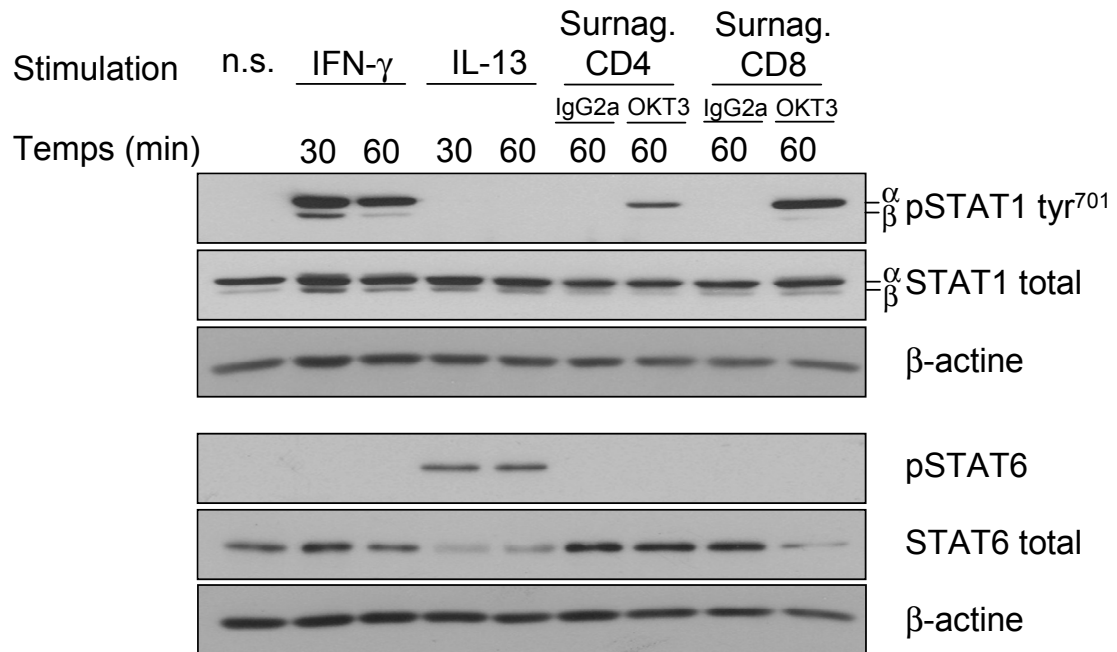


Figure 11 Activation de STAT1 et STAT6 en réponse aux surnageants de lymphocytes T activés

Légende: La lignée tumorale MDA-MB-231 a été stimulée pendant 30 ou 60 minutes avec de l'IFN- γ ou de l'IL-13 recombinants, ou pour 60 minutes avec du surnageant de lymphocytes T isolés de donneurs sains activés avec de l'anti-CD3 ou avec le contrôle isotypique correspondant. Les cellules ont été récoltées, puis les protéines en ont été extraites. STAT1-phospho-Tyr⁷⁰¹, STAT1 total, phospho-STAT6, STAT6 total et la β -actine ont été détectés par immuno-buvardage de type western.

Évaluation de l'efficacité d'un inhibiteur de STAT1

Nous avons inhibé STAT1 dans le but de lier la voie de STAT1 avec l'induction de l'IDO dans les lignées tumorales en réponse aux lymphocytes T activés. Pour se faire, nous avons utilisé la fludarabine, un composé chimio-thérapeutique rapporté dans la littérature pour son action inhibitrice sur STAT1, mais n'ayant pas d'effet inhibiteur sur Jak1 et Tyk2 ainsi que sur STAT2, STAT3, STAT5 et STAT6 (272). Nous avons d'abord évalué l'efficacité de la fludarabine en reproduisant les conditions expérimentales décrites dans l'étude de Frank et collègues, laquelle présente des données générées à partir de PBMC. Nous avons donc entrepris des essais dans lesquels des PBMC ont été traités ou non avec 50 μ M de fludarabine, puis ont été stimulés ou non avec 25 U/ml d'IFN- γ recombinant. Les résultats obtenus ont permis de démontrer une diminution de STAT1 total ainsi que de phospho-STAT1 dans les PBMC traités à la fludarabine (Figure 12A et 12B), conformément à ce qui avait précédemment été décrit.

Effets de la fludarabine sur l'expression de l'IDO

Ayant confirmé les effets inhibiteurs de la fludarabine sur STAT1, nous avons ensuite déterminé l'impact de cette inhibition sur l'induction de l'IDO dans les cellules cancéreuses. Nous avons ainsi prétraité la lignée de cancer du sein MDA-231 ainsi que la lignée de mélanome 624.38mel avec des doses croissantes de fludarabine pendant 24 h. Ces lignées ont ensuite été stimulées avec de l'IFN- γ recombinant pour une période de 30 min ou 24 h. Tel que démontré par la figure 13A, nous avons observé une induction protéique de l'IDO suite à l'exposition des cellules à l'IFN- γ seul. En comparaison avec cette condition expérimentale, une diminution de l'expression de l'IDO a été observée chez les mêmes lignées préalablement traitées à la fludarabine puis stimulées avec de l'IFN- γ . La fludarabine, dont les effets sont dose-dépendants, entraîne une inhibition totale de l'expression de l'IDO chez les MDA-231 lorsqu'elle est utilisée à une concentration 50 μ M ou plus. Quant à la lignée cellulaire 624.38mel, elle nécessite une concentration plus

importante de fludarabine pour que l'induction de l'IDO par l'IFN- γ en soit affectée (Figure 13A).

Nous avons par ailleurs évalué si des effets similaires à ceux de la fludarabine sur l'induction de l'IDO sont causés par d'autres agents chimiothérapeutiques. Nous avons donc traité les lignées cellulaires tumorales avec de la cyclophosphamide, un agent alkylant utilisé entre autre dans le traitement du cancer du sein (280), mais aussi administré en combinaison avec la fludarabine comme chimiothérapie lymphodéplétante avant un transfert adoptif de lymphocytes T chez des patients atteints de mélanome. L'analyse de l'expression de l'IDO induite par l'IFN- γ dans les cellules tumorales prétraitées avec la cyclophosphamide a démontré que cet agent n'engendre pas effet d'effets similaires à ceux de la fludarabine sur l'expression de l'IDO (données non présentées).

En parallèle, nous avons déterminé si cette répression de l'IDO causée par la fludarabine est effectivement accompagnée d'une inhibition de STAT1. Des extraits protéiques provenant des cellules tumorales prétraitées à la fludarabine puis stimulées avec de l'IFN- γ recombinant pendant 30 minutes ont donc été préparés. Étonnamment, aucune diminution du niveau protéique de STAT1 total, ni de la phosphorylation de ses résidus tyrosine en position 701 et sérine en position 727 n'ont été constatés pour les 2 lignées à l'étude (Figure 13B). Ces résultats semblent en opposition avec ce qui a été observé pour les PBMC, et permettent de croire que la fludarabine agit différemment sur les PBMC et les cellules cancéreuses. L'effet inhibiteur de la fludarabine chez les cellules tumorales est indépendant du niveau total d'expression de STAT1 et de son activation.

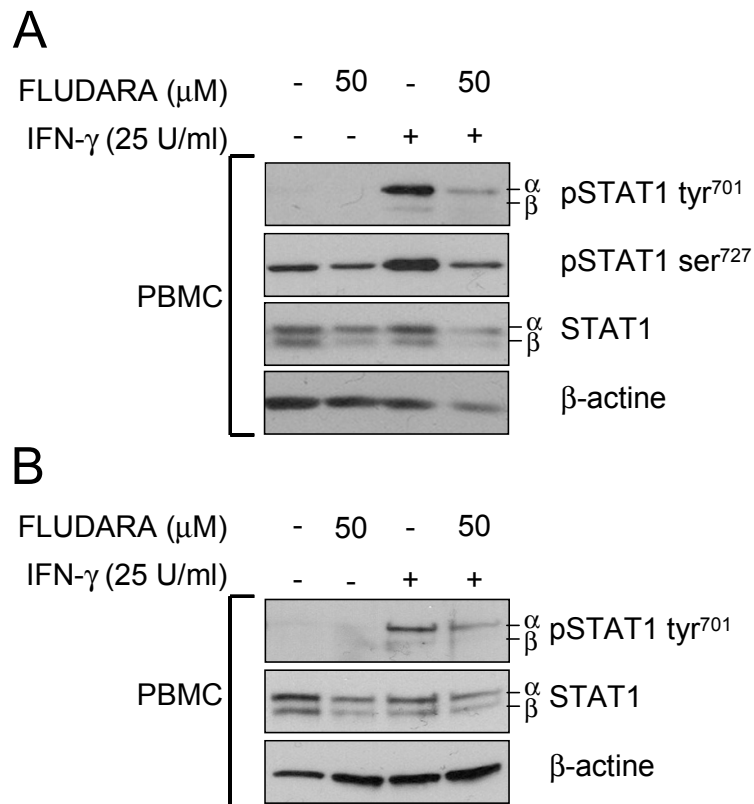


Figure 12 Inhibition de STAT1 dans les PBMC par la fludarabine

Légende: Les PBMC d'un donneur normal ont été traités ou non pendant 24 avec 50 μ M de fludarabine, puis ont été stimulés pour une période de 30 min avec 25 U/ml d'IFN- γ recombinant humain afin d'induire la phosphorylation de STAT1. Des extraits protéiques ont été préparés à partir des cellules et STAT1-phospho-Tyr⁷⁰¹, STAT1-phospho-Ser⁷²⁷, STAT1 total et la β -actine ont été mesurés par immuno-buvardage de type western. A et B illustrent 2 expériences indépendantes, (n=3).

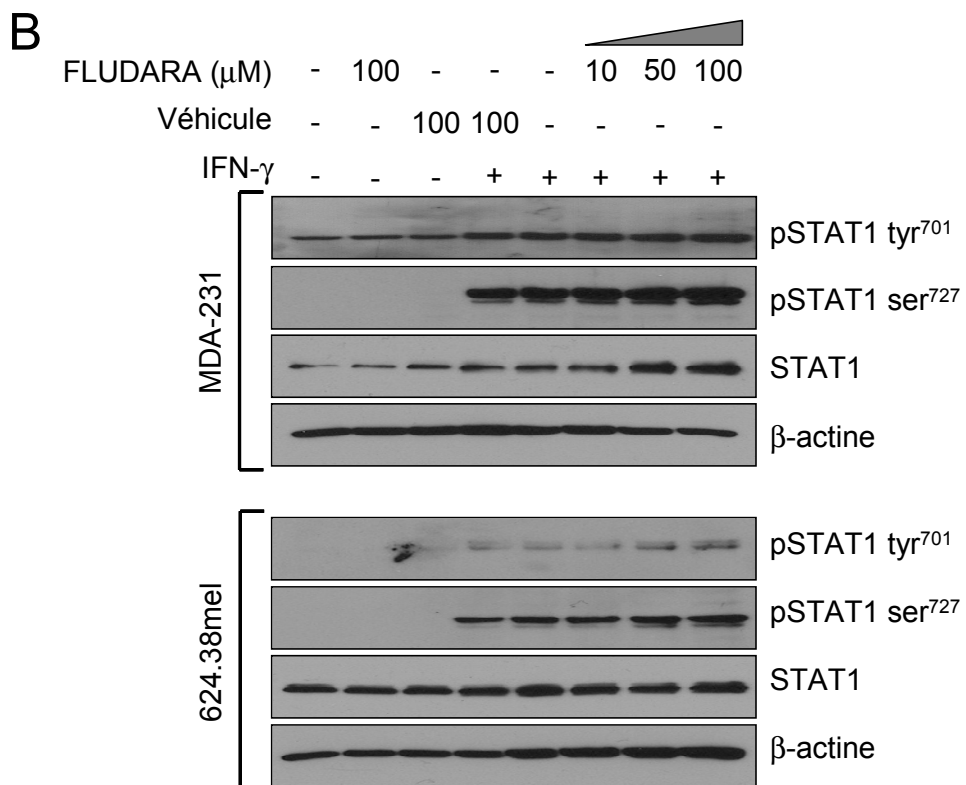
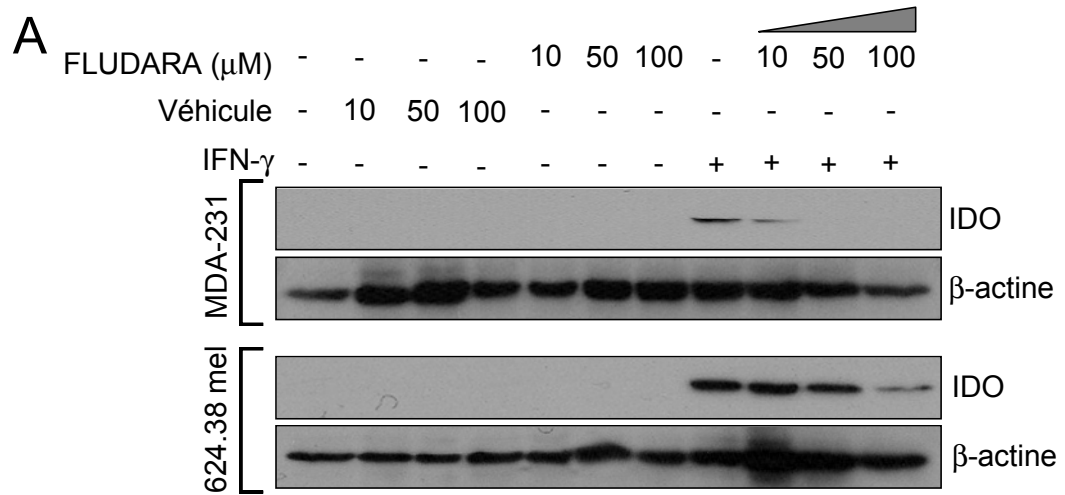


Figure 13 Inhibition de l'induction de l'IDO dépendante de l'IFN- γ par la fludarabine dans des lignées cellulaires tumorales.

Légende: Les lignées cellulaires tumorales MDA-231 et 624.38mel ont été pré-traitées pendant 24h avec différentes doses de fludarabine ou du véhicule, puis ont été stimulées ou non avec de l'IFN- γ recombinant. Les protéines ont été extraites des cellules et l'expression de l'IDO et de la β -actine (A), ou la présence de phospho-STAT1 tyr701, phospho-STAT1 ser727, STAT1 total et de la β -actine (B) a été évaluée par immuno-buvardage de type western. Une expérience représentative est illustrée, (n=3).

Suite à ces résultats, nous avons déterminé si des effets similaires pouvaient être observés dans notre modèle initial, soit la culture des lignées cellulaires tumorales dans un milieu conditionné par des lymphocytes T activés. Dans un premier lieu, des surnageants de lymphocytes T isolés de donneurs normaux et activés 24 h avec un anti-CD3 ont été utilisés pour cultiver les lignées cellulaires tumorales pendant 24 h afin d'induire l'expression de l'IDO dans ces cellules. Les résultats présentés dans la figure 14A démontrent que l'induction de l'IDO dans la lignée 624.38mel en réponse au surnageant de lymphocytes T activés est fortement inhibée par un traitement des cellules tumorales avec 50 μ M de fludarabine. De plus, en accord avec les résultats présentés dans la figure précédente, l'effet inhibiteur de la fludarabine sur l'expression de l'IDO semble indépendant du signalment par la voie de STAT1. En effet, l'expression plus faible de l'IDO lorsque les cellules sont traitées à la fludarabine n'est pas accompagnée d'une baisse dans le niveau d'expression de STAT1, ni de sa phosphorylation (Figure 14A). Des résultats similaires ont été obtenus avec des surnageants produits à partir de TIL isolés d'échantillons cliniques de cancers du sein. Dans les conditions où les lignées MDA-231 et 624.38mel ont préalablement été traitées à la fludarabine, une forte diminution de l'IDO induite par le milieu conditionné par les TIL activés a été observée (Figure 14B). De plus, mis à part dans les MDA-231 stimulées par le surnageant du patient 1, les effets de la fludarabine ne semblent pas affecter de façon consistante les niveaux d'expression de STAT1 (Figure 14B). Son niveau de phosphorylation reste aussi constant dans les cellules tumorales stimulées avec les surnageants de TIL prétraitées avec la fludarabine (données non présentées).

En conclusion, la fludarabine, précédemment décrite pour sa capacité à inhiber STAT1, s'est avérée être un inhibiteur efficace de l'expression de l'IDO dans des lignées cellulaires tumorales humaines sans toutefois affecter STAT1 de façon notable. L'implication d'autres voies de signalment cellulaire devront être explorées afin d'identifier celle étant impliquée dans la régulation de l'expression de l'IDO par la fludarabine.

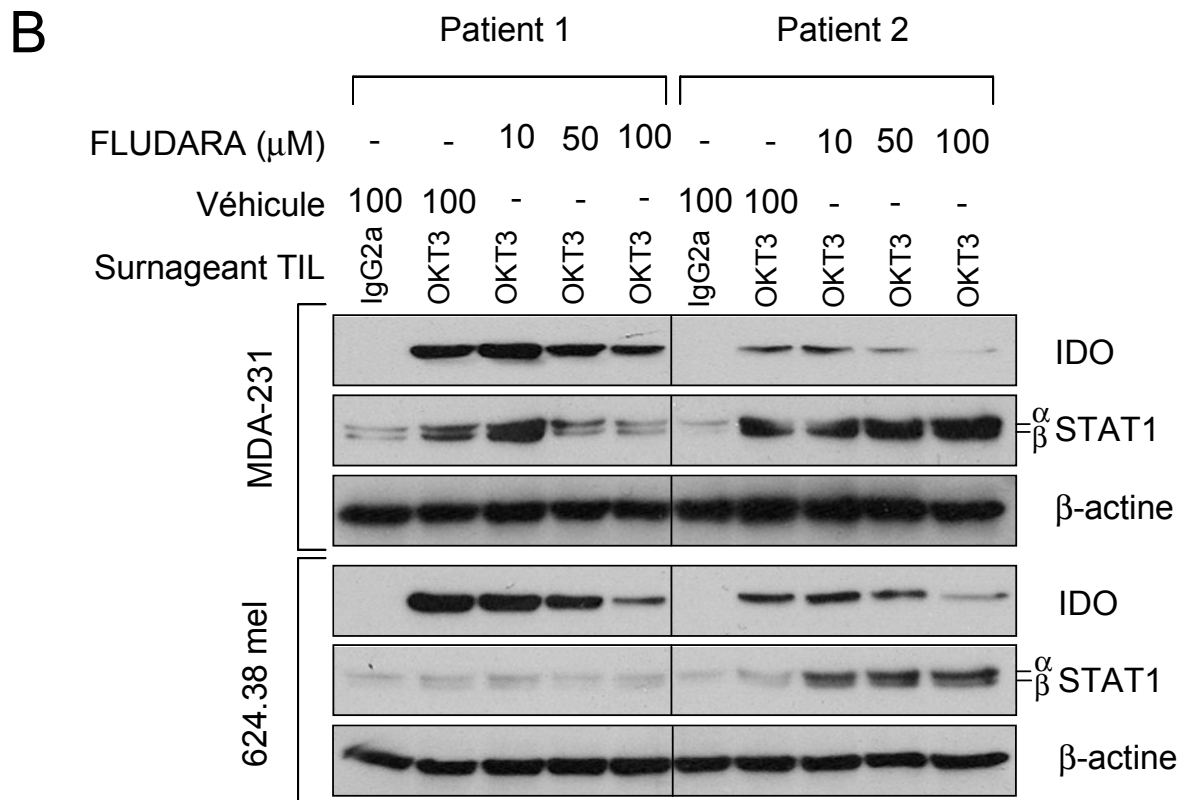
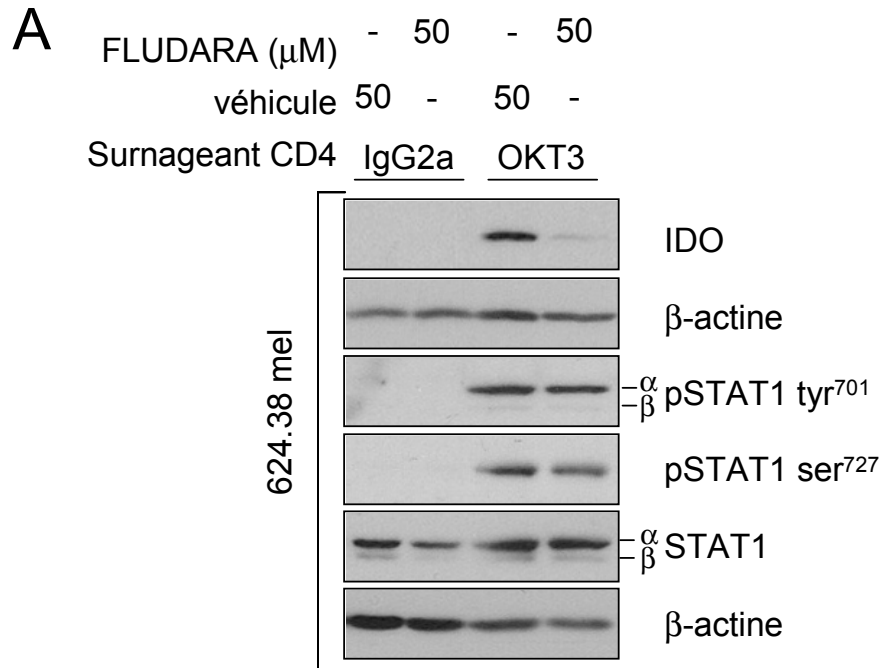


Figure 14 Inhibition par la fludarabine de l'expression de l'IDO induite dans des lignées cellulaires tumorales exposées à des surnageants de lymphocytes T ou de TIL activés.

Légende: Des lymphocytes T CD4⁺ isolés de donneurs normaux (A) ou des TIL de patients atteints du cancer du sein (B) ont été activés pendant 24 h avec un anti-CD3 ou l'isotype contrôle correspondant. Suite à leur activation, ils ont été cultivés dans du milieu frais pendant 24 h, puis ce milieu conditionné a été récolté. Les lignées cellulaires tumorales MDA-231 et 624.38mel ont été traitées avec différentes doses de fludarabine ou du véhicule pendant 24 h, puis ont été stimulées avec les surnageant de lymphocytes T CD4⁺ (A) ou les surnageants de TIL (B). Les cellules ont été récoltées pour en extraire les protéines, puis la présence de phospho-STAT1 tyr701, phospho-STAT1 ser727 (A) ainsi que de STAT1 total, IDO et la β -actine (A-B), a été évaluée par immuno-buvardage de type western. Une expérience représentative est illustrée, (n=2).

SECTION 4. MANUSCRIT 2

IDO expression by human B lymphocytes in response to T lymphocyte stimuli
is biologically inactive

Article soumis à *International Immunology*

Jessica Godin-Ethier¹, Jean-Baptiste Duvignaud², Denis Leclerc² and Réjean Lapointe^{1*}

¹ Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) – Hôpital Notre-Dame, Department of Medicine, Université de Montréal, and Institut du cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada

² Centre de Recherche en Infectiologie, Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL), Université Laval, Québec, Québec, Canada

* Corresponding author: Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) – Hôpital Notre-Dame, Pavillon J.A. DeSève, Local Y-5605, 2099 rue Alexandre DeSève, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1. Telephone: (514) 890-8000 #25489 (office), 25504 (laboratory), Fax: (514) 412-7591.

Running title: IDO expression in human B cells

Keywords: Indoleamine 2,3-dioxygenase; human; B lymphocyte; IFN- γ ; CD40L

Contribution des auteurs

J. Godin-Ethier est responsable de la rédaction de cet article et de l'entière réalisation des travaux de recherche à l'exception des analyses par HPLC.

La quantification du tryptophane et de la kynurénine par HPLC a été mise au point et réalisée par J.-B. Duvignaud grâce à la collaboration de D. Leclerc.

R. Lapointe a supervisé l'ensemble de l'étude.

Abstract

The immune system must be under tight control to avoid undesired responses. The enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) can exert necessary regulating effects by catabolizing tryptophan, leading to the suppression of immune responses in different settings, such as pregnancy and tumor growth. IDO's immuno-suppressive actions are mediated by tryptophan starvation and the accumulation of toxic tryptophan metabolites, resulting in T cell anergy, inhibition of clonal expansion or apoptosis. IDO activity in human macrophages and dendritic cells has been observed after interaction with T lymphocytes, and is triggered by interferon-gamma (IFN- γ) as well as CD40-ligand (CD40L). However, it is unclear whether IDO activity is present in B lymphocytes, which have been identified as having suppressive properties involved in anti-tumor immunity inhibition.

In this study, we investigated whether IDO expression is induced in human B cells after exposure to T lymphocyte stimuli. We report IDO and IDO2 mRNA up-regulation by exogenous stimulation with CD40L and IFN- γ . In addition, IDO protein is detected after treatment with these exogenous factors or with supernatant from activated CD4⁺ T cells. We, however, report weak or absent enzymatic activity from these IDO-expressing cells, as assessed by tryptophan consumption.

We conclude that IDO may not be a counter-regulatory mechanism utilized by B lymphocytes to down-regulate immune responses, although its expression is inducible.

Introduction

Counter-regulatory mechanisms are necessary in the immune system to avoid inappropriate or excessive responses (reviewed in (281)) and promote contraction phases. By limiting the intensity and extent of immune responses, these inhibitory mechanisms prevent further damage to the host. Such functions can be fulfilled by the tryptophan-catabolizing enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). Degradation of the essential amino acid tryptophan by IDO, depleting tryptophan from the intracellular pool or local microenvironment, was first described as a defense mechanism against intracellular pathogens (177,282). Its role was thereafter extended to fetal protection against maternal T cells, when Munn et al. (181) demonstrated that administration of the IDO inhibitor 1-methyl-tryptophan (1MT) to pregnant mice led to fetal rejection. This pivotal study ascribed a new immunosuppressive function to the enzyme, and prompted an intense search for its contribution in tumor escape (182,183). In fact, enzymatically-active IDO and the recently-identified IDO2 proteins (174,175) lead to tryptophan starvation and downstream metabolite accumulation. This culminates in multiple effects on immune cells, such as T lymphocyte proliferative arrest (192,196,283), anergy (190), apoptosis (197), conversion of naive CD4⁺ T cells to regulatory T cells (Tregs) (199), and activation of mature CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs (200).

Active IDO is induced in human macrophages and monocyte-derived dendritic cells (DC) upon interaction with T lymphocytes, and this induction is dependent not only on interferon-gamma (IFN- γ) production, but also on CD40-ligand (CD40L) up-regulation on these T cells (192,259). Moreover, a subtype of IDO⁺ plasmacytoid DC, co-expressing a B-lineage marker, can be found in tumor-draining lymph nodes of tumor-bearing mice or patients, creating a suppressive environment and culminating in a profound anergic state of anti-tumor T lymphocytes (190).

In the course of an effective humoral response, B lymphocytes interact closely with T lymphocytes, and signals are exchanged through cell-cell contacts involving major histocompatibility complex/T cell receptor (MHC/TCR) and CD40/CD40L interactions, and cytokines such as IFN- γ are released. Based on what is known about IDO induction in macrophages and DC, this counter-regulatory mechanism also possibly arises in B lymphocytes after T lymphocyte encounter. B cell-deficient mice have been shown to mount a more effective anti-tumor response in comparison to wild type mice, suggesting that B cells hamper anti-tumor immunity (284,285). Such suppressive activity has been associated with interleukin (IL)-10 production by B cells after CD40 ligation, leading to decreased IFN- γ production by T lymphocytes, at least *in vitro* (284). However, it is not clear whether B lymphocyte inhibitory effects depend on the same mechanism of action, to prevent anti-tumor responses effectiveness *in vivo* (286). Some other mechanism orchestrated by B cells might participate in the inhibition of anti-tumor responses *in vivo*.

A recent study demonstrated the existence of a murine PDCA-expressing B lymphocyte subpopulation, in which IFN- α and IDO1/IDO2 are induced at the mRNA level upon stimulation with cytotoxic T lymphocyte antigen-4-immunoglobulin (CTLA4-Ig). However, neither protein expression nor enzymatic activity was evaluated (287). In the present work, we investigated whether IDO expression could be up-regulated in human B lymphocytes in response to T cell signals. In addition, we sought to determine whether this induction would beget a functional enzyme capable of metabolizing tryptophan. We found that IDO was produced by human B cells at the mRNA and protein levels after stimulation with IFN- γ and CD40L, but in an inactive form, indicated by the lack of tryptophan consumption and kynurenine accumulation.

Materials and Methods

Healthy donors and cells

Heparinized blood obtained by leukapheresis from healthy donors was centrifuged on lymphocyte separation medium (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada) to isolate peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Donors were recruited by the Division of Hematology and Immunodeficiency Service of Royal Victoria Hospital. The study was approved by the local ethics committee, and informed consent was obtained from each patient.

All cell lines were procured from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). U937 and KTCL cells were cultured respectively in RPMI 1640 and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 10 µg/ml gentamicin (all from Wisent).

B lymphocytes were purified from PBMC by negative selection, with an EasySep human B cell enrichment kit (StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada), according to the manufacturer's instructions. Briefly, PBMC were incubated with $10 \mu\text{l}/10^7$ total cells of antibody cocktail containing a combination of monoclonal antibodies (Abs) against human CD2, CD3, CD14, CD16, CD36, CD43, CD56 and glycoporphin A. Magnetic nanoparticles were added at $10 \mu\text{l}/10^7$ total cells for 10 min at room temperature, before the test tube was placed into the magnet for 5 min. Isolated B cell purity reached >95%.

Monocyte-derived DC were generated from PBMC of healthy donors (256), followed by 24 h of stimulation with 500 ng/ml soluble trimeric CD40L (Immunex

Corporation, Seattle, WA) and/or 10^3 U/ml IFN- γ (Pierce Endogen, Rockford, IL) and/or 5 μ g/ml lipopolysaccharide (LPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Reagents

L-tryptophan (Sigma-Aldrich) was prepared as a 20-mM stock solution in water.

B lymphocytes were stimulated with 500 ng/ml soluble trimeric CD40L (Immunex Corporation), 250 U/ml recombinant human IL-4 (Peprotech, Rocky Hill, NJ), or 10^3 U/ml IFN- γ in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 7.5% heat-inactivated human serum (from normal donors), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin and 10 μ g/ml gentamicin.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RNA from cell lines, lymphocytes and DC was extracted with RNeasyTM mini or micro kits (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. For classical and quantitative RT-PCR analyses, cDNA was first synthesized from mRNA (500 ng) with oligo-dt and random hexamers (both from Applied Biosystems, Carlsbad, CA), using an Omniscript reverse transcriptase kit (Qiagen). The sequences of PCR primers spanning distinct exons were: IDO (5': CGCTGTTGGAAATAGCTTCTTGC; 3': CTTCCCAGAACCCTTCATACACC, amplicon 167-bp), IDO2 (5': CGTCATAGCAAGGAAAGTGGTGAC; 3': CCCTCAGGGAAGGTGCTGAG, amplicon 106-bp), and 18S ribosomal subunit (5': ATCAACTTTCGATGGTAGTCG; 3': TCCTTGGATGTGGTAGCCG, amplicon 111-bp), as described previously (288). Classical RT-PCR amplification was undertaken with HotStartTaq DNA polymerase (Qiagen). The cycling conditions were 15 min at 95°C, 22 (18S), 30 (IDO1), or 32 (IDO2) cycles of 45 s at 94°C, 45 s at 55°C, 1 min at 72°C, with a final extension of 10 min at 72°C, in a T3 ThermocyclerTM (Biometra,

Goettingen, Germany). Amplification was detected by ethidium bromide staining after electrophoresis migration in agarose gel (1.5 or 2%, with equipment from Bio-Rad, Hercules, CA).

Quantitative real-time RT-PCR amplifications were performed with a Rotorgene 3000 thermal cycler (Corbett Life Science, Sydney, Australia) and revealed with Quantitect™ SYBR Green PCR (Qiagen). Real-time, quantitative RT-PCR was carried out in reactions containing 0.5 μM of each IDO, IDO2 or 18S primers, 10 μl of 2X SYBR Green mix (Qiagen), 4 μl of cDNA (1/20 dilution), and water. The cycling conditions were 10 min at 95°C, then 35 cycles of 30 s at 94°C, 45 s at 60°C, 30 s at 72°C for 18S, and 40 cycles of 30 s at 94°C, 60 s at 55°C, 30 s at 72°C for IDO, and a final melting curve from 72 to 95°C. Fluorescence was measured at the end of each extension step. The gain was adjusted automatically on the first tube at the end of the first cycle (channel FAM/Sybr, 470-nm source, 510-nm detector, readings between 2FI and 5FI). The absence of primer dimers and the specificity of the PCR products were documented by melting curve analysis and electrophoresis migration in 2% agarose gel stained with ethidium bromide. IDO expression was quantified relative to the housekeeping gene 18S, according to Pfaffl's method (258).

Western blotting

Protein extracts were prepared from the above-mentioned pelleted cells, measured, resolved by 10% SDS-PAGE, and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Immun-Blot™, Bio-Rad) (257). The membranes were incubated with sheep polyclonal anti-human IDO Ab 1/100 (Hycult Biotechnology, Uden, The Netherlands) or mouse β-actin-specific Ab (1/10,000, Chemicon, Temecula, CA) for 1 h, washed and re-incubated for 1 h with secondary peroxidase-conjugated Abs (1:20,000 rabbit anti-sheep or 1:40,000 goat anti-mouse, both from Chemicon), before detection (257).

Immunofluorescence microscopy

B lymphocytes were isolated from healthy donor PBMC, as outlined above. IDO expression was induced in B cells and control U937 cells respectively by IFN- γ /CD40L and IFN- γ /LPS stimulation. After 24 h, the cells were harvested, washed and re-suspended in RPMI/50% FBS for cytopspin. For each condition, 5×10^5 cells were cytopspun on glass slides for 4 min at 27 x g for B cells, or at 40 x g for control U937 cells, in a Statspin Cytofuge 2 (IRIS International Inc., Chatsworth, CA). The cells were then fixed and permeabilized in methanol/50% acetone, dried, and rehydrated in phosphate buffered saline (PBS). Slides were blocked in PBS/5% FBS for 1 h. Dual-color immunofluorescence stainings were performed in a humidified chamber by sequential 1-h incubations with each Ab. For IDO staining, a polyclonal sheep anti-human IDO (1/200, Hycult Biotechnology) primary Ab was followed by a rabbit anti-sheep Ab coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC, 1/500, Millipore, Temecula, CA). CD20 expression was revealed by a mouse anti-human CD20 primary Ab (1/200, Dako, Carpinteria, CA) and Rhodamine-conjugated donkey anti-mouse Ab (1/500, Bio/Can Scientific, Mississauga, Ontario, Canada). The slides were washed with PBS after each staining, rinsed in distilled water, dried and mounted with ProLong® Gold antifade reagent with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Molecular Probes, Invitrogen), allowing nuclei visualization, followed by overnight drying at 4°C. They were observed under a Nikon Eclipse E600 fluorescence microscope equipped with a CoolSNAP HQ² camera (Photometrics, Tucson, AZ), using a 40x objective. Images were processed by NIS Element AR 3.0 software (Nikon Instruments, Inc., Melville, NY).

IDO activity assay

To assess IDO activity, B lymphocytes were plated at 5×10^5 cells/well in 96-well plates and stimulated with 1,000 U/ml IFN- γ and 500 ng/ml CD40L. Approximately 24 h after activation, B cells and control cells were washed and re-suspended in Hank's balanced

salt solution (HBSS) containing 50 μ M L-tryptophan. They were then incubated for an additional 4 h, followed by harvesting of the supernatant and removal of cell debris by centrifugation. Tryptophan and kynurenine quantification was undertaken by high-performance liquid chromatography (HPLC) on a Hewlett Packard HP1050 equipped with a DAD detector (Agilent), and analyzed with ChemStation software. For each quantification, 25 μ l of sample were injected into an analytic Vydac 218TP C18 column and eluted with KH_2PO_4 buffer (0.01 M KH_2PO_4 and 0.15 mM EDTA, pH 5.0) containing 5% methanol HPLC grade at a flow rate of 1.0 ml/min. The spectrophotometer was set at 254 nm to measure both kynurenine and tryptophan elution. Retention time was determined previously with standard solutions of kynurenine (6.6 min) and tryptophan (11.2 min). IDO activity was expressed as the micromolar concentration of kynurenine in samples, converted from tryptophan by IDO.

Results

IDO mRNA expression in B lymphocytes in response to exogenous cytokines

To determine whether stimuli from activated T cells could up-regulate IDO expression in B lymphocytes, we treated isolated human B cells with either soluble trimeric CD40L or IFN- γ or both. We evaluated IDO expression in B lymphocytes from multiple donors, and observed that single or combined treatment induced IDO, as detected by standard RT-PCR (Figure 1^{m2}A). Quantitative PCR allowed us to determine that IDO mRNA was expressed at comparable levels in CD40L- and IFN- γ -activated B cells (Figure 1^{m2}B). Combination of both factors increased the expression level by more than 5-fold in comparison to single treatment. We next investigated whether recently-identified IDO2 was also induced in response to the previous stimuli. IDO2 mRNA expression by activated B lymphocytes was evaluated by standard RT-PCR, and compared to IDO (Figure 1^{m2}C). IDO2 was found in control DC stimulated with CD40L/LPS/IFN- γ . However, it was barely detectable in IFN- γ -treated DC and LPS/IFN- γ -treated U937 cells in contrast to IDO1 expression. In B lymphocytes, IDO2 mRNA was induced by the same stimulations as for IDO.

Up-regulation of IDO protein expression in B lymphocytes

We then sought to determine whether IDO protein expression in B cells was consistent with the transcriptional induction observed. Considering that the strongest IDO mRNA expression was seen after stimulation with both CD40L and IFN- γ , this combination was adopted to activate isolated B lymphocytes under different incubation times. Western blotting revealed that IDO protein was expressed in human B lymphocytes in response to CD40L and IFN- γ . Maximal protein expression was apparent between 24 and 48 h, depending on the donor (Figure 2^{m2}A). This time point was thus retained to

further investigate IDO protein induction by other stimuli. Figure 2B^{m2} illustrates that IDO protein was up-regulated by IFN- γ alone or in combination with CD40L, whereas CD40L with IL-4 had no inducing effect on IDO expression. To study IDO expression in B cells in a more physiological context, supernatants from anti-CD3-pre-activated or isotype-matched control-stimulated CD4⁺ T lymphocytes were added to B lymphocytes for 24 h. IDO protein was detected on exposure to CD4⁺-activated T cell supernatant, whereas no expression was induced by control supernatant (Supplemental Figure 1^{m2}). However, IDO protein induction was weaker in response to this activated T cell supernatant compared to stimulation with exogenous CD40L/IFN- γ , indicating that soluble factors produced by activated T cells were not optimal, and the signal provided by CD40L must be important.

To exclude the possibility that detected IDO resulted from contaminating cells after B lymphocyte magnetic selection, we proceeded to double immunofluorescence staining to confirm that IDO originated from B cells. Intracellular IDO and the surface marker CD20, specific to B lymphocytes, were stained with primary Abs and revealed with fluorescence-conjugated secondary Abs. As depicted in Figure 3^{m2}A (upper left panel), no IDO signal was apparent in untreated CD20⁺ B cells, whereas weak expression was observed in IFN- γ and CD40L + IL-4-stimulated B lymphocytes (Figure 3^{m2}, upper middle panels). However, elevated IDO staining was detected in CD20-expressing cells treated with a combination of CD40L and IFN- γ (Figure 3^{m2}A, right panel). These findings reflect the results obtained by quantitative PCR, and confirm that IDO expression, measured by Western blotting, did not originate from non-B cells.

IDO produced by B cells is functionally inactive

To examine whether the IDO produced by B lymphocytes was functionally active, we assessed tryptophan consumption and kynurenine production by untreated or CD40L/IFN- γ -stimulated B cells. After 4 h in tryptophan-containing HBSS medium, IFN-

γ -treated KTCL cells, serving as positive control, degraded more than 70% of the initial tryptophan amount (Figure 4^{m2}). This observation was supported by a corresponding increase in kynurenine concentration. However, no tryptophan disappearance or kynurenine production was detected in untreated or CD40L/IFN- γ -treated B lymphocyte supernatants (Figure 4^{m2}). This absence of tryptophan degradation indicates that IDO expression by stimulated B lymphocytes is not functionally active, and may have no biological effect on the immune system.

Discussion

Cellular cross-talk between B and T lymphocytes is central to humoral responses. After antigen recognition by B cell receptors, followed by processing and presentation of this antigen, B lymphocytes must receive signals from CD4⁺ helper T cells specific to the same antigen to start antibody production. These include contact-mediated signals through MHC/TCR, B7/CD28 and CD40/CD40L, but also cytokines secreted by CD4⁺ T cells (reviewed in (289)). It has been known for over a decade that antigen-presenting cells (APC), such as macrophages and DC, can produce IDO, after interaction with T cells, and mediate inhibition of T cell proliferation. Despite the fact that human CD40-activated B cells have previously been shown to be effective APC (290), no such IDO activity has been investigated in these cells. Kai and colleagues (291) examined IDO gene expression in different cellular subsets from human PBMC. Though IDO mRNA has been found in isolated B lymphocytes, the poor purity of this cellular population rendered these data questionable. In addition, neither protein expression nor tryptophan degradation was evaluated. A recent report demonstrated that upon stimulation with CTLA4-Ig, IDO1 and IDO2 mRNA levels increased in murine PDCA-expressing B lymphocytes. However, it is still unknown whether this cellular subset expresses IDO at the protein level and in a functional state. In the present study, we noted IDO and IDO2 mRNA up-regulation in human B lymphocytes in response to stimuli from activated T lymphocytes. While this up-regulation translated into protein expression, tryptophan was not degraded by these IDO-expressing cells.

To investigate whether IDO could be a counter-regulatory mechanism deployed by B lymphocytes, we sought to mimic possible interaction with activated T cells. We thus tested the previously-identified IDO inducers CD40L and IFN- γ (192). However, by combining CD40L with IL-4, IDO expression could not be detected from human B lymphocytes. This is not surprising, considering the reported effects of the Th2 cytokine

IL-4 on IDO expression in other cell types. It has indeed been demonstrated that IL-4 has an inhibitory impact on IDO expression and activity in human monocytes (214). Of course, we cannot exclude the possibility that stimuli other than those tested in this study may induce active IDO enzyme in B lymphocytes. As an example, CpG oligodeoxynucleotides are known to elicit IDO expression in DC (292), and, when administered systemically as adjuvant therapy in a murine model, they induce IDO expression in the spleen, leading to T lymphocyte suppression (293). TLR9, which recognizes CpG motifs, is constitutively expressed by B lymphocytes. It would thus be interesting to explore the effects of such a stimulus on IDO induction in B lymphocytes.

In this study, we report that IDO, expressed by B lymphocytes in response to different T cell stimuli, does not translate into tryptophan degradation. In mice, the situation has been encountered in other cell types, such as DC. IDO expression has been observed in 2 different DC subsets, namely $CD8\alpha^+$ and $CD8\alpha^-$. However, no kynurenine accumulation had been quantified from the latter subset, indicating an inactive state of IDO in the alpha-negative DC subset (294). More recently, IDO1 and IDO2 expression was detected in monocyte-derived DC, but enzymatic activity was only exerted by IDO, as demonstrated by siRNA and the use of 2 different 1MT isomers specifically inhibiting IDO or IDO2 (236). These investigations highlight the fact that when expressed, IDO is not necessarily in an active form. This finding supports our results showing that neither of the 2 IDO genes was expressed in a functional state in human B cells.

In conclusion, despite the observation that the tryptophan-catabolizing enzyme IDO is induced by IFN- γ and CD40L in human B lymphocytes, it may not have a biological impact in limiting immune responses. Further studies are needed to determine whether other factors could prompt functional IDO in B cells.

Acknowledgments

Healthy donor samples were provided by Dr. Jean-Pierre Routy and Dr. Mohamed-Rachid Boulassel from the Division of Hematology and Immunodeficiency Service of Royal Victoria Hospital. The editorial assistance of Ovid Da Silva and logistical support from Bureau d'aide à la recherche (Research Support Office), CRCHUM, is acknowledged. RL was supported by a scholarship from Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). This work was made possible by operating grants from the Cancer Research Society, the Natural Sciences and Engineering Research Council, and the Canadian Institutes of Health Research (MOP-89727).

Abbreviations

1MT: 1-methyl-tryptophan
Ab: antibody
APC: antigen-presenting cells
CD40L: CD40-ligand
CTLA4-Ig: cytotoxic T lymphocyte antigen-4-immunoglobulin
DAPI: 4',6'-diamidino-2-phenylindole
DC: dendritic cells
FBS: fetal bovine serum
FITC: fluorescein isothiocyanate
HBSS: Hank's balanced salt solution
HPLC: high-performance liquid chromatography
IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN- γ : interferon-gamma
IL: interleukin
LPS: lipopolysaccharide
mRNA: messenger ribonucleic acid
MHC: major histocompatibility complex
PBMC: peripheral blood mononuclear cells
PBS: phosphate buffered saline
RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction
TCR: T cell receptor
Tregs: regulatory T lymphocytes

Figures

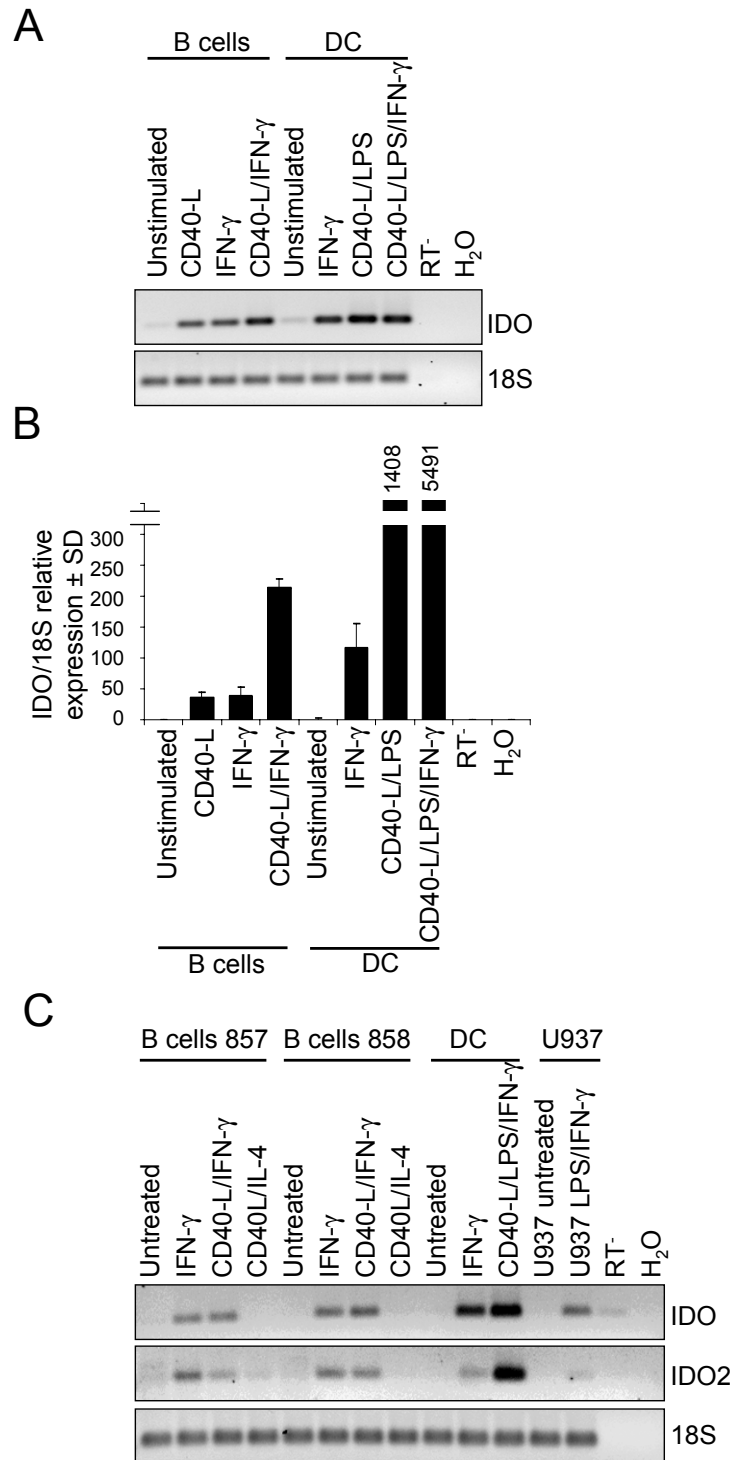


Figure 1^{m2} IDO mRNA induction in human B lymphocytes

B cells were isolated from healthy donor PBMC and treated with either IFN- γ (1,000 U/ml) or CD40L (500 ng/ml), alone or in combination, for 24 h. RNA was extracted, cDNA was prepared, and IDO and 18S gene expression was analyzed by (A) standard or (B) quantitative PCR. (B) Quantification was relative to untreated control B lymphocytes, and IDO expression was normalized with 18S RNA, according to Pfaffl's method (23). (C) IDO and IDO2 expression was assessed by standard PCR for 2 healthy donors.

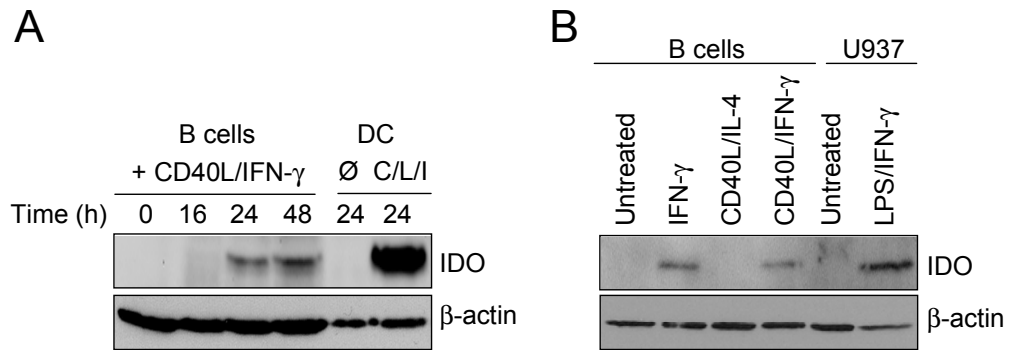


Figure 2^{m2} IDO protein expression in B lymphocytes

(A) Isolated B lymphocytes were treated with CD40L + IFN- γ for the indicated incubation times or (B) either left untreated or treated with IFN- γ alone, IFN- γ + CD40L or IL-4 + CD40L, for 24 h. (A-B) Cells were harvested, proteins were extracted, and IDO and β -actin expression levels were measured by Western blotting.

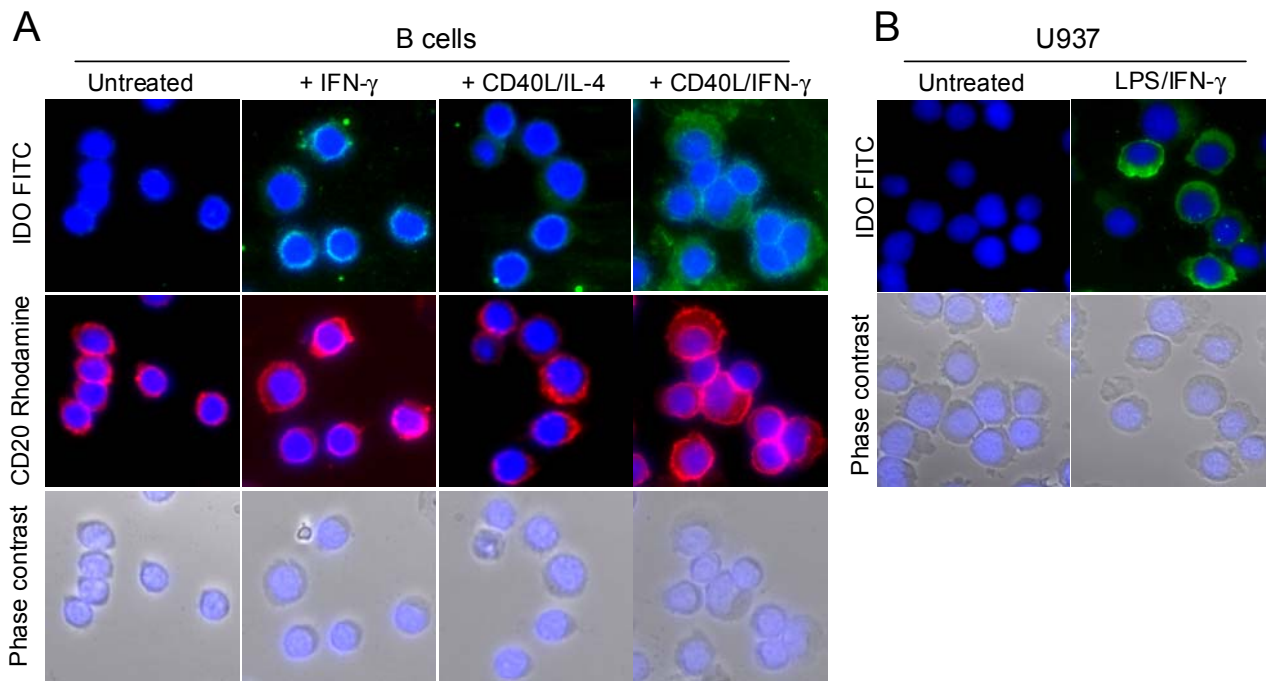


Figure 3^{m2} IDO and CD20 co-expression

(A) Healthy donor B lymphocytes were untreated or stimulated with IFN- γ , IL-4 + CD40L, or IFN- γ + CD40L, for 24 h. Dual-color immunofluorescence staining was performed with primary Abs specific to IDO and CD20, and with secondary Abs coupled respectively with FITC and Rhodamine. Nuclei were stained with DAPI. The results obtained with 1 representative donor are illustrated. (B) U937 cells untreated or treated with LPS/IFN- γ were considered as positive controls for IDO staining.

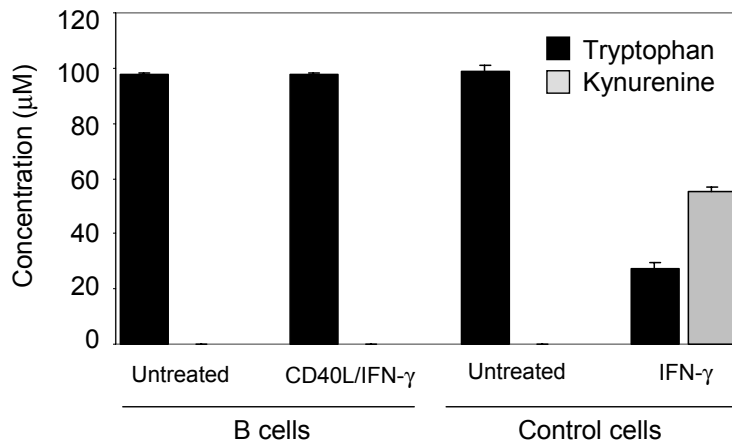
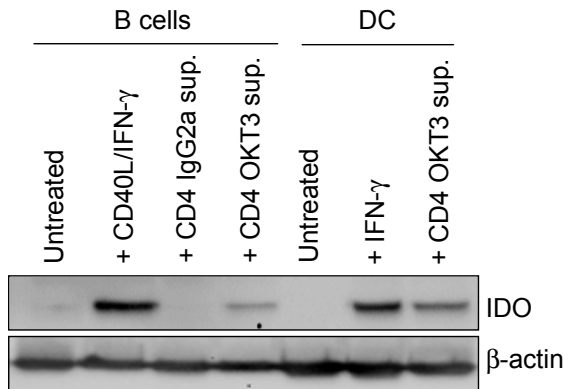


Figure 4^{m2} Functional assessment of IDO produced by B cells

B lymphocytes were isolated from healthy donor PBMC and were either untreated or treated with IFN- γ + CD40L for 24 h to induce IDO expression. The KTCL cell line used as control was treated with IFN- γ for 24 h to stimulate IDO expression. The cells were incubated for 4 h in serum-free HBSS medium, and 50 μ M L-tryptophan. Levels of tryptophan and its degradation product kynurenine were quantified by HPLC. One representative experiment is shown (n=2).



Supplemental figure 1^{m2} IDO protein induction in activated T cell supernatant

Isolated B lymphocytes were left untreated or treated with CD40L + IFN- γ or with supernatant from anti-CD3- or isotype-matched control-activated CD4⁺ T cells, for 24 h. The cells were harvested, proteins were extracted, and IDO and β -actin expression levels were measured by Western blotting.

SECTION 5. DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

L'immunothérapie du cancer représente une alternative thérapeutique prometteuse ayant eu du succès chez une certaine proportion de patients pour lesquels les traitements standards avaient échoués. Les essais cliniques réalisés à ce jour ont permis de démontrer que l'immunothérapie peut non seulement entraîner la régression de tumeurs primaires, mais aussi la diminution de la taille et même la disparition complète de métastases à distance dans certains cas. Les réponses objectives constatées à la suite de traitements immunothérapeutiques, qu'elles soient partielles ou complètes, mettent en lumière tout le potentiel qui émerge de cette approche.

On ne peut cependant passer sous silence une proportion importante de patients chez lesquels aucune réponse ne survient ou, qui après avoir bénéficié d'une réponse transitoire, sont victimes d'une récurrence. Il est important de spécifier que les essais d'immunothérapie sont généralement appliqués à des patients pour lesquels le cancer est à un stade très avancé ou métastatique, et résistant aux thérapies standards. Il est donc raisonnable de croire que son taux de succès serait encore plus élevé en ciblant des patients qui en sont à un stade précoce de la maladie. Cependant, plusieurs défis restent encore à être relevés afin d'améliorer l'efficacité de l'immunothérapie. Le mélanome a été le type de cancer qui a été l'objet principal d'une grande proportion des études cliniques réalisées. Les taux de réponses remarquables observés pour le mélanome (83) se doivent d'être étendus à d'autres types de cancers. De plus, il est souhaitable d'empêcher que des récurrences ne surviennent. En ce sens, il apparaît important d'augmenter la fenêtre de temps pendant laquelle la réponse anti-tumorale persiste afin que les bénéfices engendrés par l'immunothérapie soient durables. Ainsi, dans la perspective de maximiser l'efficacité de l'immunothérapie, il est essentiel qu'en plus de la stimulation du système immunitaire, des mesures soient déployées afin de surpasser les conditions de tolérance immunitaires en

place dans l'environnement tumoral, en intégrant l'inhibition des suppresseurs aux stratégies immunothérapeutiques.

Plusieurs mécanismes d'évasion tumorale responsables de la tolérance immunitaire ont été identifiés à ce jour. Afin de bien les cibler, il est primordial de déterminer l'ampleur relative de ces mécanismes selon les différents types de cancers. De plus, il est important de comprendre ce qui régule leur émergence dans le microenvironnement tumoral afin d'éviter que ces éléments soient favorisés par une immunisation visant à éradiquer la tumeur, ou afin de connaître les conditions permettant d'inhiber l'action de ces mécanismes d'évasion. Par ailleurs, les modèles murins sont une source d'information essentielle à la compréhension de la régulation et du mode d'action de ces mécanismes. Il faut cependant rester critique à l'égard des résultats qui en découlent puisque les processus oncogéniques peuvent être distincts entre l'humain et la souris (revu dans (295)). Pour cette raison, l'étude de la pathologie humaine est d'une importance capitale.

Le projet de doctorat dont les résultats ont été présentés dans cet ouvrage visait à étudier chez l'humain la régulation de l'IDO, une enzyme associée à l'immunosuppression, entre autre dans le contexte de la réponse anti-tumorale. Plus spécifiquement, les objectifs étaient de déterminer si l'expression de l'IDO par les cellules tumorales humaines peut être une conséquence de leur interaction avec des cellules immunitaires, et via quels facteurs cette régulation s'opère. De plus, nos travaux visaient à étudier les voies de signalisation qui gouvernent la régulation de l'expression de l'IDO dans les cellules tumorales humaines, en réponse, entre autres, aux facteurs identifiées dans le premier objectif. Enfin, nous voulions évaluer l'expression potentielle de l'IDO dans les lymphocytes B humain, une population de cellules immunitaires fréquemment retrouvées dans les tumeurs et qui, tout comme les DC, interagit étroitement avec les lymphocytes T. La complétion des objectifs, la critique des résultats et les perspectives à envisager suite à nos observations seront discutés pour chacune des trois parties de ce projet.

5.1 L'expression de l'IDO dans les cellules tumorales humaines est régulée par la balance entre les cytokines Th1 et Th2 présente dans l'environnement tumoral

5.1.1 Objectifs accomplis et critique des résultats

L'expression de l'IDO étant répandue à plusieurs types de cancers et étant présente dans une proportion appréciable d'échantillons cliniques, nous avons évalué les facteurs responsables de sa régulation dans les cellules tumorales humaines. Ayant observé une prédominance de lymphocytes T activés et sécrétant de l'IFN- γ infiltrant nos deux modèles de cancer à l'étude, soit ceux du sein et du rein, et considérant le rôle joué par l'IFN- γ sur l'expression de l'IDO, nous avons étudié la capacité des TIL à stimuler la production d'IDO par les cellules tumorales. Lorsque mises en présence de TIL, nous avons constaté l'induction de l'IDO dans les lignées cellulaires tumorales. Afin de caractériser davantage cette observation, nous avons remplacé les TIL de notre système par des lymphocytes T activés. Ceci nous a permis de déterminer que les cellules tumorales acquièrent l'expression de l'IDO par un mécanisme indépendant du contact cellulaire avec les lymphocytes T activés. De plus, parmi les facteurs solubles impliqués, l'IFN- γ qui est une cytokine Th1 prototypique joue un rôle majeur. Enfin, cette induction est antagonisée par l'IL-13, une cytokine de type Th2.

Il reste à identifier d'autres cytokines qui coopèrent avec celles déjà décrites pour réguler l'expression de l'IDO. En effet, le blocage de l'IFN- γ dans notre système avec une quantité saturante d'un anticorps neutralisant n'a pas permis l'inhibition complète de l'induction de l'IDO dans les cellules tumorales par les lymphocytes T activés. Ceci suggère que d'autres facteurs solubles seraient impliqués. Malgré cet élément manquant, selon les résultats que nous avons présentés, la balance des cytokines présentes dans le microenvironnement tumoral s'avère déterminante dans le processus de régulation de l'expression de l'IDO par les cellules tumorales.

Th1 versus Th2?

Les observations faites dans le cadre de cette étude pourraient faire miroiter l'idée qu'une réponse immunitaire anti-tumorale de type Th2 serait plus souhaitable qu'une réponse Th1, si on considère le rôle immunosuppresseur de l'IDO. À l'inverse, plusieurs exemples dans la littérature démontrent que la réponse de type Th1 est supérieure à celle de type Th2 pour permettre une réponse anti-tumorale (18,267). Bien que ces idées puissent sembler contradictoires, certaines explications permettent de les réconcilier.

1) Le premier concept permettant de faire la lumière sur cette contradiction fait référence au caractère progressif des tumeurs, tel qu'abordé dans la discussion du manuscrit présenté dans la section 2. Il est en effet possible qu'au moment de sa résection, une tumeur dans laquelle s'est installée une réponse de type Th1 soit associée à un bon pronostic. Ceci a d'ailleurs été rapporté dans la littérature, suite à l'évaluation des signatures géniques des tumeurs, entre autre pour le cancer du sein (296). Cependant, dans une tumeur en pleine progression, un environnement Th1 peut mener à l'expression de l'IDO. Considérant le fait que cette molécule immunosuppressive induise préférentiellement l'apoptose des lymphocytes Th1 par rapport aux Th2 (254), son expression par les cellules tumorales pourrait polariser la réponse anti-tumorale vers un profil Th2. Il est donc possible qu'un pronostic favorable à un stade donné se détériore au fil de la progression tumorale.

2) Bien que les lymphocytes T auxiliaires jouent un rôle majeur dans l'immunité anti-tumorale, la nature de leur réponse est d'une importance majeure, tant chez l'humain que chez la souris. Dans des modèles de souris porteuses de tumeur, il a été établi qu'une réponse anti-tumorale de type Th1 prédominante est associée à une résistance de l'hôte à l'implantation de tumeurs, alors qu'une réponse mixte Th1/Th2 ou entièrement Th2 corrèle avec une progression tumorale (267). Chez l'humain, une infiltration ayant un profil Th1 corrèle fréquemment avec un pronostic plus favorable (18). De plus, les réponses de type Th1 sont liées à une meilleure immunité anti-tumorale. Nos résultats suggèrent qu'une cytokine de type Th2 régule négativement l'expression de l'IDO dans les cellules

cancéreuses. Cet effet n'est peut-être pas suffisant pour contre balancer les effets négatifs associés à l'absence d'une réponse anti-tumorale adéquate. En d'autres termes, l'inhibition de l'IDO à elle seule n'apparaît pas efficace pour complètement éradiquer les tumeurs établies ou empêcher leur apparition, selon ce qui a pu être observé dans différents modèles murins (182,235). Elle doit être accompagnée d'une stimulation de la réponse anti-tumorale ou d'un autre traitement anticancéreux, tel une chimiothérapie.

3) En plus de son effet observé sur l'expression de l'IDO, il est impératif de rappeler que l'IL-13 puisse aussi avoir des effets sur l'expression d'autres gènes. De plus, son action ne se limite pas aux cellules tumorales elles-mêmes, mais peut intervenir sur d'autres populations cellulaires présentes dans l'environnement tumoral. Il faut donc se questionner à savoir si la présence de l'IL-13 est réellement désirable dans l'environnement tumoral, malgré le fait que l'IL-13 puisse avoir un effet antagoniste sur l'IFN- γ dans l'induction de l'IDO. Des études suggèrent en effet que sa présence pourrait avoir d'autres effets sur la réponse anti-tumorale, ceux-ci beaucoup moins désirables, tel qu'en témoignent les exemples qui suivent.

De tels effets ont été observés dans un modèle murin alors qu'un sous-type de monocytes inflammatoires CD11b⁺ exprimant la chaîne alpha du récepteur à l'IL-4 (IL-4R α) à leur surface cellulaire a été isolé chez des souris porteuses de tumeurs (297). Ces MDSC sont stimulées par l'IFN- γ relâché par les lymphocytes T activés par un antigène. Ces MDSC se mettent alors à produire de l'IFN- γ et de l'IL-13, et sont capables d'intégrer ces signaux autocrines provenant de cytokines antagonistes grâce à leur expression de l'IL-4R α , une des sous-unités du récepteur à l'IL-13. Ces signaux activent un programme menant à l'inhibition des lymphocytes T, qui est en fait dépendant de l'augmentation de deux enzymes responsables du métabolisme de l'arginine, soit ARG1 et NOS2 (Figure 15). L'activité de ces deux enzymes mène non seulement à l'immunosuppression, mais favorise aussi la croissance des cellules tumorales. Ces observations ayant été rapportées chez la souris, il reste encore à déterminer si cette population de MDSC répondant à l'IL-13 est

aussi retrouvée chez l'humain. Si tel est le cas, les effets bénéfiques engendrés par l'IL-13 en diminuant l'expression de l'IDO pourraient bien être contrebalancés par les effets négatifs amenés par une augmentation du métabolisme de l'arginine par l'activité de l'arginase et de NOS.

Par ailleurs, une étude s'étant penchée sur la caractérisation de cellules immunitaires infiltrant les tumeurs de cancer du sein a rapporté la production à la fois de cytokines de type Th1 et Th2 par les lymphocytes T CD4⁺ infiltrant les tumeurs (265). En effet, une sécrétion plus abondante d'IL-2, d'IFN- γ , d'IL-4 et d'IL-13 distinguait les CD4⁺ intra-tumoraux des CD4⁺ du tissu environnant la tumeur. Un fait d'autant plus intéressant à préciser constitue l'identification de lymphocytes T CD4⁺ produisant à la fois de l'IFN- γ et de l'IL-13 dans une majorité des échantillons cliniques analysés. Grâce à l'implantation de cellules tumorales humaines de cancer du sein à un modèle murin humanisé, Asford et collègues (265) ont été en mesure de constater que les DC présentes au site tumoral acquièrent la capacité de faire produire de l'IL-13 aux lymphocytes T CD4⁺ avec lesquels elles interagissent. Les cellules cancéreuses intègrent ces signaux et répondent par une progression tumorale amplifiée. Bien que le mécanisme d'action de l'IL-13 dans ce processus d'accélération du développement tumoral demeure inconnu, le rôle de l'IL-13 a clairement été démontré par l'utilisation d'un anticorps bloquant l'IL-13 ayant permis de renverser la croissance des tumeurs. La lignée cellulaire de cancer du sein utilisée pour l'implantation de tumeurs dans les souris humanisées de cette étude diffère de celle nous ayant permis de démontrer l'effet antagoniste de l'IL-13 sur l'induction de l'IDO dépendante de l'IFN- γ . Il serait donc à propos de vérifier si nos observations quant à la régulation de l'IDO peuvent être reproduites dans la lignée cellulaire utilisée par Asford et collègues (265) dans leur étude. Si tel est le cas, il deviendrait donc évident que la régulation négative de l'expression de l'IDO par l'IL-13 ne suffise pas à faire de cette cytokine un atout dans la réponse immunitaire anti-tumorale.

D'après ces études, nous croyons que la stimulation d'une réponse anti-tumorale de type Th1, combinée avec l'inhibition de l'expression ou de l'activité de l'IDO pour surpasser l'immunosuppression, serait une stratégie plus efficace pour l'élimination des tumeurs, plutôt que des immunisations qui stimuleraient une réponse de polarité Th2.

5.1.2 Perspectives et conclusions

En lien avec nos observations et celles décrites par d'autres études, d'éventuels travaux devraient permettre de déterminer si l'IL-13 agit globalement de façon à contribuer ou à détériorer la réponse anti-tumorale. Ainsi, la présence d'IL-13 dans l'environnement tumoral ou encore l'expression du récepteur de l'IL-13 à surface des cellules tumorales devrait être évaluée dans un nombre appréciable d'échantillons cliniques de cancer du sein, mais aussi d'autres types de cancers. Une telle analyse combinée à l'évaluation de différents paramètres cliniques permettrait d'établir si un lien existe entre le signalement cellulaire initié par l'IL-13 et le pronostic ou la survie des patients. Parallèlement, une quantification de l'IFN- γ ou de ses récepteurs dans le tissu tumoral serait utile pour déterminer si l'abondance d'une cytokine par rapport à l'autre a une plus grande signification biologique que la mesure de cytokines individuelles. Ainsi nous serions en mesure de dépendre la contribution réelle de l'IL-13 dans le processus oncogénique.

D'autre part, il serait nécessaire d'entreprendre des études fonctionnelles pour déterminer l'activité de l'IDO retrouvée dans l'environnement tumoral. Jusqu'à ce jour, les études réalisées ont permis d'associer de façon générale la présence de l'IDO dans les tumeurs à un pronostic défavorable pour les patients, et à une survie réduite. Cependant, il n'est pas clair si ces corrélations sont une conséquence directe de l'activité de l'IDO, ou plutôt d'autres facteurs dans l'environnement tumoral dont la présence est dépendante des mêmes facteurs stimulant la production de l'IDO. La culture de fragments de tumeurs dans un milieu contenant seulement du tryptophane serait tout indiquée pour mettre en évidence

une dégradation potentielle de cet acide aminé par l'IDO endogène présent dans ces tissus. Il est possible qu'en condition où l'oxygène est rare, l'activité enzymatique de l'IDO soit diminuée ou absente. Il a été démontré qu'en présence d'une faible concentration d'oxygène, la stimulation des lignées cellulaires tumorales avec de l'IFN- γ entraîne une moins forte inhibition de la prolifération des cellules due au métabolisme du tryptophane (180). Ainsi, lorsqu'exprimée dans des tumeurs hypoxiques, ce qui peut être le cas pour le cancer du rein, l'IDO pourrait être peu ou pas fonctionnelle, et sa présence ne serait donc pas nécessairement à la source de l'immunosuppression qui survient dans ces cancers.

En plus du statut fonctionnel de l'IDO, l'expression et l'activité de l'IDO2 dans les échantillons cliniques seraient à considérer dans les analyses futures. Puisque l'identification de cette deuxième enzyme analogue à l'IDO est très récente, son rôle dans la progression tumorale n'a pas été évalué. L'importance d'inhiber cette enzyme dans le contexte d'un traitement anti-tumoral reste donc encore indéterminée.

Dans l'éventualité où l'inhibition de l'IDO serait utilisée en clinique, il s'avère important d'associer l'expression de l'IDO à un stade donné de la maladie ou à des sous-types bien précis de cancers, pour déterminer si c'est un mécanisme d'évasion dominant au moment où la thérapie serait prodiguée. Il ne serait pas indiqué d'administrer un inhibiteur de l'IDO dans les cas où l'enzyme serait absente de l'environnement tumoral.

D'ailleurs, parmi les cas où l'expression de l'IDO est absente, il serait intéressant d'évaluer si les cellules tumorales dérivées de ces spécimens sont résistantes à l'induction de l'IDO. D'après ce que nous avons observé expérimentalement et ce qui est décrit dans la littérature (179), une stimulation par l'IFN- γ ou l'IFN- α faillit à induire l'expression ou l'activité de l'IDO dans certaines lignées cellulaires tumorales. Cette résistance à l'induction de l'IDO dans ces lignées et dans une partie des échantillons cliniques est particulièrement intéressante et pourrait servir à étudier plus en profondeur les mécanismes moléculaires menant à l'expression de l'IDO par les cellules tumorales. D'ailleurs,

l'expression de l'IDO a déjà associée à une perte de Bin1, un gène suppresseur de tumeur codant pour une protéine adaptatrice impliquée dans la mobilisation cellulaire (235). Une étude a en effet fait le lien entre la délétion de Bin1 et une augmentation significative de l'induction de l'IDO dépendante de l'IFN- γ dans des cellules tumorales et des macrophages (235). Il serait donc pertinent d'analyser s'il existe un lien entre le fait que certaines lignées cellulaires tumorales n'expriment pas l'IDO et leur statut d'expression de Bin1.

5.2 Inhibition de l'expression de l'IDO dans les cellules tumorales humaines par la fludarabine

5.2.1 Objectifs accomplis et critique des résultats

Pour faire suite à notre étude des facteurs impliqués dans la régulation de l'expression de l'IDO, nous avons entrepris de caractériser les voies de signallement impliquées dans cette régulation en réponse aux stimuli que procurent les lymphocytes T activés. Puisque nous avons identifié les effets agonistes et antagonistes sur la régulation de l'expression de l'IDO par l'IFN- γ et de l'IL-13, respectivement des cytokines de type Th1 et Th2, nous voulions examiner l'activation des voies permettant le signallement en réponse à ces deux cytokines, soit celles de STAT1 et de STAT6. Nous avons d'abord déterminé si l'activité de ces deux voies était stimulée, en réponse au surnageant de lymphocytes T activés. Il s'est avéré que seule la voie de STAT1 était active dans ce modèle. Il est probable que lorsque ces deux cytokines sont rencontrées simultanément par une cellule tumorale, le signallement par l'une des voies prédomine et entrave le signallement de l'autre. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé la fludarabine, qui, selon la littérature, devait nous permettre d'inhiber STAT1. Ainsi, nous avons prétraité les cellules tumorales avec la fludarabine avant de les soumettre à différents stimuli induisant l'expression de l'IDO. Dans la section 3 de ce travail, nous avons rapporté l'action inhibitrice de la

fludarabine sur l'induction de l'IDO dans des lignées cellulaires tumorales, et ce, de façon indépendante à la voie de signallement par STAT1.

Ces résultats sont d'une part surprenants en raison de l'effet suppresseur de la fludarabine sur STAT1, précédemment documenté dans les PBMC humains (272). Dans l'étude de Frank et collègues, il a été décrit que l'expression de STAT1 est inhibée lors d'un traitement des PBMC avec la fludarabine, laquelle agit négativement sur la transcription de STAT1. Nos résultats n'ayant pas été observés dans des PBMC, mais plutôt dans des cellules tumorales, montrent quant à eux que la fludarabine inhibe l'expression de l'IDO sans toutefois affecter de façon notable le niveau d'expression de STAT1 ou son activité par une diminution de sa phosphorylation. Ces résultats sont à la fois en accord et en contradiction avec des résultats décrits récemment dans une étude portant sur les cellules épithéliales du cristallin de l'œil. Par leurs travaux, Mailankot et Nagaraj (298) ont démontré que l'IFN- γ stimule la synthèse de l'IDO dans la lignée de cellules de l'œil HLE-B3 par l'activation de la voie JAK/STAT1, ce qui culmine vers la mort de ces cellules par apoptose. Dans leur modèle, la fludarabine, au même titre que l'inhibiteur de l'IDO 1-MT, parvient à renverser ce processus en bloquant l'induction de l'IDO dépendante de l'IFN- γ . Cette étude est la première et la seule publiée à ce jour à avoir établi un lien entre l'IDO et la fludarabine, mais encore aucune association semblable n'a été faite dans la littérature concernant les cellules tumorales. Les mécanismes qui sous-tendent une telle action inhibitrice de la fludarabine sur l'expression de l'IDO et les processus cellulaires qui lui sont attribuables se doivent d'être explorés dans d'éventuelles études afin de mieux comprendre les conséquences de l'utilisation d'un tel agent.

Dans la littérature, d'autres composés ont été rapportés pour leur effet inhibiteur sur l'expression de l'IDO. De plus, les voies de signallement impliquées dans ces effets ont été étudiées et identifiées. Dans une étude récente, le curcumin, un composé naturel, a été identifié comme un inhibiteur de l'expression de l'IDO et de son activité dans des DC murines dérivées de la moelle osseuse (299). Les résultats rapportés démontrent que ce

composé agit en inhibant la phosphorylation de JAK1/JAK2 et de la PKC- δ . Ceci empêche la phosphorylation des résidus tyrosine 701 et sérine 727 de STAT1 et le signalment subséquent devant mener à l'initiation de la transcription de l'IDO. Des résultats similaires ont été obtenus avec un composé présent dans le thé vert, le (-)-Epigallocatechin-3-gallate (300). Dans notre étude, les conséquences de la fludarabine sur l'état d'activation des intermédiaires en amont de STAT1, tels JAK1/2 et PKC- δ , n'ont pas été investiguées puisque la phosphorylation de STAT1 n'est pas affectée dans nos cellules tumorales traitées à la fludarabine. Cette dernière observation fait place à deux hypothèses pavant la voie à d'éventuels travaux qui permettront certainement de poursuivre la quête déjà amorcée des intermédiaires du signalment cellulaire pouvant être touchés par la fludarabine. La première hypothèse propose que STAT1 soit activé correctement en présence de la fludarabine, mais que le signalment en aval soit bloqué et que la transcription des gènes ne soit pas initiée tel quelle le devrait. Selon notre deuxième hypothèse, il pourrait être envisagé que la fludarabine module l'expression de l'IDO en agissant sur une voie indépendante de celle de JAK-STAT1.

5.2.2 Perspectives à court et à long terme

5.2.2.1 Perspectives à court terme : suite de l'étude des intermédiaires du signalment cellulaire affectés par la fludarabine et menant à l'inhibition de l'IDO.

Selon les deux hypothèses formulées précédemment, il serait intéressant, pour la suite de cette étude, d'explorer ces deux alternatives qui pourraient expliquer l'action de la fludarabine sur l'expression de l'IDO. Dans un premier temps, il serait important d'évaluer si la diminution de l'expression protéique de l'IDO est le reflet d'une inhibition de sa transcription. Ainsi, le niveau d'ARNm de l'IDO dans les cellules prétraitées ou non à la fludarabine devra être quantifié. Si ce niveau d'expression de trouve réduit, ceci pourrait indiquer que la fludarabine agit sur STAT1 de manière à ce que son activité sur la

transcription des gènes soit altérée. Il serait alors nécessaire d'investiguer si les étapes essentielles à l'initiation de la transcription suivant la phosphorylation de STAT1 sont affectées dans notre modèle de cellules tumorales traitées à la fludarabine, comme la translocation nucléaire et la liaison aux éléments du promoteur. Pour ce faire, des extraits nucléaires préparés à partir des cellules tumorales traitées à la fludarabine avant leur stimulation pourraient servir à évaluer la présence de phospho-STAT1 au noyau, et ainsi déterminer s'il parvient à être transloqué. Dans le cas où la translocation nucléaire de STAT1 ne serait pas affectée par la fludarabine, il serait alors pertinent d'évaluer si sa capacité à se lier à des séquences présentes sur le promoteur des gènes inductibles par l'IFN- γ est diminuée. Pour ce faire, une immuno-précipitation de la chromatine pourrait être réalisée et permettrait de constater si STAT1 peut être retrouvé en association avec l'élément GAS dans l'ADN. Si tel est le cas, il serait alors important d'examiner si l'initiation de la transcription par STAT1 se produit efficacement dans les cellules traitées à la fludarabine. Pour y parvenir, le gène de la luciférase serait placé sous le contrôle du promoteur de gènes inductibles par l'IFN- γ , comme l'IRF-1, lequel nécessite la liaison de phospho-STAT1 dimérisé pour que sa transcription s'amorce, ou le promoteur de l'IDO directement. De cette façon, la transcription dépendante de STAT1 serait facilement mesurable et comparable dans des conditions où la fludarabine est présente ou non. Ces résultats pourraient permettre de s'assurer que non seulement l'expression de STAT1 n'est pas en cause dans la régulation de l'expression de l'IDO par la fludarabine, mais aussi que STAT1 est en mesure d'accomplir ses fonctions adéquatement. Ainsi, selon les résultats obtenus par de tels essais, toute implication de STAT1 dans les effets de la fludarabine pourrait être exclue. Dans l'état actuel, nos résultats ne nous permettent pas d'affirmer hors de tout doute que la voie de STAT1 n'est pas affectée dans les cellules tumorales lors d'un traitement à la fludarabine, même si son expression et son activation restent inchangées.

Dans un deuxième temps, il serait pertinent d'évaluer si des voies de signalament autres que celle de JAK-STAT qui peuvent mener à une régulation de l'expression de l'IDO, sont affectées par la fludarabine. Tel que mentionné dans la section 3, la voie de la

PI3K a été associée à la régulation de l'expression de l'IDO dans des études portant sur d'autres modèles cellulaires. En effet, dans une étude s'étant penchée sur l'induction de l'IDO dépendante de l'IFN- γ dans les cellules de la microglie murine, deux cytokines, l'IL-4 et l'IL-13, ont été identifiées comme des co-inducteurs de l'IDO. Leur action sur l'expression de l'IDO a été trouvée indépendante de la voie de STAT6, qui est classiquement impliquée dans le signalage cellulaire par ces cytokines. L'utilisation du LY-294002 et de la wortmannin, deux inhibiteurs de PI3K, ont permis de démontrer le rôle essentiel de cette kinase dans la régulation de l'expression de l'IDO. Hors, cette voie serait particulièrement intéressante à explorer dans le contexte de l'inhibition de l'expression de l'IDO dans les cellules tumorales traitées à la fludarabine. Un anticorps permettant la détection de la PI3K phosphorylée permettrait d'évaluer si une diminution de l'activation de cette voie survient lors d'un traitement des cellules tumorales avec la fludarabine.

5.2.2.2 Perspectives à moyen et long termes: évaluation de l'impact biologique de l'inhibition de l'IDO par la fludarabine dans un système *in vitro* et dans des modèles *in vivo*.

Co-culture in vitro pour déterminer les effets de la fludarabine dans un modèle antigène-spécifique

Par ailleurs, l'impact biologique de l'inhibition de l'IDO par la fludarabine devra être évalué. Ainsi, nous devons confirmer que non seulement l'expression de l'IDO est affectée par ce traitement, mais que son activité est aussi diminuée.

D'une part, ces observations pourraient être faites de façon directe en mesurant par HPLC si un prétraitement des cellules par la fludarabine influence les niveaux de tryptophane et de kynurénine présents dans le milieu de culture lorsque l'expression de l'IDO est induite par un stimulus.

L'effet de la fludarabine sur l'activité de l'IDO pourra aussi être déterminé de façon indirecte en mesurant comment elle module *in vitro* la suppression de la réponse de lymphocytes T induite par l'IDO. D'abord, un système antigène-spécifique serait utilisé afin d'induire l'expression de l'IDO dans des cellules tumorales. Ce modèle *in vitro* illustré dans la Figure 16 consiste en une co-culture composée de clones de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à l'antigène gp100 du mélanome et de la lignée cellulaire de mélanome 624.38mel exprimant l'antigène gp100. Selon ce modèle, la reconnaissance par les clones de lymphocytes T d'un peptide de gp100 présenté par les cellules tumorales déclenche l'activation des lymphocytes T. Ceux-ci sécrètent alors des cytokines, dont l'IFN- γ , qui mènent à l'expression de l'IDO par les cellules tumorales. Afin de s'en assurer, l'expression de l'IDO doit être évaluée dans ce système, puis comparée au niveau d'expression présent dans une co-culture où des lymphocytes T contrôles non-spécifiques à gp100, sont utilisés. Dans le but de bien comprendre les effets que peut avoir la fludarabine sur un tel modèle, les cellules tumorales subissent ou non un traitement à la fludarabine avant d'être mises en présence des lymphocytes T. D'une part, nous devons évaluer si un tel traitement affecte l'induction de l'IDO dans les cellules tumorales en réponse aux lymphocytes T spécifiques à l'antigène gp100. Dans le cas où la fludarabine inhiberait en effet l'activité de l'IDO, nous pourrions nous attendre à une augmentation des fonctions des lymphocytes T en présence de fludarabine, en raison d'une moins forte suppression de leurs fonctions par l'atténuation de l'activité de l'IDO. Pour s'en assurer, la sécrétion de cytokines par les clones de lymphocytes T devra être évaluée. Dans un même ordre d'idée, il serait pertinent de mesurer les effets provoqués par la fludarabine sur la lyse des cellules tumorales. Ce système est relativement complexe, puisque plusieurs paramètres peuvent être influencés par la fludarabine. Donc, dans le cas où une augmentation des fonctions des lymphocytes T spécifiques serait observée, il resterait à déterminer si celle-ci découle d'une inhibition de l'expression de l'IDO ou plutôt d'un effet direct de la fludarabine sur les clones de lymphocytes T. Pour y parvenir, les résultats obtenus devront être comparés à ceux générés dans un modèle dans lequel les cellules tumorales 624.38mel sont remplacées par des cellules qui n'expriment pas l'IDO en réponse aux clones de lymphocytes T

spécifiques. Dans un tel système contrôle, la lignée de mélanome SK23 pourrait être utilisée puisque nous avons observé que l'expression de l'IDO n'est pas inductible dans ces cellules. Comme alternative, des cellules 624.38mel dans lesquelles l'expression de l'IDO serait inhibée par des siRNA pourraient être utilisées. Enfin, si la fludarabine parvient à renverser la suppression de la réponse des lymphocytes T induite par l'expression de l'IDO par les cellules tumorales, l'ampleur de ses effets devra être comparée à celle d'un inhibiteur reconnu de l'IDO, le 1-MT.

Évaluation des effets de la fludarabine dans un modèle tumoral murin IDO⁺

Selon les résultats obtenus avec de tels essais, l'action de la fludarabine sur la réponse anti-tumorale de lymphocytes T spécifiques ainsi que sur la régression tumorale pourrait être évaluée dans un modèle *in vivo*. Pour y parvenir, différents modèles murins pourraient être utilisés, entre autre, le modèle de souris transgénique MMTV-*neu* qui développe un adénocarcinome mammaire. Dans ce modèle précis, l'implication de l'IDO dans la carcinogénèse a été démontrée, puisque l'administration d'un inhibiteur de l'IDO, le 1-MT, permet de retarder la progression tumorale (235). De plus, il a été démontré que le 1-MT coopère avec différentes chimiothérapies, principalement le paclitaxel, pour intensifier les régressions tumorales. Un tel modèle pourrait permettre de vérifier si l'administration de fludarabine entraîne des régressions tumorales, et si ces régressions sont comparables à l'administration concomitante d'un agent chimio-thérapeutique et d'un inhibiteur de l'IDO. Selon les résultats que nous avons observés *in vitro*, la fludarabine pourrait effectivement avoir deux fonctions, celle d'un agent anticancéreux et celle d'un inhibiteur de l'IDO. Ainsi, il est possible que l'administration de la fludarabine comme simple agent entraîne des résultats similaires à ceux obtenus par une combinaison chimio et inhibiteur de l'IDO.

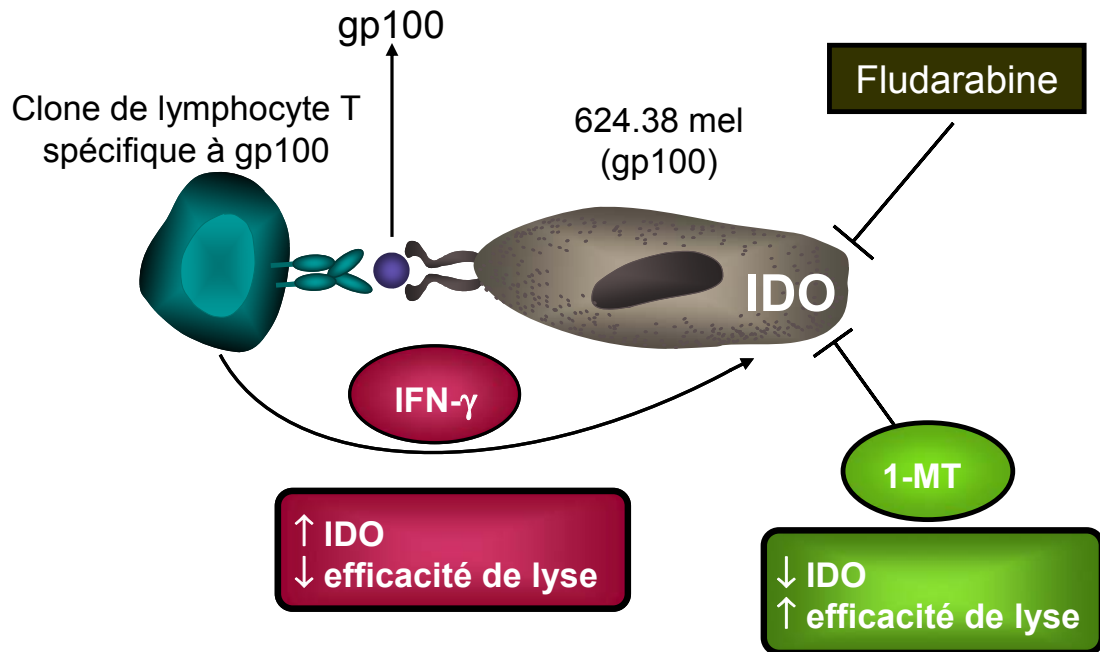


Figure 16 Modèle *in vitro* antigène-spécifique pour mesurer les effets de la fludarabine sur l'IDO

Légende: Des clones de lymphocytes T spécifiques à gp100, un AT associé au mélanome, sont co-cultivés avec des cellules de la lignée 624.38mel exprimant l'antigène gp100. Suite à la reconnaissance de l'antigène par le TCR spécifique des lymphocytes T, ces derniers sont activés et produisent des cytokines, entre autre l'IFN- γ . L'expression de l'IDO est alors induite dans les cellules tumorales et, par la diminution du tryptophane disponible et l'accumulation de métabolites du tryptophane, les fonctions et la survie des lymphocytes T sont atténués. Afin de vérifier les éventuels effets que peuvent avoir la répression de l'IDO par la fludarabine dans un tel système *in vitro*, plusieurs paramètres peuvent être mesurés. D'une part, le niveau d'expression de l'IDO dans des conditions avec ou sans fludarabine peut être évalué. Ensuite, l'activité des clones de lymphocytes T peut être déterminée par la sécrétion de cytokines. Enfin, la lyse spécifique des cellules cibles par les clones de lymphocytes T peut être mesurée.

Conséquences in vivo de l'administration de fludarabine à des patients atteints de cancer sur l'expression de l'IDO et sur le pronostic

Enfin, la capacité de la fludarabine à agir sur l'expression de l'IDO dans les cellules tumorales pourrait être évaluée directement chez l'humain. Deux différents contextes cliniques seraient particulièrement intéressants à étudier. Le premier se rapporte à l'utilisation de la fludarabine comme traitement dans les cas de leucémie, et le second est en lien avec l'administration adjuvante de la fludarabine préalable à un transfert adoptif de lymphocytes T chez des patients atteints de cancer.

L'expression de l'IDO par les cellules cancéreuses chez des patients atteints de leucémie myéloïde aigüe (AML) a été décrite dans la littérature (203). La fludarabine étant couramment utilisée en clinique pour le traitement de leucémies, des échantillons cliniques prélevés avant et après un traitement à la fludarabine pourraient permettre d'évaluer si cet agent intervient sur le niveau d'expression de l'IDO par les cellules cancéreuses humaines *in vivo*. De plus, à partir de tels prélèvements, il serait possible de déterminer si les cellules cancéreuses résiduelles après l'administration de la chimiothérapie sont IDO-négatives. D'autre part, il serait intéressant d'évaluer s'il existe une corrélation entre l'expression de l'IDO par les cellules tumorales de ces patients avant l'intervention thérapeutique et l'efficacité du traitement par la fludarabine, ou son impact sur le pronostic des patients. Basé sur nos observations en lien avec l'inhibition de l'expression de l'IDO dans les cellules tumorales par la fludarabine, et sur le fait que l'efficacité de traitements chimiothérapeutiques est augmentée lorsqu'ils sont combinés à l'administration d'un inhibiteur de l'IDO, il est à prévoir que la fludarabine ait un impact plus prononcé sur le pronostic et la survie des patients chez lesquels des cellules cancéreuses IDO⁺ sont détectées.

Nos observations relatives à l'inhibition de l'expression de l'IDO par la fludarabine pourraient aussi faire le pont avec certains essais cliniques d'immunothérapie du cancer. En effet, tel que rapporté dans la section 1.3.2 décrivant différentes stratégies

immunothérapeutiques, des avantages considérables sont amenés par l'administration d'une chimiothérapie lympho-déplétante non-myéloablativante avant un transfert adoptif de lymphocytes T. La fludarabine est d'ailleurs utilisée en combinaison avec un autre agent chimiothérapeutique, la cyclophosphamide, préalablement à un transfert adoptif chez des patients atteints du mélanome. Ces traitements combinatoires, utilisés notamment par le groupe du Dr. Rosenberg, permettent l'obtention d'un taux de réponse atteignant 51% des patients traités (83). En plus du fait que la lympho-déplétion engendrée par ces agents permette l'élimination de certaines populations immunitaires indésirables dans le contexte d'une immunothérapie anti-tumorale telles les Treg, elle est aussi associée avec une augmentation dans le sérum des patients de cytokines favorisant la prolifération homéostatiques des lymphocytes, comme l'IL-7 et l'IL-15. En plus de ces effets déjà décrits, il serait fort intéressant de déterminer si une modulation négative de l'expression de l'IDO survient suite à l'administration de la fludarabine aux patients, et participe à l'effet bénéfique de la chimiothérapie adjuvante au transfert adoptif.

5.3 Expression de l'IDO par les lymphocytes B humains

5.3.1 Objectifs accomplis et critique des résultats

Notre troisième et dernier objectif consistait à évaluer si l'IDO pouvait constituer un mécanisme de régulation de la réponse immunitaire chez les lymphocytes B humains, une population cellulaire que nous avons retrouvée parmi les cellules immunitaires infiltrant les tumeurs. Puisque les lymphocytes B interagissent étroitement avec les lymphocytes T CD4⁺ dans l'élaboration d'une réponse humorale, et qu'une induction de l'IDO est observée chez les macrophages et les DC suite à un contact avec les CD4⁺, nous avons entrepris de déterminer si des stimuli provenant de ces lymphocytes T pouvaient induire l'IDO dans les lymphocytes B. Nous avons en effet démontré que, tel qu'attendu, la stimulation des lymphocytes B par l'IFN- γ se traduit par une expression de l'ARNm de l'IDO et de l'IDO2.

En combinant l'IFN- γ avec le CD40L, l'expression de l'ARNm de l'IDO s'en trouve augmentée, et ceci se reflète aussi sur l'expression protéique de l'IDO dans les lymphocytes B, tel que démontré par immuno-buvardage de type western ainsi que par des marquages par immunofluorescence. Malgré cette expression protéique, aucune dégradation du tryptophane par ces lymphocytes B IDO⁺ n'a été détectée par HPLC. Cette absence d'activité contrevient à notre hypothèse de départ selon laquelle l'IDO serait potentiellement utilisé par les lymphocytes B comme mécanisme de régulation de la réponse immune.

Dans notre étude, l'expression protéique de l'IDO a été démontrée dans les lymphocytes B stimulés alors que celle de l'IDO2 n'a pu être évaluée, faute d'anticorps spécifique à cette protéine au moment où l'étude a été conduite. De par la détection de l'ARNm de l'IDO2 dans les extraits préparés à partir des lymphocytes B stimulés, il est probable que cette enzyme soit aussi exprimée au niveau protéique dans ces cellules. Toutefois, même si cette protéine est présente, elle est sans aucun doute exprimée sous une forme inactive puisque tout comme l'IDO, son activité engendre la dégradation du tryptophane pour le convertir entre autre en kynurénine. Hors, lors des essais destinés à mesurer par HPLC l'activité de l'IDO, aucune disparition du tryptophane, ni apparition de kynurénine n'a été détectée dans le milieu des lymphocytes B stimulés. Ces observations indiquent l'absence d'activité enzymatique autant pour l'une ou l'autre des formes de l'IDO pouvant être exprimée dans les lymphocytes B en réponse aux stimuli évalués dans cette étude. Tel qu'il a été discuté dans la section 4, il n'est pas impossible que d'autres stimuli puissent mener à l'expression de l'IDO sous une forme fonctionnelle dans les lymphocytes B. Cette possibilité reste à être explorée.

5.3.2 Perspectives et conclusions

Lors de nos analyses du phénotype des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs, nous avons constaté la présence de lymphocytes B parmi les différentes populations

cellulaires. De plus, dans certains spécimens de cancer du sein, une proportion importante de ce type cellulaire a été observée, constituant jusqu'à 30% de l'ensemble des cellules immunitaires infiltrant le tissu tumoral. Par ailleurs, dans différentes études réalisées chez la souris, il a été démontré que les lymphocytes B nuisent à la réponse immunitaire anti-tumorale puisque les souris déficientes en lymphocytes B parviennent à éliminer des tumeurs dont la croissance est incontrôlée chez les souris de type sauvage (284,285). Certaines évidences du mécanisme d'action de ces lymphocytes B ont été démontrées *in vitro*, entre autre la dépendance du CD40 exprimé par les lymphocytes B et l'implication de l'IL-10 a été rapportée. Il demeure cependant incertain si les événements se produisent de façon identique *in vivo*, mais il a été établi que l'immunosuppression attribuable aux lymphocytes B n'est pas dépendante de la spécificité antigénique. Malgré le fait que, d'après nos résultats présentés dans la section 4, l'IDO exprimé par les lymphocytes B humains ne soit pas enzymatiquement actif, il demeure possible que des stimuli autres que ceux testés dans notre étude puissent être à l'origine d'une enzyme fonctionnelle. Ainsi, les lymphocytes B retrouvés dans l'environnement tumoral sont exposés à un grand nombre de stimuli et pourraient exprimer l'IDO. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser des doubles marquages, l'un spécifique à une molécule de surface des lymphocytes B et l'autre spécifique à l'IDO, de cellules immunitaires isolées de tissus tumoraux. De plus, les lymphocytes B pourraient être spécifiquement isolés parmi les populations immunitaires infiltrant les tumeurs, et être cultivés dans un milieu contenant du L-tryptophane afin de déterminer s'ils ont la capacité de dégrader cet acide aminé.

À ce jour, aucune étude n'a permis de conclure à une activité de l'IDO dans les lymphocytes B humains ou murins, que ce soit dans un contexte tumoral ou non. Les causes de l'absence d'activité enzymatique de l'IDO ayant été détecté dans les lymphocytes B humains que nous avons stimulés *in vitro* demeurent inconnues. On peut cependant spéculer que l'inactivité biologique de l'IDO produit par les lymphocytes B puisse être le résultat d'épissages alternatifs. En effet, 5 différents isoformes de l'IDO2 ont été documentés, et l'introduction d'un codon stop causé par un décalage du cadre de lecture

dans 3 de ces isoformes est à la source d'une troncation prématurée de la protéine IDO2 (175). Un processus similaire pourrait aussi survenir pour l'IDO.

5.4 Conclusions générales

En conclusion, les objectifs de cette thèse étaient de caractériser la régulation de l'expression de l'IDO dans les cellules tumorales et dans les lymphocytes B humains. Nos résultats permettent de conclure que les cellules immunitaires infiltrant les tumeurs, plus spécifiquement les lymphocytes T activés, induisent l'expression de l'IDO dans des lignées cellulaires tumorales humaines. Cette expression est influencée par la balance des cytokines produites par les lymphocytes T activés, qui selon leur polarisation régulent positivement ou négativement l'induction de l'IDO. L'IFN- γ , une cytokine de type Th1, est principalement responsable de l'expression de l'IDO dans les cellules tumorales, alors que cette induction est antagonisée par une cytokine de type Th2, l'IL-13. Ces observations suggèrent que la nature de la réponse immunitaire promue par les différents essais cliniques d'immunothérapie peut favoriser l'émergence d'un mécanisme immuno-suppresseur et ainsi affecter l'efficacité de ces traitements.

De plus, notre étude a permis de démontrer pour la première fois l'action inhibitrice d'un agent chimiothérapeutique, la fludarabine, sur l'expression de l'IDO dans les cellules tumorales. Nos données actuelles laissent croire que ce composé n'affecte pas la voie de STAT1. Cependant, une étude plus approfondie de l'influence de la fludarabine sur cette voie ainsi que sur d'autres voies de signalisation cellulaire sera nécessaire pour comprendre le mécanisme d'action responsable de l'effet négatif de la fludarabine sur l'IDO.

Enfin, nos travaux ont mis en évidence l'expression de l'IDO dans les lymphocytes B humains en réponse à des stimuli dérivés des lymphocytes T activés. Cette expression ne se traduit cependant pas par une dégradation du tryptophane, ce qui suggère un état non fonctionnel de l'enzyme dans les lymphocytes B. La capacité de d'autres stimuli à induire l'expression de l'IDO sous une forme active dans les lymphocytes B reste à être vérifiée afin de déterminer si ce mécanisme d'immuno-suppression est exploité par cette population cellulaire pour atténuer la réponse immunitaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Marrett L, De P, Dryer D, Ellison L, Grunfeld E, Logan H, MacIntyre M, Mery L, Morrison H, Weir HK, Xie L, and Semenciw R. 2009. Statistiques canadiennes sur le cancer 2009. *Comité directeur de la Société canadienne du cancer: Statistiques canadiennes sur le cancer 2009. Toronto: Société canadienne du cancer, 2009.*
2. Statistique Canada. 2009. Le point sur la mammographie au Canada. *Rapport sur la santé 20.*
3. Hanahan D and Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
4. Roder DM. 2002. The epidemiology of gastric cancer. *Gastric. Cancer* 5 Suppl 1: 5-11.
5. Ekblom A. 1998. Risk of cancer in ulcerative colitis. *J. Gastrointest. Surg.* 2: 312-313.
6. Courtois G and Gilmore TD. 2006. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene* 25: 6831-6843.
7. Prasad S, Ravindran J, and Aggarwal BB. 2010. NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship. *Mol. Cell Biochem.* 336: 25-37.
8. Iademarco MF, McQuillan JJ, Rosen GD, and Dean DC. 1992. Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J. Biol. Chem.* 267: 16323-16329.
9. Chilov D, Kukk E, Taira S, Jeltsch M, Kaukonen J, Palotie A, Joukov V, and Alitalo K. 1997. Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. *J. Biol. Chem.* 272: 25176-25183.
10. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de RM, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, and Botstein D. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406: 747-752.
11. Stutman O. 1974. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 183: 534-536.
12. Street SE, Trapani JA, MacGregor D, and Smyth MJ. 2002. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J. Exp. Med.* 196: 129-134.

13. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, and Schreiber RD. 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410: 1107-1111.
14. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, and Trapani JA. 2000. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J. Exp. Med.* 192: 755-760.
15. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, and Moretta L. 1996. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 619-648.
16. Moretta L, Bottino C, Pende D, Vitale M, Mingari MC, and Moretta A. 2004. Different checkpoints in human NK-cell activation. *Trends Immunol.* 25: 670-676.
17. Dunn GP, Old LJ, and Schreiber RD. 2004. The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 329-360.
18. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, and Pages F. 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313: 1960-1964.
19. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, and Coukos G. 2003. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 348: 203-213.
20. Le QT, Shi G, Cao H, Nelson DW, Wang Y, Chen EY, Zhao S, Kong C, Richardson D, O'Byrne KJ, Giaccia AJ, and Koong AC. 2005. Galectin-1: a link between tumor hypoxia and tumor immune privilege. *J. Clin. Oncol.* 23: 8932-8941.
21. Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E, and Kosma VM. 1997. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J. Pathol.* 182: 318-324.
22. Kooi S, Zhang HZ, Patenia R, Edwards CL, Platsoucas CD, and Freedman RS. 1996. HLA class I expression on human ovarian carcinoma cells correlates with T-cell infiltration in vivo and T-cell expansion in vitro in low concentrations of recombinant interleukin-2. *Cell Immunol.* 174: 116-128.

23. Menard S, Tomasic G, Casalini P, Balsari A, Pilotti S, Cascinelli N, Salvadori B, Colnaghi MI, and Rilke F. 1997. Lymphoid infiltration as a prognostic variable for early-onset breast carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 3: 817-819.
24. Pawelec G, Derhovanessian E, and Larbi A. 2010. Immunosenescence and cancer. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* 75: 165-172.
25. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnjjatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen YT, Ohtani H, Old LJ, and Odunsi K. 2005. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102: 18538-18543.
26. Macchetti AH, Marana HR, Silva JS, de Andrade JM, Ribeiro-Silva A, and Bighetti S. 2006. Tumor-infiltrating CD4+ T lymphocytes in early breast cancer reflect lymph node involvement. *Clinics. (Sao Paulo)* 61: 203-208.
27. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, and June CH. 2001. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 61: 4766-4772.
28. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, and Zou W. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* 10: 942-949.
29. Tamiolakis D, Kotini A, Venizelos J, Jivannakis T, Simopoulos C, and Papadopoulos N. 2003. Prognostic significance of HLA-DR antigen in serous ovarian tumors. *Clin. Exp. Med.* 3: 113-118.
30. Oble DA, Loewe R, Yu P, and Mihm MC, Jr. 2009. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun.* 9: 3.
31. Bamias A, Tsiatas ML, Kafantari E, Liakou C, Rodolakis A, Voulgaris Z, Vlahos G, Papageorgiou T, Tsitsilonis O, Bamia C, Papatheodoridis G, Politi E, Archimandritis A, Antsaklis A, and Dimopoulos MA. 2007. Significant differences of lymphocytes isolated from ascites of patients with ovarian cancer compared to blood and tumor lymphocytes. Association of CD3+CD56+ cells with platinum resistance. *Gynecol. Oncol.* 106: 75-81.

32. Mulder WM, Koenen H, van de Muysenberg AJ, Bloemena E, Wagstaff J, and Scheper RJ. 1994. Reduced expression of distinct T-cell CD molecules by collagenase/DNase treatment. *Cancer Immunol. Immunother.* 38: 253-258.
33. Abuzakouk M, Feighery C, and O'Farrelly C. 1996. Collagenase and Dispase enzymes disrupt lymphocyte surface molecules. *J. Immunol. Methods* 194: 211-216.
34. Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, Zatloukal K, Trajanoski Z, Berger A, Fridman WH, and Galon J. 2009. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 27: 5944-5951.
35. Novellino L, Castelli C, and Parmiani G. 2005. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol. Immunother.* 54: 187-207.
36. Zinkernagel RM. 2002. On cross-priming of MHC class I-specific CTL: rule or exception? *Eur. J. Immunol.* 32: 2385-2392.
37. Chen W, Masterman KA, Basta S, Haeryfar SM, Dimopoulos N, Knowles B, Bennink JR, and Yewdell JW. 2004. Cross-priming of CD8+ T cells by viral and tumor antigens is a robust phenomenon. *Eur. J. Immunol.* 34: 194-199.
38. Germeau C, Ma W, Schiavetti F, Lurquin C, Henry E, Vigneron N, Brasseur F, Lethe B, De PE, Velu T, Boon T, and Coulie PG. 2005. High frequency of antitumor T cells in the blood of melanoma patients before and after vaccination with tumor antigens. *J. Exp. Med.* 201: 241-248.
39. Angelopoulou K, Diamandis EP, Sutherland DJ, Kellen JA, and Bunting PS. 1994. Prevalence of serum antibodies against the p53 tumor suppressor gene protein in various cancers. *Int. J. Cancer* 58: 480-487.
40. Disis ML, Pupa SM, Gralow JR, Dittadi R, Menard S, and Cheever MA. 1997. High-titer HER-2/neu protein-specific antibody can be detected in patients with early-stage breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 15: 3363-3367.
41. Tan HT, Low J, Lim SG, and Chung MC. 2009. Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection. *FEBS J.* 276: 6880-6904.
42. Houbiers JG, van der Burg SH, van de Watering LM, Tollenaar RA, Brand A, van de Velde CJ, and Melief CJ. 1995. Antibodies against p53 are associated with poor prognosis of colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 72: 637-641.
43. Schlichtholz B, Legros Y, Gillet D, Gaillard C, Marty M, Lane D, Calvo F, and Soussi T. 1992. The immune response to p53 in breast cancer patients is directed

against immunodominant epitopes unrelated to the mutational hot spot. *Cancer Res.* 52: 6380-6384.

44. Goodell V, Salazar LG, Urban N, Drescher CW, Gray H, Swensen RE, McIntosh MW, and Disis ML. 2006. Antibody immunity to the p53 oncogenic protein is a prognostic indicator in ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* 24: 762-768.
45. Murray PV, Soussi T, O'Brien ME, Smith IE, Brossault S, Norton A, Ashley S, and Tavassoli M. 2000. Serum p53 antibodies: predictors of survival in small-cell lung cancer? *Br. J. Cancer* 83: 1418-1424.
46. Abdelrazeq AS. 2007. Spontaneous regression of colorectal cancer: a review of cases from 1900 to 2005. *Int. J. Colorectal Dis.* 22: 727-736.
47. Wang E, Selleri S, Sabatino M, Monaco A, Pos Z, Worschech A, Stroncek DF, and Marincola FM. 2008. Spontaneous and treatment-induced cancer rejection in humans. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 8: 337-349.
48. Oquinena S, Guillen-Grima F, Inarrairaegui M, Zozaya JM, and Sangro B. 2009. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 21: 254-257.
49. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, and Aster J. 2009. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition, 8th ed.
50. Ross JS and Fletcher JA. 1998. The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist.* 3: 237-252.
51. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, and Norton L. 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* 344: 783-792.
52. Shojaei F, Wu X, Malik AK, Zhong C, Baldwin ME, Schanz S, Fuh G, Gerber HP, and Ferrara N. 2007. Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. *Nat. Biotechnol.* 25: 911-920.
53. Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, and Allison JP. 2001. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 565-594.
54. Fong L and Small EJ. 2008. Anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 antibody: the first in an emerging class of immunomodulatory antibodies for cancer treatment. *J. Clin. Oncol.* 26: 5275-5283.

55. Yang JC, Hughes M, Kammula U, Royal R, Sherry RM, Topalian SL, Suri KB, Levy C, Allen T, Mavroukakis S, Lowy I, White DE, and Rosenberg SA. 2007. Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis. *J. Immunother.* 30: 825-830.
56. Attia P, Phan GQ, Maker AV, Robinson MR, Quezado MM, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Kammula US, Royal RE, Restifo NP, Haworth LR, Levy C, Mavroukakis SA, Nichol G, Yellin MJ, and Rosenberg SA. 2005. Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *J. Clin. Oncol.* 23: 6043-6053.
57. Park JW, Stagg R, Lewis GD, Carter P, Maneval D, Slamon DJ, Jaffe H, and Shepard HM. 1992. Anti-p185HER2 monoclonal antibodies: biological properties and potential for immunotherapy. *Cancer Treat. Res.* 61: 193-211.
58. Smith IE. 2001. Efficacy and safety of Herceptin in women with metastatic breast cancer: results from pivotal clinical studies. *Anticancer Drugs* 12 Suppl 4: S3-10.
59. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, and Press M. 2002. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20: 719-726.
60. Kabbinavar FF, Hambleton J, Mass RD, Hurwitz HI, Bergsland E, and Sarkar S. 2005. Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 23: 3706-3712.
61. Hersh EM, O'Day SJ, Powderly J, Khan KD, Pavlick AC, Cranmer LD, Samlowski WE, Nichol GM, Yellin MJ, and Weber JS. 2010. A phase II multicenter study of ipilimumab with or without dacarbazine in chemotherapy-naive patients with advanced melanoma. *Invest New Drugs.*
62. Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH, and White DE. 1998. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat. Med.* 4: 321-327.
63. Rosenberg SA and Dudley ME. 2004. Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 14639-14645.

64. Lurquin C, Lethe B, De PE, Corbiere V, Theate I, van BN, Coulie PG, and Boon T. 2005. Contrasting frequencies of antitumor and anti-vaccine T cells in metastases of a melanoma patient vaccinated with a MAGE tumor antigen. *J. Exp. Med.* 201: 249-257.
65. Carrasco J, Van Pel A, Neyns B, Lethe B, Brasseur F, Renkvist N, Van Der Bruggen P, van BN, Paulus R, Thielemans K, Boon T, and Godelaine D. 2008. Vaccination of a melanoma patient with mature dendritic cells pulsed with MAGE-3 peptides triggers the activity of nonvaccine anti-tumor cells. *J. Immunol.* 180: 3585-3593.
66. Neller MA, Lopez JA, and Schmidt CW. 2008. Antigens for cancer immunotherapy. *Semin. Immunol.* 20: 286-295.
67. Chen L, Linsley PS, and Hellstrom KE. 1993. Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol. Today* 14: 483-486.
68. Raez LE, Cassileth PA, Schlesselman JJ, Sridhar K, Padmanabhan S, Fisher EZ, Baldie PA, and Podack ER. 2004. Allogeneic vaccination with a B7.1 HLA-A gene-modified adenocarcinoma cell line in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 22: 2800-2807.
69. Palmer K, Moore J, Everard M, Harris JD, Rodgers S, Rees RC, Murray AK, Mascari R, Kirkwood J, Riches PG, Fisher C, Thomas JM, Harries M, Johnston SR, Collins MK, and Gore ME. 1999. Gene therapy with autologous, interleukin 2-secreting tumor cells in patients with malignant melanoma. *Hum. Gene Ther.* 10: 1261-1268.
70. Sun Y, Jurgovsky K, Moller P, Alijagic S, Dorbic T, Georgieva J, Wittig B, and Schadendorf D. 1998. Vaccination with IL-12 gene-modified autologous melanoma cells: preclinical results and a first clinical phase I study. *Gene Ther.* 5: 481-490.
71. Soiffer R, Hodi FS, Haluska F, Jung K, Gillessen S, Singer S, Tanabe K, Duda R, Mentzer S, Jaklitsch M, Bueno R, Clift S, Hardy S, Neuberg D, Mulligan R, Webb I, Mihm M, and Dranoff G. 2003. Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 21: 3343-3350.
72. Hodge JW, Sabzevari H, Yafal AG, Gritz L, Lorenz MG, and Schlom J. 1999. A triad of costimulatory molecules synergize to amplify T-cell activation. *Cancer Res.* 59: 5800-5807.

73. Banchereau J and Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252.
74. Bonehill A, Heirman C, Tuyaeerts S, Michiels A, Breckpot K, Brasseur F, Zhang Y, Van Der Bruggen P, and Thielemans K. 2004. Messenger RNA-electroporated dendritic cells presenting MAGE-A3 simultaneously in HLA class I and class II molecules. *J. Immunol.* 172: 6649-6657.
75. Siders WM, Vergilis KL, Johnson C, Shields J, and Kaplan JM. 2003. Induction of specific antitumor immunity in the mouse with the electrofusion product of tumor cells and dendritic cells. *Mol. Ther.* 7: 498-505.
76. Kono K, Takahashi A, Sugai H, Fujii H, Choudhury AR, Kiessling R, and Matsumoto Y. 2002. Dendritic cells pulsed with HER-2/neu-derived peptides can induce specific T-cell responses in patients with gastric cancer. *Clin. Cancer Res.* 8: 3394-3400.
77. Higano CS, Schellhammer PF, Small EJ, Burch PA, Nemunaitis J, Yuh L, Provost N, and Frohlich MW. 2009. Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer* 115: 3670-3679.
78. Goldstein NS. 2002. Immunophenotypic characterization of 225 prostate adenocarcinomas with intermediate or high Gleason scores. *Am. J. Clin. Pathol.* 117: 471-477.
79. Drake CG. 2010. Prostate cancer as a model for tumour immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 580-593.
80. Small EJ, Schellhammer PF, Higano CS, Redfern CH, Nemunaitis JJ, Valone FH, Verjee SS, Jones LA, and Hershberg RM. 2006. Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* 24: 3089-3094.
81. Rosenberg SA, Yang JC, and Restifo NP. 2004. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* 10: 909-915.
82. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, and Rosenberg SA. 2002. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*: 850-854.

83. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, Royal RE, Kammula U, White DE, Mavroukakis SA, Rogers LJ, Gracia GJ, Jones SA, Mangiameli DP, Pelletier MM, Gea-Banacloche J, Robinson MR, Berman DM, Filie AC, Abati A, and Rosenberg SA. 2005. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 23: 2346-2357.
84. Gattinoni L, Finkelstein SE, Klebanoff CA, Antony PA, Palmer DC, Spiess PJ, Hwang LN, Yu Z, Wrzesinski C, Heimann DM, Surh CD, Rosenberg SA, and Restifo NP. 2005. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 202: 907-912.
85. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, and Dudley ME. 2008. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 8: 299-308.
86. Stevens EJ, Jacknin L, Robbins PF, Kawakami Y, el Gamil M, Rosenberg SA, and Yannelli JR. 1995. Generation of tumor-specific CTLs from melanoma patients by using peripheral blood stimulated with allogeneic melanoma tumor cell lines. Fine specificity and MART-1 melanoma antigen recognition. *J Immunol* 154: 762-771.
87. Dudley ME and Rosenberg SA. 2007. Adoptive cell transfer therapy. *Semin. Oncol.* 34: 524-531.
88. Roszkowski JJ, Lyons GE, Kast WM, Yee C, Van BK, and Nishimura MI. 2005. Simultaneous generation of CD8⁺ and CD4⁺ melanoma-reactive T cells by retroviral-mediated transfer of a single T-cell receptor. *Cancer Res.* 65: 1570-1576.
89. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng ZL, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, and Rosenberg SA. 2006. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314: 126-129.
90. Spiotto MT, Rowley DA, and Schreiber H. 2004. Bystander elimination of antigen loss variants in established tumors. *Nat. Med.* 10: 294-298.
91. Lee KH, Wang E, Nielsen MB, Wunderlich J, Migueles S, Connors M, Steinberg SM, Rosenberg SA, and Marincola FM. Increased vaccine-specific T cell frequency after peptide-based vaccination correlates with increased susceptibility to in vitro stimulation but does not lead to tumor regression. *J. Immunol.* 1999. Dec. 1. 163: 6292-6300.

92. Cormier JN, Salgaller ML, Prevette T, Barracchini KC, Rivoltini L, Restifo NP, Rosenberg SA, and Marincola FM. 1997. Enhancement of cellular immunity in melanoma patients immunized with a peptide from MART-1/Melan A. *Cancer J. Sci. Am.* 3: 37-44.
93. Nielsen MB, Monsurro V, Migueles SA, Wang E, Perez-Diez A, Lee KH, Kammula U, Rosenberg SA, and Marincola FM. Status of activation of circulating vaccine-elicited CD8+ T cells. *J. Immunol.* 2000. Aug. 15. 165: 2287-2296.
94. Ganss R, Ryschich E, Klar E, Arnold B, and Hammerling GJ. 2002. Combination of T-cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication. *Cancer Res.* 62: 1462-1470.
95. Fisher DT, Chen Q, Appenheimer MM, Skitzki J, Wang WC, Odunsi K, and Evans SS. 2006. Hurdles to lymphocyte trafficking in the tumor microenvironment: implications for effective immunotherapy. *Immunol. Invest* 35: 251-277.
96. Klebanoff CA, Gattinoni L, and Restifo NP. 2006. CD8(+) T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunological Reviews* 211: 214-224.
97. Lake RA and Robinson BW. 2005. Immunotherapy and chemotherapy--a practical partnership. *Nat. Rev. Cancer* 5: 397-405.
98. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M, and Stern PL. 1997. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol. Today* 18: 89-95.
99. Cabrera T, Angustias FM, Sierra A, Garrido A, Herruzo A, Escobedo A, Fabra A, and Garrido F. 1996. High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas. *Hum. Immunol.* 50: 127-134.
100. Restifo NP, Marincola FM, Kawakami Y, Taubenberger J, Yannelli JR, and Rosenberg SA. 1996. Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *J Natl Cancer Inst* 88: 100-108.
101. Vitale M, Rezzani R, Rodella L, Zauli G, Grigolato P, Cadei M, Hicklin DJ, and Ferrone S. 1998. HLA class I antigen and transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP2) down-regulation in high-grade primary breast carcinoma lesions. *Cancer Res.* 58: 737-742.
102. Kageshita T, Hirai S, Ono T, Hicklin DJ, and Ferrone S. 1999. Down-regulation of HLA class I antigen-processing molecules in malignant melanoma: association with disease progression. *Am. J. Pathol.* 154: 745-754.

103. Kaklamanis L, Leek R, Koukourakis M, Gatter KC, and Harris AL. 1995. Loss of transporter in antigen processing 1 transport protein and major histocompatibility complex class I molecules in metastatic versus primary breast cancer. *Cancer Res.* 55: 5191-5194.
104. Seliger B, Ritz U, Abele R, Bock M, Tampe R, Sutter G, Drexler I, Huber C, and Ferrone S. 2001. Immune escape of melanoma: first evidence of structural alterations in two distinct components of the MHC class I antigen processing pathway. *Cancer Res.* 61: 8647-8650.
105. Bangia N, Lehner PJ, Hughes EA, Surman M, and Cresswell P. 1999. The N-terminal region of tapasin is required to stabilize the MHC class I loading complex. *Eur. J. Immunol.* 29: 1858-1870.
106. Garbi N, Tiwari N, Momburg F, and Hammerling GJ. 2003. A major role for tapasin as a stabilizer of the TAP peptide transporter and consequences for MHC class I expression. *Eur. J. Immunol.* 33: 264-273.
107. Romero JM, Jimenez P, Cabrera T, Cozar JM, Pedrinaci S, Tallada M, Garrido F, and Ruiz-Cabello F. 2005. Coordinated downregulation of the antigen presentation machinery and HLA class I/beta2-microglobulin complex is responsible for HLA-ABC loss in bladder cancer. *Int. J. Cancer* 113: 605-610.
108. Bicknell DC, Kaklamanis L, Hampson R, Bodmer WF, and Karran P. 1996. Selection for beta 2-microglobulin mutation in mismatch repair-defective colorectal carcinomas. *Curr. Biol.* 6: 1695-1697.
109. Chang CC, Campoli M, Restifo NP, Wang X, and Ferrone S. 2005. Immune selection of hot-spot beta 2-microglobulin gene mutations, HLA-A2 allospecificity loss, and antigen-processing machinery component down-regulation in melanoma cells derived from recurrent metastases following immunotherapy. *J. Immunol.* 174: 1462-1471.
110. Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, Yewdell JW, Mule JJ, Rosenberg SA, and Bannink JR. 1993. Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J. Exp. Med.* 177: 265-272.
111. Lehmann F, Marchand M, Hainaut P, Pouillart P, Sastre X, Ikeda H, Boon T, and Coulie PG. 1995. Differences in the antigens recognized by cytolytic T cells on two successive metastases of a melanoma patient are consistent with immune selection. *Eur. J. Immunol.* 25: 340-347.
112. Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, and Greenberg PD. 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 of the United States of America* 99: 16168-16173.

113. Khong HT and Restifo NP. 2002. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat. Immunol.*: 999-1005.
114. Landowski TH, Qu N, Buyuksal I, Painter JS, and Dalton WS. 1997. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood* 90: 4266-4270.
115. Djerbi M, Screpanti V, Catrina AI, Bogen B, Biberfeld P, and Grandien A. 1999. The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J. Exp. Med.* 190: 1025-1032.
116. Hersey P and Zhang XD. 2001. How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* 1: 142-150.
117. Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, and Tschopp J. 1996. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274: 1363-1366.
118. Rabinowich H, Reichert TE, Kashii Y, Gastman BR, Bell MC, and Whiteside TL. 1998. Lymphocyte apoptosis induced by Fas ligand- expressing ovarian carcinoma cells. Implications for altered expression of T cell receptor in tumor-associated lymphocytes. *J. Clin. Invest* 101: 2579-2588.
119. Favre-Felix N, Fromentin A, Hammann A, Solary E, Martin F, and Bonnotte B. 2000. Cutting edge: the tumor counterattack hypothesis revisited: colon cancer cells do not induce T cell apoptosis via the Fas (CD95, APO-1) pathway. *J. Immunol.* 164: 5023-5027.
120. Schwartz RH. 1990. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248: 1349-1356.
121. Chen L, McGowan P, Ashe S, Johnston J, Li Y, Hellstrom I, and Hellstrom KE. 1994. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J. Exp. Med.* 179: 523-532.
122. von MM, Arlen P, Tsang KY, Rogatko A, Meropol N, Cooper HS, Davey M, McLaughlin S, Schlom J, and Weiner LM. 2000. Pilot study of a dual gene recombinant avipox vaccine containing both carcinoembryonic antigen (CEA) and B7.1 transgenes in patients with recurrent CEA-expressing adenocarcinomas. *Clin. Cancer Res.* 6: 2219-2228.

123. Morse MA, Clay TM, Hobeika AC, Osada T, Khan S, Chui S, Niedzwiecki D, Panicali D, Schlom J, and Lysterly HK. 2005. Phase I study of immunization with dendritic cells modified with fowlpox encoding carcinoembryonic antigen and costimulatory molecules. *Clin. Cancer Res.* 11: 3017-3024.
124. Blansfield JA, Beck KE, Tran K, Yang JC, Hughes MS, Kammula US, Royal RE, Topalian SL, Haworth LR, Levy C, Rosenberg SA, and Sherry RM. 2005. Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 blockage can induce autoimmune hypophysitis in patients with metastatic melanoma and renal cancer. *J. Immunother.* 28: 593-598.
125. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, and Minato N. 2002. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99: 12293-12297.
126. Blank C, Kuball J, Voelkl S, Wiendl H, Becker B, Walter B, Majdic O, Gajewski TF, Theobald M, Andreesen R, and Mackensen A. 2006. Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. *Int. J. Cancer* 119: 317-327.
127. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, Webster WS, Sengupta S, Frank I, Parker AS, Zincke H, Blute ML, Sebo TJ, Cheville JC, and Kwon ED. 2006. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res.* 66: 3381-3385.
128. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, Tsurui Y, Hamada K, Ikeda N, Mizuno T, Yoriki R, Kashizuka H, Yane K, Tsushima F, Otsuki N, Yagita H, Azuma M, and Nakajima Y. 2005. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin. Cancer Res.* 11: 2947-2953.
129. Curiel TJ, Wei S, Dong H, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Krzysiek R, Knutson KL, Daniel B, Zimmermann MC, David O, Burow M, Gordon A, Dhurandhar N, Myers L, Berggren R, Hemminki A, Alvarez RD, Emilie D, Curiel DT, Chen L, and Zou W. 2003. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat. Med.* 9: 562-567.
130. Alexander JP, Kudoh S, Melsop KA, Hamilton TA, Edinger MG, Tubbs RR, Sica D, Tuason L, Klein E, Bukowski RM, and . 1993. T-cells infiltrating renal cell carcinoma display a poor proliferative response even though they can produce interleukin 2 and express interleukin 2 receptors. *Cancer Res.* 53: 1380-1387.

131. Mizoguchi H, O'Shea JJ, Longo DL, Loeffler CM, McVicar DW, and Ochoa AC. 1992. Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science* 258: 1795-1798.
132. Finke JH, Zea AH, Stanley J, Longo DL, Mizoguchi H, Tubbs RR, Wiltrott RH, O'Shea JJ, Kudoh S, Klein E, and . 1993. Loss of T-cell receptor zeta chain and p56lck in T-cells infiltrating human renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 53: 5613-5616.
133. Nakagomi H, Petersson M, Magnusson I, Juhlin C, Matsuda M, Mellstedt H, Taupin JL, Vivier E, Anderson P, and Kiessling R. 1993. Decreased expression of the signal-transducing zeta chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 53: 5610-5612.
134. Zea AH, Curti BD, Longo DL, Alvord WG, Strobl SL, Mizoguchi H, Creekmore SP, O'Shea JJ, Powers GC, Urba WJ, and . 1995. Alterations in T cell receptor and signal transduction molecules in melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* 1: 1327-1335.
135. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Higashi H, Iwashige H, Aridome K, Hokita S, and Aikou T. 2002. CD3-zetachain expression of intratumoral lymphocytes is closely related to survival in gastric carcinoma patients. *Cancer* 94: 1437-1442.
136. Demotte N, Stroobant V, Courtoy PJ, Van Der SP, Colau D, Luescher IF, Hivroz C, Nicaise J, Squifflet JL, Mourad M, Godelaine D, Boon T, and Van Der Bruggen P. 2008. Restoring the association of the T cell receptor with CD8 reverses anergy in human tumor-infiltrating lymphocytes. *Immunity.* 28: 414-424.
137. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, and Toda M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155: 1151-1164.
138. Shimizu J, Yamazaki S, and Sakaguchi S. 1999. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J. Immunol.* 163: 5211-5218.
139. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, and Linehan DC. 2002. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J. Immunol.:* 2756-2761.

140. Linehan DC and Goedegebuure PS. 2005. CD25+ CD4+ regulatory T-cells in cancer. *Immunol. Res.* 32: 155-168.
141. Attia P, Maker AV, Haworth LR, Rogers-Freezer L, and Rosenberg SA. 2005. Inability of a fusion protein of IL-2 and diphtheria toxin (Denileukin Diftitox, DAB389IL-2, ONTAK) to eliminate regulatory T lymphocytes in patients with melanoma. *J. Immunother.* 28: 582-592.
142. Dannull J, Su Z, Rizzieri D, Yang BK, Coleman D, Yancey D, Zhang A, Dahm P, Chao N, Gilboa E, and Vieweg J. 2005. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J. Clin. Invest* 115: 3623-3633.
143. Bell D, Chomarat P, Broyles D, Netto G, Harb GM, Lebecque S, Valladeau J, Davoust J, Palucka KA, and Banchereau J. 1999. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J. Exp. Med.* 190: 1417-1426.
144. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, and Caux C. 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med.* 188: 373-386.
145. Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC, Bain C, Favrot MC, Caux C, and Blay JY. 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: 4778-4791.
146. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, and Carbone DP. 1996. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* 2: 1096-1103.
147. Wojas K, Tabarkiewicz J, Jankiewicz M, and Rolinski J. 2004. Dendritic cells in peripheral blood of patients with breast and lung cancer--a pilot study. *Folia Histochem. Cytobiol.* 42: 45-48.
148. Della BS, Gennaro M, Vaccari M, Ferraris C, Nicola S, Riva A, Clerici M, Greco M, and Villa ML. 2003. Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Br. J. Cancer* 89: 1463-1472.
149. Lewis CE and Pollard JW. 2006. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 66: 605-612.

150. Bingle L, Brown NJ, and Lewis CE. 2002. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.* 196: 254-265.
151. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, and Pollard JW. 2001. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J. Exp. Med.* 193: 727-740.
152. Aharinejad S, Paulus P, Sioud M, Hofmann M, Zins K, Schafer R, Stanley ER, and Abraham D. 2004. Colony-stimulating factor-1 blockade by antisense oligonucleotides and small interfering RNAs suppresses growth of human mammary tumor xenografts in mice. *Cancer Res.* 64: 5378-5384.
153. Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, McDermott D, Quiceno D, Youmans A, O'Neill A, Mier J, and Ochoa AC. 2005. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res.* 65: 3044-3048.
154. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, and Montero AJ. 2009. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 58: 49-59.
155. Serafini P, Borrello I, and Bronte V. 2006. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin. Cancer Biol.* 16: 53-65.
156. Sinha P, Clements VK, Bunt SK, Albelda SM, and Ostrand-Rosenberg S. 2007. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J. Immunol.* 179: 977-983.
157. Trinchieri G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 133-146.
158. Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, and Ostrand-Rosenberg S. 2010. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res.* 70: 68-77.
159. Hanson EM, Clements VK, Sinha P, Ilkovitch D, and Ostrand-Rosenberg S. 2009. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol.* 183: 937-944.

160. Gorsch SM, Memoli VA, Stukel TA, Gold LI, and Arrick BA. 1992. Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res.* 52: 6949-6952.
161. Fontana A, Frei K, Bodmer S, Hofer E, Schreier MH, Palladino MA, Jr., and Zinkernagel RM. 1989. Transforming growth factor-beta inhibits the generation of cytotoxic T cells in virus-infected mice. *J. Immunol.* 143: 3230-3234.
162. Hagenbaugh A, Sharma S, Dubinett SM, Wei SH, Aranda R, Cheroutre H, Fowell DJ, Binder S, Tsao B, Locksley RM, Moore KW, and Kronenberg M. 1997. Altered immune responses in interleukin 10 transgenic mice. *J. Exp. Med.* 185: 2101-2110.
163. Fortis C, Foppoli M, Gianotti L, Galli L, Citterio G, Consogno G, Gentilini O, and Braga M. 1996. Increased interleukin-10 serum levels in patients with solid tumours. *Cancer Lett.* 104: 1-5.
164. Mosmann TR and Sad S. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* 17: 138-146.
165. De Smedt T., Van MM, De BG, Urbain J, Leo O, and Moser M. 1997. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur. J. Immunol.* 27: 1229-1235.
166. Sharma S, Stolina M, Lin Y, Gardner B, Miller PW, Kronenberg M, and Dubinett SM. 1999. T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J. Immunol.* 163: 5020-5028.
167. Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, and Mantovani A. 1998. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur. J. Immunol.* 28: 359-369.
168. Singh R, Pervin S, Karimi A, Cederbaum S, and Chaudhuri G. 2000. Arginase activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells. *Cancer Res.* 60: 3305-3312.
169. Poremska Z, Luboinski G, Chrzanowska A, Mielczarek M, Magnuska J, and Baranczyk-Kuzma A. 2003. Arginase in patients with breast cancer. *Clin. Chim. Acta* 328: 105-111.
170. Wu CW, Chung WW, Chi CW, Kao HL, Lui WY, P'eng FK, and Wang SR. 1996. Immunohistochemical study of arginase in cancer of the stomach. *Virchows Arch.* 428: 325-331.

171. Gerner EW and Meyskens FL, Jr. 2004. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat. Rev. Cancer* 4: 781-792.
172. Bronte V, Kasic T, Gri G, Gallana K, Borsellino G, Marigo I, Battistini L, Iafrate M, Prayer-Galetti T, Pagano F, and Viola A. 2005. Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *J. Exp. Med.* 201: 1257-1268.
173. Yamazaki F, Kuroiwa T, Takikawa O, and Kido R. 1985. Human indolylamine 2,3-dioxygenase. Its tissue distribution, and characterization of the placental enzyme. *Biochem. J.* 230: 635-638.
174. Ball HJ, Sanchez-Perez A, Weiser S, Austin CJ, Astelbauer F, Miu J, McQuillan JA, Stocker R, Jermin LS, and Hunt NH. 2007. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene* 396: 203-213.
175. Metz R, DuHadaway JB, Kamasani U, Laury-Kleintop L, Muller AJ, and Prendergast GC. 2007. Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer Res.* 67: 7082-7087.
176. Yoshida R, Urade Y, Tokuda M, and Hayaishi O. 1979. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in mouse lung during virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76: 4084-4086.
177. Pfefferkorn ER. 1984. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81: 908-912.
178. Yasui H, Takai K, Yoshida R, and Hayaishi O. 1986. Interferon enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase: its possible occurrence in cancer patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83: 6622-6626.
179. Ozaki Y, Edelstein MP, and Duch DS. 1988. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase: a mechanism of the antitumor activity of interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85: 1242-1246.
180. Aune TM and Pogue SL. 1989. Inhibition of tumor cell growth by interferon-gamma is mediated by two distinct mechanisms dependent upon oxygen tension: induction of tryptophan degradation and depletion of intracellular nicotinamide adenine dinucleotide. *J. Clin. Invest* 84: 863-875.

181. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, and Mellor AL. 1998. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281: 1191-1193.
182. Friberg M, Jennings R, Alsarraj M, Dessureault S, Cantor A, Extermann M, Mellor AL, Munn DH, and Antonia SJ. 2002. Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *Int. J. Cancer* 101: 151-155.
183. Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, and Van den Eynde BJ. 2003. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med.* 9: 1269-1274.
184. Yoshida N, Ino K, Ishida Y, Kajiyama H, Yamamoto E, Shibata K, Terauchi M, Nawa A, Akimoto H, Takikawa O, Isobe K, and Kikkawa F. 2008. Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human endometrial carcinoma cells induces rapid tumor growth in a mouse xenograft model. *Clin. Cancer Res.* 14: 7251-7259.
185. Inaba T, Ino K, Kajiyama H, Yamamoto E, Shibata K, Nawa A, Nagasaka T, Akimoto H, Takikawa O, and Kikkawa F. 2009. Role of the immunosuppressive enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase in the progression of ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 115: 185-192.
186. Takikawa O, Kuroiwa T, Yamazaki F, and Kido R. 1988. Mechanism of interferon-gamma action. Characterization of indoleamine 2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon-gamma and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity. *J. Biol. Chem.* 263: 2041-2048.
187. Boasso A, Herbeuval JP, Hardy AW, Winkler C, and Shearer GM. 2005. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4+ T cells. *Blood* 105: 1574-1581.
188. Fleckner J, Martensen PM, Tolstrup AB, Kjeldgaard NO, and Justesen J. 1995. Differential regulation of the human, interferon inducible tryptophanyl-tRNA synthetase by various cytokines in cell lines. *cytokine* 7: 70-77.
189. Rubin BY, Anderson SL, Xing L, Powell RJ, and Tate WP. 1991. Interferon induces tryptophanyl-tRNA synthetase expression in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 266: 24245-24248.
190. Munn DH, Sharma MD, Hou D, Baban B, Lee JR, Antonia SJ, Messina JL, Chandler P, Koni PA, and Mellor AL. 2004. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J. Clin. Invest.* 114: 280-290.

191. Hou DY, Muller AJ, Sharma MD, DuHadaway J, Banerjee T, Johnson M, Mellor AL, Prendergast GC, and Munn DH. 2007. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. *Cancer Res.* 67: 792-801.
192. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, and Mellor AL. 1999. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* 189: 1363-1372.
193. Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang YH, Ron D, and Mellor AL. 2005. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity* 22: 633-642.
194. Munn DH and Mellor AL. 2007. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J. Clin. Invest.* 117: 1147-1154.
195. Terness P, Bauer TM, Rose L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, and Opelz G. 2002. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: Mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J. Exp. Med.* 196: 447-457.
196. Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, and Ferrara GB. 2002. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Exp. Med.* 196: 459-468.
197. Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, and Puccetti P. 2002. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death. Differ.* 9: 1069-1077.
198. King NJ and Thomas SR. 2007. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 2167-2172.
199. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, Orabona C, Bianchi R, Belladonna ML, Volpi C, Santamaria P, Fioretti MC, and Puccetti P. 2006. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J. Immunol.* 176: 6752-6761.
200. Sharma MD, Baban B, Chandler P, Hou DY, Singh N, Yagita H, Azuma M, Blazar BR, Mellor AL, and Munn DH. 2007. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* 117: 2570-2582.

201. Sharma MD, Hou DY, Liu Y, Koni PA, Metz R, Chandler P, Mellor AL, He Y, and Munn DH. 2009. Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. *Blood* 113: 6102-6111.
202. Nakamura T, Shima T, Saeki A, Hidaka T, Nakashima A, Takikawa O, and Saito S. 2007. Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer. *Cancer Sci.* 98: 874-881.
203. Curti A, Pandolfi S, Valzasina B, Aluigi M, Isidori A, Ferri E, Salvestrini V, Bonanno G, Rutella S, Durelli I, Horenstein AL, Fiore F, Massaia M, Colombo MP, Baccarani M, and Lemoli RM. 2007. Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25- into CD25+ T regulatory cells. *Blood* 109: 2871-2877.
204. Carlin JM, Borden EC, Sondel PM, and Byrne GI. 1987. Biologic-response-modifier-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *J. Immunol.* 139: 2414-2418.
205. Caplen HS and Gupta SL. 1988. Differential regulation of a cellular gene by human interferon-gamma and interferon-alpha. *J. Biol. Chem.* 263: 332-339.
206. Dai W and Gupta SL. 1990. Molecular cloning, sequencing and expression of human interferon-gamma-inducible indoleamine 2,3-dioxygenase cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168: 1-8.
207. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, and Puccetti P. 2002. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* 3: 1097-1101.
208. Werner-Felmayer G, Werner ER, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, and Wachter H. 1989. Tumour necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide enhance interferon-induced tryptophan degradation and pteridine synthesis in human cells. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 370: 1063-1069.
209. Hissong BD and Carlin JM. 1997. Potentiation of interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase mRNA in human mononuclear phagocytes by lipopolysaccharide and interleukin-1. *J. Interferon Cytokine Res.* 17: 387-393.
210. Muller AJ, Sharma MD, Chandler PR, DuHadaway JB, Everhart ME, Johnson BA, III, Kahler DJ, Pihkala J, Soler AP, Munn DH, Prendergast GC, and Mellor AL. 2008. Chronic inflammation that facilitates tumor progression creates local immune suppression by inducing indoleamine 2,3 dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105: 17073-17078.

211. Ishio T, Goto S, Tahara K, Tone S, Kawano K, and Kitano S. 2004. Immunoactivative role of indoleamine 2,3-dioxygenase in human hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 19: 319-326.
212. Ito M, Ogawa K, Takeuchi K, Nakada A, Heishi M, Suto H, Mitsuishi K, Sugita Y, Ogawa H, and Ra C. 2004. Gene expression of enzymes for tryptophan degradation pathway is upregulated in the skin lesions of patients with atopic dermatitis or psoriasis. *J. Dermatol. Sci.* 36: 157-164.
213. Yadav MC, Burudi EME, Alirezaei M, Flynn CC, Lanigan CM, and Fox HS. 2007. IFN-gamma-induced IDO and WRS expression in microglia is differentially regulated by IL-4. *Glia* 55: 1385-1396.
214. Musso T, Gusella GL, Brooks A, Longo DL, and Varesio L. 1994. Interleukin-4 inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocytes. *Blood* 83: 1408-1411.
215. Yuan WH, Collado-Hidalgo A, Yufit T, Taylor M, and Varga J. 1998. Modulation of cellular tryptophan metabolism in human fibroblasts by transforming growth factor-beta: Selective inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA synthetase gene expression. *J. Cell. Physiol.* 177: 174-186.
216. Chaves ACL, Ceravolo IP, Gomes JAS, Zani CL, Romanha AJ, and Gazzinelli RT. 2001. IL-4 and IL-13 regulate the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase activity and the control of *Toxoplasma gondii* replication in human fibroblasts activated with IFN-gamma. *Eur. J. Immunol.* 31: 333-344.
217. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, and Puccetti P. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4: 1206-1212.
218. Munn DH, Sharma MD, and Mellor AL. 2004. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J. Immunol.* 172: 4100-4110.
219. Ribas A, Comin-Anduix B, Economou JS, Donahue TR, de la RP, Morris LF, Jalil J, Dissette VB, Shintaku IP, Glaspy JA, Gomez-Navarro J, and Cochran AJ. 2009. Intratumoral immune cell infiltrates, FoxP3, and indoleamine 2,3-dioxygenase in patients with melanoma undergoing CTLA4 blockade. *Clin. Cancer Res.* 15: 390-399.
220. Huang A, Fuchs D, Widner B, Glover C, Henderson DC, and Ien-Mersh TG. 2002. Serum tryptophan decrease correlates with immune activation and impaired quality of life in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 86: 1691-1696.

221. Astigiano S, Morandi B, Costa R, Mastracci L, D'Agostino A, Ratto GB, Melioli G, and Frumento G. 2005. Eosinophil granulocytes account for indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated immune escape in human non-small cell lung cancer. *Neoplasia*. 7: 390-396.
222. Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, Schneeberger S, Obrist P, Winkler C, Werner ER, Werner-Felmayer G, Weiss HG, Gobel G, Margreiter R, Konigsrainer A, Fuchs D, and Amberger A. 2006. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: Effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin. Cancer Res*. 12: 1144-1151.
223. Ino K, Yoshida N, Kajiyama H, Shibata K, Yamamoto E, Kidokoro K, Takahashi N, Terauchi M, Nawa A, Nomura S, Nagasaka T, Takikawa O, and Kikkawa F. 2006. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer. *Br. J. Cancer* 95: 1555-1561.
224. Ino K, Yamamoto E, Shibata K, Kajiyama H, Yoshida N, Terauchi M, Nawa A, Nagasaka T, Takikawa O, and Kikkawa F. 2008. Inverse correlation between tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: its association with disease progression and survival. *Clin. Cancer Res*. 14: 2310-2317.
225. Pan K, Wang H, Chen MS, Zhang HK, Weng DS, Zhou J, Huang W, Li JJ, Song HF, and Xia JC. 2008. Expression and prognosis role of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatocellular carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 134: 1247-1253.
226. Mansfield AS, Heikkila PS, Vaara AT, von Smitten KA, Vakkila JM, and Leidenius MH. 2009. Simultaneous Foxp3 and IDO expression is associated with sentinel lymph node metastases in breast cancer. *BMC. Cancer* 9: 231.
227. Okamoto A, Nikaido T, Ochiai K, Takakura S, Saito M, Aoki Y, Ishii N, Yanaihara N, Yamada K, Takikawa O, Kawaguchi R, Isonishi S, Tanaka T, and Urashima M. 2005. Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells. *Clin. Cancer Res*. 11: 6030-6039.
228. Witkiewicz A, Williams TK, Cozzitorto J, Durkan B, Showalter SL, Yeo CJ, and Brody JR. 2008. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection. *J. Am. Coll. Surg*. 206: 849-854.
229. Riesenber R, Weiler C, Spring O, Eder M, Buchner A, Popp T, Castro M, Kammerer R, Takikawa O, Hatz RA, Stief CG, Hofstetter A, and Zimmermann W. 2007. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor endothelial cells

- correlates with long-term survival of patients with renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 13: 6993-7002.
230. Ou X, Cai S, Liu P, Zeng J, He Y, Wu X, and Du J. 2008. Enhancement of dendritic cell-tumor fusion vaccine potency by indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase inhibitor, 1-MT. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 134: 525-533.
 231. Zeng J, Cai S, Yi Y, He Y, Wang Z, Jiang G, Li X, and Du J. 2009. Prevention of spontaneous tumor development in a ret transgenic mouse model by ret peptide vaccination with indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitor 1-methyl tryptophan. *Cancer Res.* 69: 3963-3970.
 232. Mellor AL, Baban B, Chandler PR, Manlapat A, Kahler DJ, and Munn DH. 2005. Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19+ dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN Type 1 signaling. *J. Immunol.* 175: 5601-5605.
 233. Wobser M, Voigt H, Houben R, Eggert AO, Freiwald M, Kaemmerer U, Kaempgen E, Schrama D, and Becker JC. 2007. Dendritic cell based antitumor vaccination: impact of functional indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *Cancer Immunol. Immunother.* 56: 1017-1024.
 234. Banerjee T, DuHadaway JB, Gaspari P, Sutanto-Ward E, Munn DH, Mellor AL, Malachowski WP, Prendergast GC, and Muller AJ. 2008. A key in vivo antitumor mechanism of action of natural product-based brassinins is inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Oncogene* 27: 2851-2857.
 235. Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, Sutanto-Ward E, and Prendergast GC. 2005. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nature Medicine* 11: 312-319.
 236. Löb S, Konigsrainer A, Schafer R, Rammensee HG, Opelz G, and Terness P. 2008. Levo- but not dextro-1-methyl tryptophan abrogates the IDO activity of human dendritic cells. *Blood* 111: 2152-2154.
 237. Lob S, Konigsrainer A, Zieker D, Brucher BL, Rammensee HG, Opelz G, and Terness P. 2009. IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. *Cancer Immunol. Immunother.* 58: 153-157.
 238. Qian F, VILLELLA J, WALLACE PK, MHAWECH-FAUCEGLIA P, TARIO JD, Jr., ANDREWS C, MATSUZAKI J, VALMORI D, AYYOUB M, FREDERICK PJ, BECK A, LIAO J, CHENEY R, MOYSICH K, LELE S, SHRIKANT P, OLD LJ, and ODUNSI K. 2009. Efficacy of levo-1-

methyl tryptophan and dextro-1-methyl tryptophan in reversing indoleamine-2,3-dioxygenase-mediated arrest of T-cell proliferation in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 69: 5498-5504.

239. Sorensen RB, Berge-Hansen L, Junker N, Hansen CA, Hadrup SR, Schumacher TN, Svane IM, Becker JC, thor SP, and Andersen MH. 2009. The immune system strikes back: cellular immune responses against indoleamine 2,3-dioxygenase. *PLoS. One.* 4: e6910.
240. Romero P, Dunbar PR, Valmori D, Pittet M, Ogg GS, Rimoldi D, Chen JL, Lienard D, Cerottini JC, and Cerundolo V. 1998. Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 188: 1641-1650.
241. Diederichsen AC, Hjelmberg JB, Christensen PB, Zeuthen J, and Fenger C. 2003. Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 423-428.
242. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, and Banham AH. 2006. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J. Clin. Oncol.* 24: 5373-5380.
243. Gao Q, Qiu SJ, Fan J, Zhou J, Wang XY, Xiao YS, Xu Y, Li YW, and Tang ZY. 2007. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J. Clin. Oncol.* 25: 2586-2593.
244. Siddiqui SA, Frigola X, Bonne-Annee S, Mercader M, Kuntz SM, Krambeck AE, Sengupta S, Dong H, Chevillat JC, Lohse CM, Krco CJ, Webster WS, Leibovich BC, Blute ML, Knutson KL, and Kwon ED. 2007. Tumor-infiltrating Foxp3-CD4+CD25+ T cells predict poor survival in renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 13: 2075-2081.
245. McArdle PA, Canna K, McMillan DC, McNicol AM, Campbell R, and Underwood MA. 2004. The relationship between T-lymphocyte subset infiltration and survival in patients with prostate cancer. *Br. J. Cancer* 91: 541-543.
246. Geiger JD, Hutchinson RJ, Hohenkirk LF, McKenna EA, Yanik GA, Levine JE, Chang AE, Braun TM, and Mule JJ. 2001. Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression. *Cancer Res.* 61: 8513-8519.

247. Su Z, Dannull J, Heiser A, Yancey D, Pruitt S, Madden J, Coleman D, Niedzwiecki D, Gilboa E, and Vieweg J. 2003. Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res.* 63: 2127-2133.
248. Rosenberg SA, Sherry RM, Morton KE, Scharfman WJ, Yang JC, Topalian SL, Royal RE, Kammula U, Restifo NP, Hughes MS, Schwartzentruber D, Berman DM, Schwarz SL, Ngo LT, Mavroukakis SA, White DE, and Steinberg SM. 2005. Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8⁺ T cells in patients with melanoma. *J. Immunol.* 175: 6169-6176.
249. Mellor AL and Munn DH. 2008. Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 74-80.
250. Mellor AL, Keskin DB, Johnson T, Chandler P, and Munn DH. 2002. Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses. *J. Immunol.* 168: 3771-3776.
251. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, and Dilloo D. 2004. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103: 4619-4621.
252. Fallarino I, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, and Puccetti P. 2002. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* 9: 1069-1077.
253. Weber WP, Feder-Mengus C, Chiarugi A, Rosenthal R, Reschner A, Schumacher R, Zajac P, Misteli H, Frey DM, Oertli D, Heberer M, and Spagnoli GC. 2006. Differential effects of the tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid on the proliferation of human CD8(+) T cells induced by TCR triggering or homeostatic cytokines. *Eur. J. Immunol.* 36: 296-304.
254. Odemuyiwa SO, Ghahary A, Li YY, Puttagunta L, Lee JE, Musat-Marcu S, Ghahary A, and Moqbel R. 2004. Cutting edge: Human eosinophils regulate T cell subset selection through indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Immunol.* 173: 5909-5913.
255. Pelletier S, Tanguay S, Lee S, Gunaratnam L, Arbour N, and Lapointe R. 2009. TGF- α as a candidate tumor antigen for renal cell carcinomas. *Cancer Immunol. Immunother.* 58: 1207-1218.
256. Leclerc D, Beauseigle D, Denis J, Morin H, Pare C, Lamarre A, and Lapointe R. 2007. Proteasome-independent major histocompatibility complex class I cross-

- presentation mediated by papaya mosaic virus-like particles leads to expansion of specific human T cells. *J. Virol.* 81: 1319-1326.
257. Turcotte S, Forget MA, Beauseigle D, Nassif E, and Lapointe R. 2007. Prostate-derived Ets transcription factor overexpression is associated with nodal metastasis and hormone receptor positivity in invasive breast cancer. *Neoplasia.* 9: 788-796.
 258. Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nuc. Acids Res.* 29: 2002-2007.
 259. Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, and Young HA. 2000. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J. Immunol.* 164: 3596-3599.
 260. Finger EB and Bluestone JA. 2002. When ligand becomes receptor - tolerance via B7 signaling on DCs. *Nat. Immunol.* 3: 1056-1057.
 261. Whitford P, Mallon EA, George WD, and Campbell AM. 1990. Flow cytometric analysis of tumour infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Br. J. Cancer* 62: 971-975.
 262. Shabtai M, Ye H, Frischer Z, Martin J, Waltzer WC, and Malinowski K. 2002. Increased expression of activation markers in renal cell carcinoma infiltrating lymphocytes. *J. Urol.* 168: 2216-2219.
 263. Cozar JM, Canton J, Tallada M, Concha A, Cabrera T, Garrido F, and Ruiz-Cabello OF. 2005. Analysis of NK cells and chemokine receptors in tumor infiltrating CD4 T lymphocytes in human renal carcinomas. *Cancer Immunol. Immunother.* 54: 858-866.
 264. LaPorte SL, Juo ZS, Vaclavikova J, Colf LA, Qi X, Heller NM, Keegan AD, and Garcia KC. 2008. Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system. *Cell* 132: 259-272.
 265. Aspod C, Pedroza-Gonzalez A, Gallegos M, Tindle S, Burton EC, Su D, Marches F, Banchereau J, and Palucka AK. 2007. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4(+) T cells that facilitate tumor development. *J. Exp. Med.* 204: 1037-1047.
 266. Chavey C, Bibeau F, Gourgou-Bourgade S, Burlinchon S, Boissiere F, Laune D, Roques S, and Lazennec G. 2007. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Res.* 9: R15.

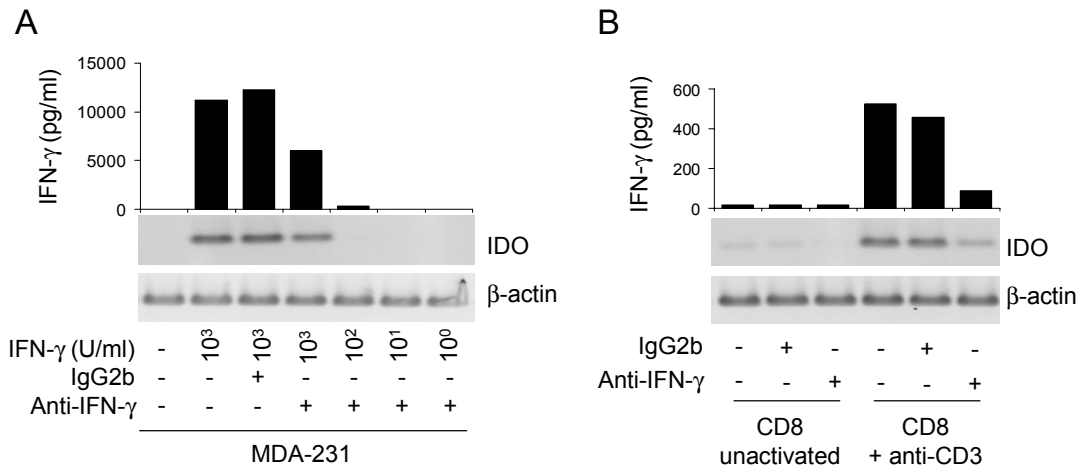
267. Hamilton DH and Bretscher PA. 2008. Different immune correlates associated with tumor progression and regression: implications for prevention and treatment of cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 57: 1125-1136.
268. Munn DH and Mellor AL. 2004. IDO and tolerance to tumors. *Trends Mol. Med.* 10: 15-18.
269. Plataniias LC. 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 375-386.
270. Palmer-Crocker RL, Hughes CC, and Pober JS. 1996. IL-4 and IL-13 activate the JAK2 tyrosine kinase and Stat6 in cultured human vascular endothelial cells through a common pathway that does not involve the gamma c chain. *J. Clin. Invest* 98: 604-609.
271. Jung ID, Lee CM, Jeong YI, Lee JS, Park WS, Han J, and Park YM. 2007. Differential regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide and interferon gamma in murine bone marrow derived dendritic cells. *FEBS Lett.* 581: 1449-1456.
272. Frank DA, Mahajan S, and Ritz J. 1999. Fludarabine-induced immunosuppression is associated with inhibition of STAT1 signaling. *Nature Medicine* 5: 444-447.
273. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Shepherd L, Hines J, Threatte GA, Larson RA, Cheson BD, and Schiffer CA. 2000. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 343: 1750-1757.
274. Fenchel K, Bergmann L, Wijermans P, Engert A, Pralle H, Mitrou PS, Diehl V, and Hoelzer D. 1995. Clinical experience with fludarabine and its immunosuppressive effects in pretreated chronic lymphocytic leukemias and low-grade lymphomas. *Leuk. Lymphoma* 18: 485-492.
275. Tajima K, Takaishi H, Takito J, Tohmonda T, Yoda M, Ota N, Kosaki N, Matsumoto M, Ikegami H, Nakamura T, Kimura T, Okada Y, Horiuchi K, Chiba K, and Toyama Y. 2010. Inhibition of STAT1 accelerates bone fracture healing. *J. Orthop. Res.* 28: 937-941.
276. Yannelli JR, Hyatt C, McConnell S, Hines K, Jacknin L, Parker L, Sanders M, and Rosenberg SA. 1996. Growth of tumor-infiltrating lymphocytes from human solid cancers: summary of a 5-year experience. *Int. J. Cancer* 65: 413-421.

277. Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, and Greenberg PD. 1992. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 257: 238-241.
278. Dudley ME, Ngo LT, Westwood J, Wunderlich JR, and Rosenberg SA. 2000. T-cell clones from melanoma patients immunized against an anchor-modified gp100 peptide display discordant effector phenotypes. *Cancer J.* 6: 69-77.
279. Solis M, Romieu-Mourez R, Goubau D, Grandvaux N, Mesplede T, Julkunen I, Nardin A, Salcedo M, and Hiscott J. 2007. Involvement of TBK1 and IKKepsilon in lipopolysaccharide-induced activation of the interferon response in primary human macrophages. *Eur. J. Immunol.* 37: 528-539.
280. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. 2005. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365: 1687-1717.
281. Kyewski B and Klein L. 2006. A central role for central tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 571-606.
282. Taylor MW and Feng GS. 1991. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J.* 5: 2516-2522.
283. Terness P, Bauer TM, Rose L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, and Opelz G. 2002. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J. Exp. Med.* 196: 447-457.
284. Inoue S, Leitner WW, Golding B, and Scott D. 2006. Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. *Cancer Res.* 66: 7741-7747.
285. Shah S, Divekar AA, Hilchey SP, Cho HM, Newman CL, Shin SU, Nechustan H, Challita-Eid PM, Segal BM, Yi KH, and Rosenblatt JD. 2005. Increased rejection of primary tumors in mice lacking B cells: inhibition of anti-tumor CTL and TH1 cytokine responses by B cells. *Int. J. Cancer* 117: 574-586.
286. Rosenblatt J, Zhang YD, and Tadmor T. 2007. Inhibition of antitumor immunity by B cells. *Cancer Res.* 67: 5058-5059.
287. Vinay DS, Kim CH, Chang KH, and Kwon BS. 2010. PDCA expression by B lymphocytes reveals important functional attributes. *J. Immunol.* 184: 807-815.
288. Morse DL, Carroll D, Weberg L, Borgstrom MC, Ranger-Moore J, and Gillies RJ. 2005. Determining suitable internal standards for mRNA quantification of

- increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 342: 69-77.
289. Mills DM and Cambier JC. 2003. B lymphocyte activation during cognate interactions with CD4⁺ T lymphocytes: molecular dynamics and immunologic consequences. *Seminars in Immunology* 15: 325-329.
 290. Lapointe R, Bellemare-Pelletier A, Housseau F, Thibodeau J, and Hwu P. 2003. CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Can. Res.* 63: 2836-2843.
 291. Kai S, Goto S, Tahara K, Sasaki A, Tone S, and Kitano S. 2004. Indoleamine 2,3-dioxygenase is necessary for cytolytic activity of natural killer cells. *Scand. J. Immunol.* 59: 177-182.
 292. Mellor AL, Baban B, Chandler PR, Manlapat A, Kahler DJ, and Munn DH. 2005. Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19⁺ dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN Type 1 signaling. *J. Immunol.* 175: 5601-5605.
 293. Wingender G, Garbi N, Schumak B, Jungerkes F, Endl E, von BD, Steitz J, Striegler J, Moldenhauer G, Tuting T, Heit A, Huster KM, Takikawa O, Akira S, Busch DH, Wagner H, Hammerling GJ, Knolle PA, and Limmer A. 2006. Systemic application of CpG-rich DNA suppresses adaptive T cell immunity via induction of IDO. *Eur. J. Immunol.* 36: 12-20.
 294. Fallarino F, Vacca C, Orabona C, Belladonna ML, Bianchi R, Marshall B, Keskin DB, Mellor AL, Fioretti MC, Grohmann U, and Puccetti P. 2002. Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 α (⁺) dendritic cells. *Int. Immunol.* 14: 65-68.
 295. de JM and Maina T. 2010. Of mice and humans: are they the same?--Implications in cancer translational research. *J. Nucl. Med.* 51: 501-504.
 296. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, Chen H, Omeroglu G, Meterissian S, Omeroglu A, Hallett M, and Park M. 2008. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat. Med.* 14: 518-527.
 297. Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Colombo MP, Basso G, Brombacher F, Borrello I, Zanovello P, Biccato S, and Bronte V. 2006. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8(+) T cells. *Journal of Clinical Investigation* 116: 2777-2790.

298. Mailankot M and Nagaraj RH. 2010. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon-gamma in human lens epithelial cells: apoptosis through the formation of 3-hydroxykynurenine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42: 1446-1454.
299. Jeong YI, Kim SW, Jung ID, Lee JS, Chang JH, Lee CM, Chun SH, Yoon MS, Kim GT, Ryu SW, Kim JS, Shin YK, Lee WS, Shin HK, Lee JD, and Park YM. 2009. Curcumin suppresses the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by blocking the Janus-activated kinase-protein kinase Cdelta-STAT1 signaling pathway in interferon-gamma-stimulated murine dendritic cells. *J. Biol. Chem.* 284: 3700-3708.
300. Cheng CW, Shieh PC, Lin YC, Chen YJ, Lin YH, Kuo DH, Liu JY, Kao JY, Kao MC, and Way TD. 2010. Indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunomodulatory protein, is suppressed by (-)-epigallocatechin-3-gallate via blocking of gamma-interferon-induced JAK-PKC-delta-STAT1 signaling in human oral cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 58: 887-894.

Annexe 1. Modulation of activated CD8⁺-dependant IDO expression in MDA-231 cells by neutralizing anti-IFN- γ .



Legend: **(A)** The MDA-MB-231 cell line was cultured with various amounts of exogenous rhIFN- γ (1,000; 100; 10; 1 U/ml) to evaluate the blocking threshold of anti-IFN- γ neutralizing antibody. **(B)** MDA-MB-231 was co-cultured with un-activated or anti-CD3-activated CD8⁺ T cells in the presence of anti-IFN- γ antibody or isotype control. **(A-B)** IDO mRNA expression was determined by RT-PCR.

