

Université de Montréal

**Le « Transforming Growth Factor » (TGF)- $\alpha$  comme antigène tumoral potentiel  
pour le cancer du rein**

par  
Sandy Pelletier

Programme de Sciences Biomédicales  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.  
en Sciences Biomédicales

Avril, 2007

©Sandy Pelletier, 2007





Direction des bibliothèques

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
**Le « Transforming Growth Factor » (TGF)- $\alpha$  comme antigène tumoral potentiel  
pour le cancer du rein**

présenté par :  
Sandy Pelletier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Christine Maugard, Ph.D.  
Président-rapporteur

Réjean Lapointe, Ph.D.  
Directeur de recherche

Nathalie Labrecque, Ph.D.  
Membre du jury

## RÉSUMÉ

Les patients atteints de carcinomes du rein (RCC) ont accès à un nombre limité de traitements, d'où l'importance de développer de nouveaux traitements comme par exemple l'immunothérapie. Cependant, très peu d'antigènes tumoraux (AT), les cibles de l'immunothérapie, ont été identifiés à ce jour pour ce type de cancer. Les RCC à cellules claires von Hippel-Lindau (VHL<sup>-/-</sup>RCC) sont caractérisés par des mutations du gène VHL, un gène suppresseur de tumeur, qui entraîne la surexpression du facteur de croissance transformant- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ , de «*transforming growth factor- $\alpha$* »). Ainsi, notre hypothèse est que le TGF- $\alpha$  pourrait être un AT potentiel pour l'immunothérapie du cancer du rein.

Nous avons confirmé l'absence ou la faible expression du TGF- $\alpha$  dans des tissus normaux importants, ainsi que sa surexpression dans 61% des tumeurs rénales par rapport aux tissus sains du rein autologue. De plus, nous avons démontré l'immunogénicité du TGF- $\alpha$ , c'est-à-dire que nous avons établi plusieurs lignées de lymphocytes T spécifiques pour certains peptides du TGF- $\alpha$  présentés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes par l'intermédiaire des molécules du CMH.

Nous avons également étudié la diversité des cellules immunitaires qui infiltrent les RCC (TIIC) et nous avons observé la présence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> avec un phénotype mémoire et activé, ainsi que la présence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, de lymphocytes B et de deux populations de cellules NK.

En conclusion, nous avons démontré que le TGF- $\alpha$  est un AT valide et que ces travaux permettront de développer une immunothérapie ciblée. De plus, nous avons identifié plusieurs populations diversifiées de cellules immunitaires ayant infiltrées les RCC.

**MOTS CLÉS**

Carcinomes du rein (RCC)

«*Transforming growth factor*» (TGF)- $\alpha$

Immunothérapie tumorale

Antigène tumoral

Cellules immunitaires infiltrant les tumeurs (TIIC)

Lymphocytes T

## SUMMARY

Patients suffering from renal cell carcinoma (RCC) have few treatments available, showing the importance of developing new treatments, like immunotherapy. However, few tumor antigens (TA), the targets of immunotherapy, have been identified for this type of cancer. von Hippel-Lindau clear cell RCC (VHL<sup>-/-</sup>RCC) are characterized by mutations in the VHL gene, a tumor suppressor gene. The loss of function of VHL causes the overexpression of transforming growth factor (TGF)- $\alpha$ . Thus, our hypothesis is that TGF- $\alpha$  could be a potential TA for immunotherapy of kidney cancer.

We first confirmed the absence or the weak expression of TGF- $\alpha$  in important normal tissues, as well as its overexpression in 61% of renal tumors in comparison with autologous normal kidney tissues. In addition, we demonstrated the immunogenicity of TGF- $\alpha$ , which means that we have established many T cell lines specific for certain TGF- $\alpha$  peptides that are presented by MHC molecules on the surface of antigen presenting cells.

We also studied the diversity of immune cells infiltrating RCC (TIIC) and we have observed the presence of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes who have memory and activated phenotypes, as well as CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, B lymphocytes and two populations of NK cells.

In conclusion, we have demonstrated that TGF- $\alpha$  is a valide TA and that this work will allow the development of a targeted immunotherapy. Also, we have identified different populations of immune cells that have infiltrated RCC.

**KEY WORDS**

Renal cell carcinoma (RCC)

Transforming growth factor (TGF)- $\alpha$

Tumor immunotherapy

Tumor antigen

Tumor infiltrating immune cells (TIIC)

T lymphocytes



## TABLES DES MATIÈRES

<i>Résumé</i> .....	<i>i</i>
<i>Mots clés</i> .....	<i>ii</i>
<i>Summary</i> .....	<i>iii</i>
<i>Key words</i> .....	<i>iv</i>
<i>Tables des matières</i> .....	<i>v</i>
<i>Liste des figures et tableaux</i> .....	<i>viii</i>
<i>Liste des sigles et des abréviations</i> .....	<i>x</i>
<i>Remerciements</i> .....	<i>xiii</i>
<b>CHAPITRE 1 : Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Le cancer du rein</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Pourquoi l'immunothérapie du cancer du rein?</b> .....	<b>1</b>
<b>1.3 La réponse immunitaire</b> .....	<b>2</b>
1.3.1 La présentation antigénique .....	2
1.3.2 L'activation des lymphocytes T .....	9
1.3.3 La réponse effectrice à médiation cellulaire .....	10
1.3.4 La tolérance centrale et périphérique .....	10
<b>1.4 Les antigènes tumoraux (AT)</b> .....	<b>12</b>
1.4.1 La classification des AT.....	12
1.4.2 Les AT des RCC .....	15
1.4.2.1 Les AT du groupe III .....	15
1.4.2.2 Les AT du groupe IV .....	15
<b>1.5 La surveillance du cancer par le système immunitaire</b> .....	<b>17</b>
<b>1.6 L'historique de l'immunothérapie du cancer du rein</b> .....	<b>17</b>
1.6.1 L'IL-2.....	18
1.6.2 L'IFN- $\alpha$ .....	18
1.6.3 L'immunothérapie à base de lymphocytes.....	19
1.6.3.1 Les cellules NK et « <i>lymphokine-activated killer cells</i> » (LAK).....	19

1.6.3.2 Les lymphocytes activés avec de l'anti-CD3 .....	19
1.6.3.3 Les « <i>tumor infiltrating lymphocytes</i> » (TIL) .....	20
1.6.3.4 La transplantation allogénique .....	20
1.6.4 Les vaccins à base de cellules tumorales ou de cellules dendritiques.....	20
1.6.5 La déplétion des cellules Treg .....	22
1.6.6 Les anticorps bloquants.....	22
<b>1.7 L'étude des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs (TIIC, de <i>tumor infiltrating immune cells</i>) RCC.....</b>	<b>22</b>
1.7.1 Le phénotype des lymphocytes T CD3 <sup>+</sup> parmi les TIIC des RCC.....	23
1.7.2 La diminution des fonctions des CTL parmi les TIIC .....	23
1.7.3 Les RCC sont caractérisés par une infiltration de cellules NK.....	23
<b>1.8 Les CCRCC expriment la protéine von Hippel-Lindau (VHL) mutée .....</b>	<b>24</b>
1.8.1 La maladie de von Hippel-Lindau (VHL).....	24
1.8.2 Le lien entre VHL, HIF- $\alpha$ et TGF- $\alpha$ dans l'oncogénèse des VHL <sup>-/-</sup> RCC .....	26
1.8.3 Le rôle et l'expression du TGF- $\alpha$ .....	28
1.8.3.1 La structure du TGF- $\alpha$ .....	28
1.8.3.2 Le rôle du TGF- $\alpha$ .....	30
1.8.3.3 L'expression du TGF- $\alpha$ dans les tissus normaux humains .....	30
1.8.3.4 L'expression du TGF- $\alpha$ dans le cancer.....	31
1.8.3.5 L'abolition et la sur-expression du TGF- $\alpha$ dans des modèles murins .....	32
1.8.3.6 Le TGF- $\alpha$ mature soluble ou associé à la membrane .....	33
<b>1.9 Hypothèses et objectifs du projet de maîtrise.....</b>	<b>35</b>
<b>CHAPITRE 2 : Matériel et méthodes.....</b>	<b>37</b>
<b>CHAPITRE 3 : Résultats.....</b>	<b>55</b>
<b>3.1 Étude des populations de cellules immunitaires qui infiltrent les cancers du rein .....</b>	<b>55</b>
3.1.1 Phénotype des lymphocytes T.....	55
3.1.2 Caractérisation des autres populations cellulaires CD3 <sup>+</sup> .....	63
3.1.3 Caractérisation des autres leucocytes.....	65
3.1.4 Tumeur bénigne et tissu normal du rein.....	68

<b>3.2 Profil d'expression du TGF-<math>\alpha</math></b> .....	<b>70</b>
3.2.1 Expression du TGF- $\alpha$ dans les tumeurs et tissus normaux du rein.....	70
3.2.1.1 Gènes de référence .....	70
3.2.1.2 Lignées cellulaires.....	72
3.2.1.3 Échantillons cliniques .....	72
3.2.2 Expression du TGF- $\alpha$ dans les organes vitaux .....	75
<b>3.3 Immunogénicité du TGF-<math>\alpha</math></b> .....	<b>77</b>
3.3.1 Recherche de lymphocytes T spécifiques pour le TGF- $\alpha$ parmi les TIIC.....	77
3.3.2 Recherche de lymphocytes T spécifiques pour le TGF- $\alpha$ parmi les TIIC, suite à leur culture selon le protocole de REP .....	80
3.3.3 Recherche de lymphocytes T périphériques spécifiques pour le TGF- $\alpha$ .....	82
3.3.4 Caractérisation d'un clone de lymphocytes T périphériques spécifique au peptide 121-140 du TGF- $\alpha$ .....	86
<b>CHAPITRE 4: Discusssion</b> .....	<b>91</b>
<b>CHAPITRE 4: Discusssion</b> .....	<b>91</b>
<b>4.1 Sommaire des résultats</b> .....	<b>91</b>
<b>4.2 Étude des populations de cellules immunitaires qui infiltrent les RCC</b> .....	<b>92</b>
4.2.1 Phénotype des lymphocytes T.....	92
4.2.2 Caractérisation des autres populations cellulaires CD3 <sup>+</sup> .....	93
4.2.3 Caractérisation des autres leucocytes.....	94
4.2.4 Signification de l'infiltration des TIIC dans les RCC.....	95
<b>4.3 Profil d'expression du TGF-<math>\alpha</math></b> .....	<b>96</b>
<b>4.4 Immunogénicité du TGF-<math>\alpha</math></b> .....	<b>97</b>
<b>4.5 Conclusions</b> .....	<b>99</b>
<b>4.6 Perspectives et potentiel d'exploitation</b> .....	<b>99</b>
4.6.1 Effets immunosuppresseurs médiés par les tumeurs.....	99
4.6.2 Immunothérapie .....	100

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

### CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

<i>Figure 1 : Les complexes majeurs d'histocompatibilité.</i> .....	4
<i>Figure 2 : La structure des molécules de classe I et de classe II du CMH.</i> .....	7
<i>Figure 3 : Présentation de peptides par les molécules de classe I et de classe II du CMH.</i>	8
<i>Figure 4 : Classification des AT selon Gilboa<sup>25</sup>.</i> .....	14
<i>Figure 5 : Structure du pro-TGF-<math>\alpha</math>.</i> .....	29

### CHAPITRE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES

<i>Tableau I: Caractéristiques clinico-pathologiques des patients atteints du cancer du rein</i>	38
<i>Figure 6 : Plan expérimental.</i> .....	39
<i>Tableau II : Liste des anticorps monoclonaux conjugués utilisés en cytométrie de flux.</i> .....	43
<i>Tableau III : Amorces et sondes utilisées en PCR quantitative en temps réel.</i> .....	46
<i>Figure 7 : Peptides synthétiques dérivés du pro-TGF-<math>\alpha</math>.</i> .....	48
<i>Figure 8: Stimulation des PBMC ou des TIIC avec des peptides synthétiques dérivés du TGF-<math>\alpha</math>, afin d'identifier des lymphocytes T spécifiques au TGF-<math>\alpha</math>.</i> .....	51

### CHAPITRE 3: RÉSULTATS

<i>Figure 9 : Étude des lymphocytes T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> et CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> parmi les PBMC et les TIIC.</i> .....	56
<i>Figure 10: Phénotype mémoire et naïf des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>.</i> .....	60
<i>Figure 11: Étude des marqueurs d'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>.</i> .....	62
<i>Figure 12: Caractérisation des autres populations cellulaires CD3<sup>+</sup>.</i> .....	64
<i>Figure 13: Infiltration de lymphocytes B et de cellules NK.</i> .....	66
<i>Tableau IV: Récapitulatif des différentes populations de cellules immunitaires parmi les PBMC et les TIIC.</i> .....	67
<i>Figure 14: Étude des cellules immunitaires infiltrant les tissus normaux du rein.</i> .....	69

<i>Figure 15 : Évaluation de la <math>\beta</math>-actine, de l'ARN polymérase II et de la sous-unités 18S du ribosome comme gène de référence.</i> .....	71
<i>Figure 16: Expression relative du TGF-<math>\alpha</math> dans les tumeurs et tissus normaux du rein.</i> .....	74
<i>Figure 17: Expression du TGF-<math>\alpha</math> dans les organes vitaux.</i> .....	76
<i>Figure 18: Les THIC du patient #19 sont spécifiques pour le peptide 101-120 du TGF-<math>\alpha</math>.</i> 79	
<i>Tableau V : Récapitulatif des patients pour lesquels des lymphocytes T spécifiques pour le TGF-<math>\alpha</math> ont été identifiés, parmi les THIC cultivées selon le protocole de REP.</i> .....	81
<i>Tableau VI: Récapitulatif des patients pour lesquels des lymphocytes T périphériques spécifiques pour le TGF-<math>\alpha</math> ont été identifiés.</i> .....	83
<i>Figure 19: Des lymphocytes T du patient #1 reconnaissent le peptide 131-150 du TGF-<math>\alpha</math>.</i> 85	
<i>Figure 20: Caractérisation de lymphocytes T spécifiques pour le peptide 121-140 du TGF-<math>\alpha</math>.</i> .....	87
<i>Figure 21 : Isolement d'un clone spécifique pour le peptide 121-140 du TGF-<math>\alpha</math>.</i> .....	89

## **LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS**

**7-AAD**, 7-amino-actinomycin D

**ADNc**, acide désoxyribonucléique complémentaire

**AEC**, 3-amino-9-éthyl-carbazole

**AJCC**, « *American Joint Committee on Cancer* »

**APC**, allophycocyanin

**ARN**, acide ribonucléique

**ARNm**, ARN messenger

**AT**, antigène tumoral

**BAGE**, « *B melanoma antigen* »

**BSA**, albumine de sérum bovin

**CA IX**, anhydrase carbonique IX

**CCRCC**, carcinome à cellules claires du rein (*clear cell renal cell carcinoma*)

**CD**, « *cluster of differentiation* »

**CEA**, antigène carcinoembryonique

**CHUM**, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

**CMH**, molécules du complexe majeur d'histocompatibilité

**CPA**, cellule présentatrice d'antigènes

**CTL**, lymphocyte T cytotoxique effecteur

**CTLA-4**, « *cytotoxic T lymphocyte antigen 4* »

**CUSM**, Centre Universitaire de Santé McGill

**DMEM**, « *Dulbecco's modified Eagle's medium* »

**EBV**, virus Epstein Barr

**EBV-B**, lymphocytes B immortalisés par EBV

**EGFR**, « *epidermal growth factor receptor* »

**ELISA**, « *enzyme-linked immunosorbent assay* »

**ELISPOT**, essai «*enzyme-linked immunosorbent spot*»

**FBS**, sérum bovin fœtal

**FCS**, sérum fœtal de veau

**FITC**, fluorescein isothiocyanate

**g**, gramme

**Glut-1**, « *glucose transporter-1* »

**GM-CSF**, facteur de stimulation de colonies spécifique de la lignée granulocyte-macrophage

**h**, heure

**HIF**, « *hypoxia-inducible factor* »

**HLA**, antigène des leucocytes humains

**HPV**, virus du papillome humain

**HSP**, « *heat-shock protein* »

**hTERT**, « *human telomerase reverse transcriptase* »

**IFN**, interféron

**Ig**, immunoglobuline

**IL**, interleukine

**KIR**, « *killer immunoglobulin-like receptor* »

**l**, litre

**LAK**, « *lymphokine-activated killer cells* »

**m**, milli

**M**, molaire

**mAb**, anticorp monoclonal

**MAGE**, « *melanoma antigen family* »

**min**, minute

**MUC1**, « *mucin 1* »

**n**, nano

**NCI/NIH**, « *National Cancer Institute/National Institutes of Health* »

**NK**, cellules « *natural killer* »

**OFA-iLR**, « *onco-foetal antigen immature laminin receptor* »

**pb**, paire de bases

**PBMC**, cellules mononucléées du sang périphérique

**PBS**, « *phosphate-buffered saline* »

**PD1**, « *programmed cell death 1* »

**PE**, R-phycoerythrin

**PRAME**, « *preferentially expressed antigen in melanoma* »

**pro-TGF- $\alpha$** , précurseur du TGF- $\alpha$

**PSA**, « *prostate specific antigen* »

**pTNM**, stade pathologique; taille; métastases aux ganglions lymphatiques régionaux; métastases éloignées

**pVHL**, protéine VHL

**RAGE-1**, « *renal tumor antigen* »

**RCC**, carcinomes du rein

**REP**, protocole d'expansion rapide

**RT-PCR**, transcription inverse-réaction en chaîne de la polymérase

**TACE/ADAM17**, « *tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -converting enzyme/disintegrin and metalloproteinase 17* »

**T<sub>C</sub>**, lymphocytes T cytotoxiques

**TCR**, récepteur des lymphocytes T

**TGF**, « *transforming growth factor* »

**T<sub>H</sub>**, lymphocytes T auxiliaires

**TIIC**, cellules immunitaires infiltrant les tumeurs (*tumor infiltrating immune cells*)

**TIL**, « *tumor infiltrating lymphocytes* »

**TNF**, « *tumor necrosis factor* »

**Treg**, lymphocytes T régulateurs

**U**, unité

**UI**, unité internationale

**VBC/cul-2**, complexe composé des protéines elongin B, elongin C, cullin-2 et Rbx-1

**VEGF**, « *vascular endothelial growth factor* »

**VEGFR**, « *vascular endothelial growth factor receptor* »

**VHL**, von Hippel-Lindau

**VHL<sup>-/-</sup>RCC**, carcinome à cellules claires du rein portant des mutations au niveau du gène VHL

**$\alpha$** , alpha

**$\beta$** , bêta

**°C**, degré Celsius

**$\delta$** , delta

**$\gamma$** , gamma

**$\mu$** , micro

**%**, pourcentage



## **REMERCIEMENTS**

Je tiens d'abord et avant tout, à remercier mon directeur de recherche, Dr Réjean Lapointe, pour m'avoir guidé tout au long de ma maîtrise, mais également pour son support, sa confiance en moi et sa grande disponibilité.

Je désire remercier en particulier deux collègues de travail, Marie-Andrée Forget et Jessica Godin-Ethier, qui m'ont supporté du début à la fin de mon projet dans le laboratoire. Je remercie également tous mes collègues présents et passés, Stéphanie Lepage, Simon Turcotte, Diane Beauseigle, Urszula Krzemien, Simon Picard, Martin Lapiere et Francis Langlois, pour leurs encouragements et pour tous les beaux moments passés ensemble. Je veux aussi remercier mes collaborateurs Dr Simon Tanguay à l'Hôpital Général de Montréal et Dr Stephen Lee à l'Université d'Ottawa pour leur aide précieuse qui a grandement contribué à la réalisation de mon projet. Finalement, je remercie tous les étudiants et les membres du personnel de l'Institut du cancer de Montréal (ICM) et du centre de recherche du CHUM de l'Hôpital Notre-Dame.

Je remercie également les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC), l'ICM, Canderel, le centre de recherche du CHUM, ainsi que le programme de Sciences Biomédicales de l'Université de Montréal pour leur support financier.

Finalement, je remercie mes parents qui m'ont supporté et toujours encouragé à poursuivre mes études. Je remercie également ma famille et mes amis pour leur écoute, leur support et surtout pour avoir été là pour moi.

## **CHAPITRE 1 : INTRODUCTION**

### **1.1 Le cancer du rein**

Selon les statistiques canadiennes sur le cancer<sup>1</sup>, 4600 nouveaux cas de cancers du rein et 1550 décès sont estimés au Canada pour 2006. Les carcinomes du rein (RCC, de *renal cell carcinoma*) sont responsables d'environ 90-95% des tumeurs malignes du rein<sup>2</sup> avec un ratio de presque 2 hommes pour 1 femme. Au moment du diagnostic, 25-30% des patients présentent déjà des métastases et 95% d'entre eux sont atteints de métastases multiples. Les patients se présentant avec une tumeur localisée au rein sont traités par chirurgie, mais 20-30% d'entre eux développeront des métastases suite à cette chirurgie<sup>3</sup>. La survie à 5 ans des patients atteints du cancer du rein est de 60%, alors qu'elle chute à 10% pour les patients atteints de métastases<sup>3</sup>. Les tumeurs primaires comme les métastases sont chimio-<sup>4</sup> et radio-résistantes. Les RCC et les mélanomes ont fait l'objet de la majorité des recherches en immunothérapie, mais les réponses obtenues n'ont été que partielles. En effet, les RCC métastatiques sont traités par l'administration de deux molécules, soit l'interleukine-2 (IL-2) et l'interféron- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), qui agissent sur le système immunitaire. Cependant, seulement 10-20% des patients ont une réponse clinique objective et ces traitements entraînent de nombreux effets secondaires. Finalement, les patients atteints de RCC sont limités quant au nombre de traitements disponibles, d'où l'importance de développer de nouvelles stratégies en immunothérapie qui consiste à stimuler le système immunitaire à reconnaître et tuer les cellules tumorales.

### **1.2 Pourquoi l'immunothérapie du cancer du rein?**

Il y a deux observations décrites dans la littérature qui démontrent que le système immunitaire est impliqué dans la régression, plus particulièrement, des RCC. Premièrement, plusieurs études cliniques randomisées ont rapporté des régressions spontanées de RCC métastatiques chez 1-6% des patients du groupe placebo<sup>5</sup>. Ce phénomène est plus fréquent dans les RCC que dans toutes autres tumeurs solides même si la majorité des cas rechutent<sup>6</sup>. Ceci laisse croire que le système immunitaire est capable en partie, de contrôler l'évolution de ces tumeurs.

Deuxièmement, deux études cliniques ont démontré que la néphrectomie totale, donc l'ablation du rein tumoral, suivie d'une immunothérapie par IFN- $\alpha$  chez les patients atteints de RCC métastatiques, pouvait augmenter la durée de survie<sup>7,8</sup>. Le mécanisme responsable n'est pas connu, mais beaucoup de gens ont posé l'hypothèse que la tumeur primaire pourrait avoir des effets immunosuppresseurs et ainsi supprimer une réponse immunitaire anti-tumorale.

### 1.3 La réponse immunitaire

Le système immunitaire est un système de défense qui protège contre les micro-organismes et potentiellement le cancer. L'immunité est à la fois non-spécifique et spécifique. La composante non-spécifique appelée immunité innée est un ensemble de mécanismes qui ne sont pas spécifiques d'un pathogène particulier. La composante spécifique est appelée immunité acquise et elle est capable de reconnaître et d'éliminer sélectivement des antigènes étrangers.

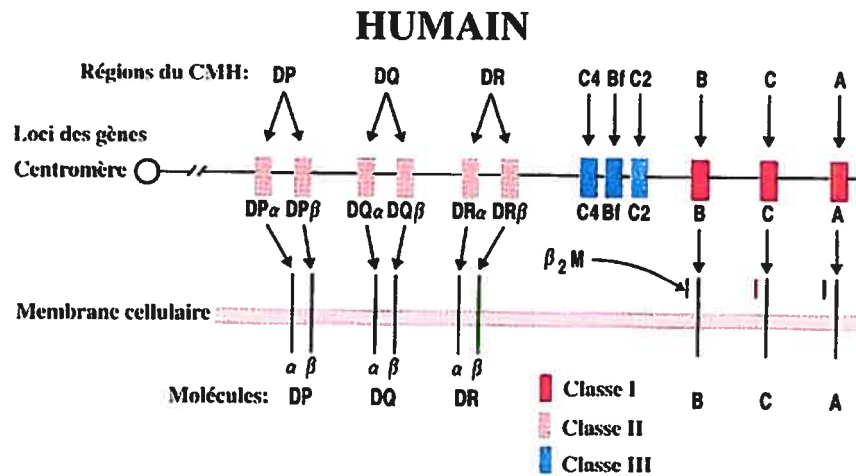
Il existe deux types de réponse immunitaire acquise, soit la réponse immunitaire humorale et la réponse à médiation cellulaire. La première est caractérisée par l'élimination d'antigènes par des anticorps sécrétés par des lymphocytes B. Pour sa part, la réponse à médiation cellulaire repose sur la production de cellules spécialisées qui tuent la cellule présentant l'antigène étranger. Les cellules essentielles à la réponse à médiation cellulaire sont les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) que sont les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B.

#### 1.3.1 La présentation antigénique

D'un point de vue fonctionnel, il y a deux sous-populations bien définies de lymphocytes T. Les lymphocytes T auxiliaires ( $T_H$ , de *helper*) expriment généralement la molécule de surface CD4, alors que les lymphocytes T cytotoxiques ( $T_C$ , de *cytotoxic*) se distinguent habituellement par la présence de la molécule CD8. Le récepteur des lymphocytes T (TCR, de *T cell receptor*) qui est la molécule de liaison à l'antigène

spécifique, ne peut reconnaître un antigène que lorsque ce dernier est lié aux protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface cellulaire.

Les gènes du CMH codent pour des molécules qui appartiennent au système HLA (*Human Leukocyte Antigen*). Il existe trois classes de gènes qui s'assemblent pour former des molécules différentes, soit le CMH de classe I, II et III (figure 1). Chez l'humain, on retrouve trois loci (HLA-A, B et C) parmi les gènes des CMH de classe I et trois loci (HLA-DR, DP, DQ) parmi les gènes des CMH de classe II. La plupart de ces gènes sont très polymorphiques et chaque allèle est exprimé en co-dominance. Il en résulte une grande diversité au sein d'une même espèce. Les gènes des CMH de classe III codent diverses protéines qui ont des fonctions immunitaires, parmi lesquelles figurent des facteurs du système du complément et des molécules impliquées dans l'inflammation.



Tiré de Benjamini *et al.* Immunology : a short course<sup>9</sup>.

*Figure 1 : Les complexes majeurs d'histocompatibilité.*

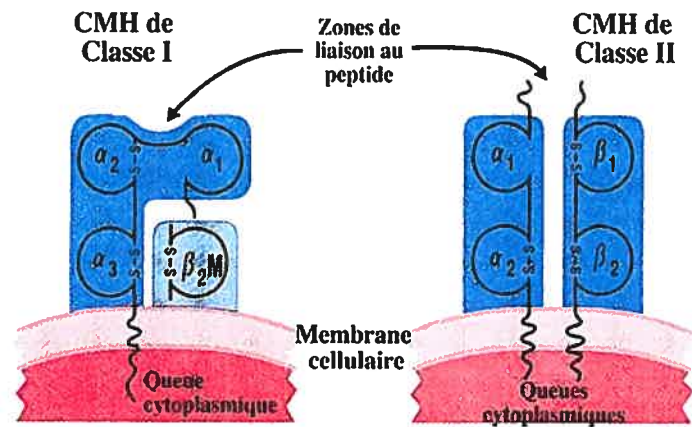
Il existe trois loci parmi les gènes des CMH de classe I (HLA-A, B, C) et trois loci parmi les gènes des CMH de classe II. Diverses protéines sont codées par les gènes des CMH de classe III, telles que C2, C4 et Bf qui sont des facteurs du système du complément.

Les molécules de classe I du CMH sont constituées d'une chaîne lourde ( $\alpha$ ) associée à une petite protéine appelée la  $\beta_2$ -microglobuline (figure 2). La partie extracellulaire de la chaîne lourde est organisée en trois domaines globulaires, soit  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$ . Les domaines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  sont des régions variables et forment la cavité de liaison au peptide, alors que le domaine  $\alpha_3$  semble hautement conservé.

Les molécules de classe I sont exprimées à la surface de pratiquement toutes les cellules nucléées, donc les CMH des cellules saines de l'organisme lient des peptides dérivés de protéines intracellulaires du soi. Par contre, les cellules du soi altérées, comme une cellule infectée par un virus ou une cellule tumorale, présenteront par l'intermédiaire d'une molécule de classe I du CMH, des peptides viraux ou tumoraux. Ces peptides sont donc des antigènes endogènes, puisqu'ils sont produits à l'intérieur de la cellule hôte. Les protéines intracellulaires marquées pour la protéolyse sont liées à une protéine nommée ubiquitine et sont dégradées en petits peptides par un complexe cytosolique de protéases appelé protéasome (figure 3a). Les peptides sont alors transloqués par un transporteur appelé TAP à partir du cytosol jusqu'au réticulum endoplasmique rugueux, où les peptides de 8 à 10 acides aminés qui ont une grande affinité se lieront aux molécules de classe I du CMH. Le polymorphisme des gènes codant pour les molécules de classe I du CMH entraîne différentes affinités pour différents peptides. Lorsque le peptide est finalement lié au CMH, ce complexe se dirige vers le Golgi pour être exprimé à la surface de la cellule. Les lymphocytes T  $CD8^+$  sont en mesure de reconnaître et d'entrer en interaction avec les peptides présentés par les molécules de classe I du CMH<sup>10</sup>.

Pour leur part, les molécules de classe II du CMH sont des hétérodimères constitués d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  (figure 2). Les molécules de classe II sont exprimées de façon constitutive par les CPA, mais elles peuvent également être exprimées par les lymphocytes T activés et être induites par l'IFN- $\gamma$  chez d'autres types de cellules. Contrairement aux molécules de classe I du CMH, elles lient des antigènes exogènes donc qui sont produits à l'extérieur de la cellule hôte (venant du soi ou du non soi). Ces antigènes sont internalisés dans les cellules hôtes, soit par endocytose médiée par un récepteur (c'est le cas des lymphocytes B) ou par phagocytose (c'est le cas des macrophages et des cellules dendritiques). Une fois internalisé dans les CPA, les antigènes

sont dégradés en peptides dans la voie d'apprêtement endocytaire (figure 3b). Trois compartiments semblent être impliqués dans cette voie, chacun d'eux contenant un pH de plus en plus bas et des protéases, dont les cathepsines, qui dégraderont les antigènes en peptides d'environ 13 à 18 résidus. Les molécules de classe II du CMH sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique rugueux et sont associées à une chaîne invariante qui empêche les protéines endogènes de se lier à la cavité de liaison des molécules de classe II. Ce complexe se dirige ensuite vers le Golgi et la voie d'apprêtement endocytaire. L'activité protéolytique des endosomes dégrade la chaîne invariante, mais un court fragment de cette chaîne, appelé CLIP, reste lié à la molécule de classe II du CMH. Le CLIP empêche toute liaison prématurée du peptide antigénique. Finalement, une molécule de classe II du CMH non-classique, appelée HLA-DM, catalyse l'échange du CLIP et des peptides antigéniques. Les complexes peptides-molécules de classe II du CMH seront ensuite transportés vers la membrane plasmique de la cellule pour être présentés aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> 10.

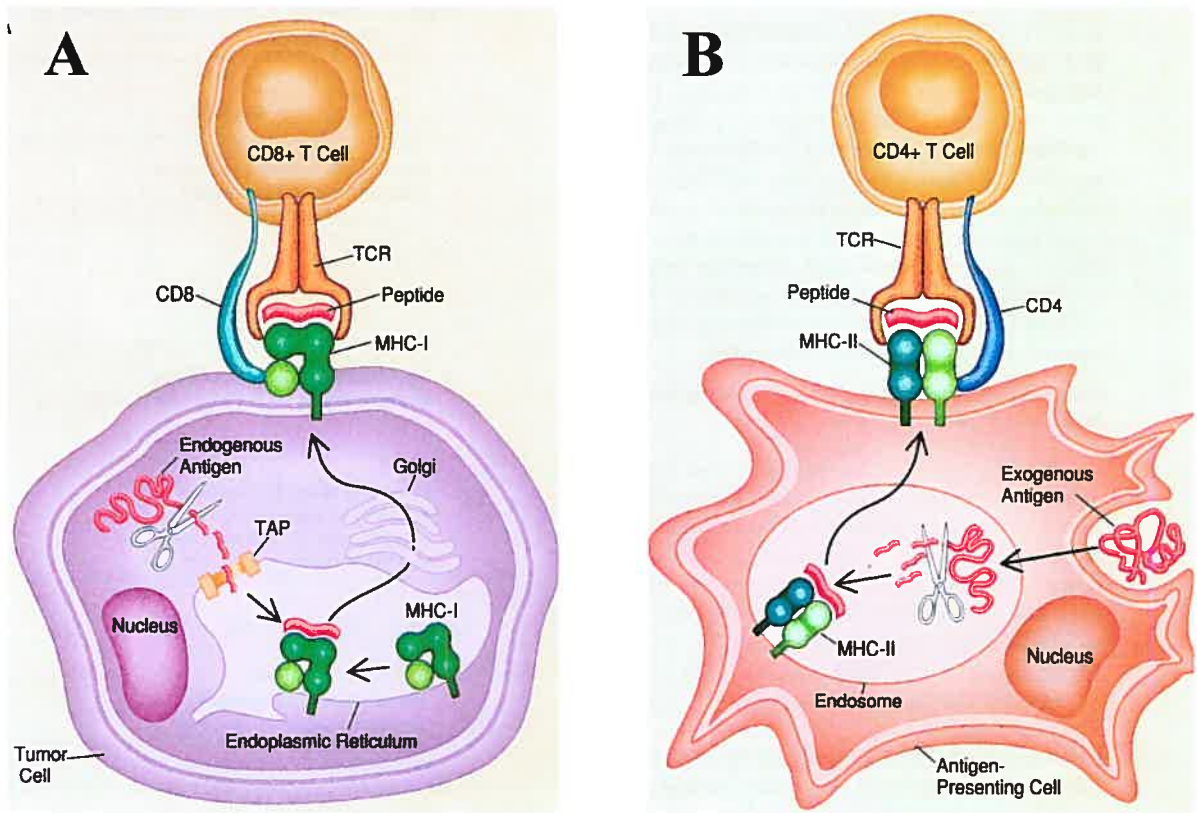


Tiré de Benjamini *et al.* Immunology : a short course<sup>9</sup>.

*Figure 2 : La structure des molécules de classe I et de classe II du CMH.*

Les molécules de classe I du CMH sont composées d'une chaîne  $\alpha$  et de la  $\beta_2$ -microglobuline, et ce sont les domaines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  qui forment la zone de liaison au peptide. Les molécules de classe II du CMH sont composées d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$ , et ce sont les domaines  $\alpha_1$  et  $\beta_1$  qui forment la zone de liaison au peptide.





Tiré de Rosenberg *et al.* The Cancer Journal from Scientific American<sup>11</sup>

*Figure 3 : Présentation de peptides par les molécules de classe I et de classe II du CMH.*

a) Les protéines endogènes sont dégradées en peptides qui sont à leur tour transportés dans le réticulum endoplasmique pour se lier aux molécules de classe I du CMH. Ce complexe est transporté à la surface de la cellule pour être présenté aux lymphocytes T<sub>C</sub>.

b) Les protéines exogènes sont captées par les CPA, puis dégradées en peptides qui peuvent se lier aux molécules de classe II du CMH dans les endosomes pour ainsi être présentés aux lymphocytes T<sub>H</sub> à la membrane plasmique.

### 1.3.2 L'activation des lymphocytes T

Les précurseurs lymphoïdes communs sont formés par un processus nommé hématopoïèse au niveau de la moelle osseuse. Certains de ces précurseurs quittent la moelle osseuse pour gagner le thymus où ils deviennent des lymphocytes T matures. Lorsqu'un lymphocyte T devient mature, il est appelé naïf s'il n'a pas encore rencontré l'antigène pour lequel son TCR est spécifique. Ces lymphocytes résident dans les tissus lymphoïdes secondaires, comme par exemple les ganglions lymphatiques. Si un lymphocyte T naïf ne reconnaît pas d'antigènes spécifiques, il sort du tissu lymphoïde et rejoint le sang. Ces lymphocytes continuent à re-circuler entre les systèmes lymphatique et sanguin. Finalement, lorsqu'une cellule T CD4<sup>+</sup> naïve reconnaît un antigène lié à une molécule de classe II du CMH à la surface d'une CPA, elle devient activée. L'interaction du complexe TCR-CD3 et d'un peptide antigénique envoie un signal initial au lymphocyte T<sub>H</sub>. Par contre, l'activation complète nécessite un signal ultérieur produit par l'interaction du CD28 du lymphocyte T et du CD80 et CD86 de la CPA. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés initient une réponse immunitaire primaire. Après l'activation, il y a transcription de gènes qui contribuent au maintien du signal de co-stimulation, comme le CD40L (CD154), mais également des gènes de l'IL-2 et de la chaîne  $\alpha$  du récepteur de haute affinité de l'IL-2 (CD25). L'effet de l'IL-2 induit la cellule à proliférer afin de donner un clone de cellules de la même spécificité antigénique que la cellule parentale d'origine. Ces cellules se différencient ensuite en cellules effectrices ou en cellules T<sub>H</sub> à mémoire. Il existe deux sous-populations de cellules T CD4<sup>+</sup> effectrices. La première est appelée sous-population T<sub>H1</sub> et elle sécrète, entre autres, de l'IL-2, de IFN- $\gamma$  et du facteur de stimulation de colonies spécifique de la lignée granulocyte-macrophage (GM-CSF). Le rôle principal des cellules T<sub>H1</sub> est d'activer les macrophages<sup>12</sup>. La deuxième sous-population est appelée sous-population T<sub>H2</sub> et elle sécrète des cytokines en mesure d'activer les lymphocytes B qui sont les cellules effectrices de l'immunité humorale. En ce qui concerne les cellules T<sub>H</sub> à mémoire, elles sont activées par l'antigène, semblent avoir une longue durée de vie et sont responsables d'une réponse secondaire lors d'une rencontre ultérieure avec le même antigène. Cette réponse secondaire est plus rapide et plus forte<sup>10</sup>.

Lors d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire, les lymphocytes  $T_C$  sont activés de la même façon que les lymphocytes  $T_H$ , c'est-à-dire lorsqu'ils reconnaissent un antigène lié à une molécule de classe I du CMH à la surface d'une cellule du soi altérée. Cependant, les cytokines sécrétées par les lymphocytes  $T_H$  activés sont nécessaires pour la prolifération et la différenciation des cellules  $T_C$  en lymphocytes T cytotoxiques (CTL, de *cytotoxic T lymphocyte*) et en lymphocytes T à mémoire. Les CTL sont capables de provoquer des lésions à la membrane des cellules du soi altérées<sup>10</sup>.

### 1.3.3 La réponse effectrice à médiation cellulaire

Tels que décrits dans les paragraphes précédents, les lymphocytes  $T_H$  et les CTL sont impliqués dans la réponse effectrice à médiation cellulaire. Cependant, d'autres cellules du système immunitaire jouent également un rôle dans cette réponse. Ce sont des cellules non spécifiques à un antigène particulier, comme par exemple les cellules NK (de *natural killer*) et d'autres cellules non lymphoïdes. Il existe deux populations distinctes de cellules NK, soit celles qui expriment à leur surface les marqueurs  $CD56^{\text{dim}}$  (faible expression) $CD16^+$  et celles qui expriment  $CD56^{\text{bright}}$  (forte expression) $CD16^-$ . Les cellules  $CD56^{\text{dim}}CD16^+$  représentent 90% des cellules NK et elles sont capables de tuer des cellules infectées par un virus et des cellules tumorales qui ont une expression diminuée des CMH de classe I, en provoquant des lésions à la membrane cellulaire. Les cellules  $CD56^{\text{bright}}CD16^-$  représentent seulement 10% des cellules NK et elles sécrètent de nombreuses cytokines telles que l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  (de *tumor necrosis factor*)<sup>10</sup>. Les fonctions effectrices des cellules NK sont gérées par de nombreux récepteurs activateurs, tels que le NKG2D, et récepteurs inhibiteurs, tels que les « *killer immunoglobulin-like receptor* » (KIR)<sup>13</sup>. Sur une même cellule, plusieurs de ces récepteurs peuvent se lier à leur ligand en même temps, mais c'est la somme des signaux positifs et négatifs qui détermineront si la cellule NK effectuera ses fonctions effectrices ou non.

### 1.3.4 La tolérance centrale et périphérique

Deux mécanismes sont responsables de l'élimination des pathogènes par le système immunitaire sans causer de dommages aux tissus normaux de l'organisme. Le premier se

nomme tolérance centrale et a lieu au niveau du thymus. La tolérance centrale sert à sélectionner les lymphocytes T capables de se lier aux molécules du CMH et à éliminer ceux qui reconnaissent des antigènes du soi. L'élimination des lymphocytes T auto-réactifs explique en partie la tolérance aux auto-antigènes.

Cependant, ce mécanisme de tolérance centrale n'est pas capable à lui seul d'éliminer tous les lymphocytes T auto-réactifs. En effet, la présence de lymphocytes T spécifiques pour des antigènes du soi a été démontrée chez des individus en santé<sup>14,15</sup>. Par exemple, certains lymphocytes de faible avidité, c'est-à-dire qui se lient aux CPA avec une faible force de liaison, ne seront pas éliminés dans le thymus<sup>16</sup>. De plus, certains antigènes du soi spécifiques d'un tissu normal ne seront pas exprimés dans le thymus via le facteur de transcription AIRE<sup>17</sup>. Par conséquent, les lymphocytes T de faible ou forte avidité spécifiques pour ces antigènes du soi ne seront pas éliminés dans le thymus, donc persisteront parmi la population de lymphocytes T matures.

De plus, des lymphocytes T spécifiques pour des antigènes du soi peuvent être retrouvés dans la circulation sanguine à cause de la réactivité-croisée du complexe TCR-peptide-CMH<sup>18-20</sup>. C'est-à-dire que le TCR d'un lymphocyte T peut reconnaître plusieurs peptides divergents. En d'autres mots, un lymphocyte T qui reconnaît un peptide bactérien ou viral peut également reconnaître un peptide du soi. Par conséquent, ce lymphocyte activé suite à une infection par un pathogène peut potentiellement causer des troubles d'auto-immunité.

Les lymphocytes T qui échappent à la tolérance centrale, ainsi que le phénomène de réactivité-croisée, peuvent causer des maladies auto-immunes, mais un autre mécanisme de tolérance prévient ce genre de pathologies, soit la tolérance périphérique. Différents mécanismes peuvent contribuer à la tolérance périphérique. Parmi ces mécanismes, il existe une population de lymphocytes T régulateurs (Treg) qui suppriment l'activation, la prolifération et/ou les fonctions effectrices des autres lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+21</sup>.

En conclusion, les différents mécanismes de tolérance périphérique contribuent à prévenir les maladies auto-immunes, en supprimant physiquement ou fonctionnellement les

lymphocytes T auto-réactifs qui ont échappé à la tolérance centrale. Cependant, ces lymphocytes T auto-réactifs, même ceux de faible avidité, peuvent être activés sous des conditions appropriées, telles que l'exposition constante ou une forte concentration d'antigènes<sup>16,22,23</sup>.

#### 1.4 Les antigènes tumoraux (AT)

Il y a environ 30 ans, on doutait de la faisabilité de l'immunothérapie du cancer, puisque les cellules tumorales n'étaient pas suffisamment distinctes des cellules normales pour que le système immunitaire les reconnaisse<sup>24</sup>. Plus tard, d'autres recherches ont démontré qu'une réponse immunitaire protectrice pouvait être générée contre des tumeurs murines non-immunogéniques, prouvant que le manque d'immunogénicité est dû à l'incapacité de la tumeur à activer le système immunitaire plutôt qu'à l'absence d'AT<sup>25</sup>. Selon Romero *et al.*<sup>26</sup>, un AT est une protéine exprimée par les cellules tumorales, mais absente ou faiblement exprimée par les cellules saines de l'organisme. De plus, l'AT doit être immunogénique, c'est-à-dire qu'il doit être reconnu par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>, et être idéalement essentiel à la survie des cellules tumorales. Les AT peuvent être utilisés comme cible lors de l'immunothérapie du cancer.

##### 1.4.1 La classification des AT

Il existe plusieurs façons de classer les antigènes tumoraux, mais voici celle proposée par Gilboa<sup>27</sup> (figure 4). Le groupe I représente des AT qui sont apparus suite à des mutations somatiques dans des gènes normaux. Ces mutations sont dues à l'instabilité génétique des cellules tumorales et elles ne permettent pas l'initiation de la carcinogenèse, mais elles pourront éventuellement être impliquées directement ou indirectement dans la progression tumorale et dans le processus métastatique. Ces AT sont donc spécifiques aux patients et ne représentent qu'une petite fraction des AT identifiés à présent. Le groupe II représente des AT absents des tissus normaux et présents chez plusieurs patients. Ce groupe peut être divisé en deux sous-groupes. Le premier représente des AT apparus suite à des mutations somatiques dans des gènes normaux qui permettent l'initiation de la carcinogenèse. Par conséquent, ces AT peuvent être partagés entre les patients. Par

exemple, la protéine p53 mutée est exprimée chez certains patients atteints d'un cancer colorectal, des poumons, de la vessie ou de la tête et du cou<sup>28</sup>. Le deuxième sous-groupe du groupe II représente des antigènes viraux présents dans les cancers d'étiologie virale, tels que les lymphomes induits par le virus Epstein Barr (EBV) et les cancers cervicaux causés par le virus du papillome humain (HPV). Le groupe III représente des protéines normales qui ont une expression très restreinte. Certaines de ces protéines sont exprimées uniquement dans les cellules germinales, comme par exemple les familles « *melanoma antigen family* » (MAGE) et « *B melanoma antigen* » (BAGE) qui peuvent être exprimées chez certains patients souffrant du mélanome, du cancer gastrique, du sein, de la vessie, des poumons ou de la tête et du cou<sup>28</sup>. D'autres protéines de ce groupe sont exprimées lors du développement embryonnaire ou fœtal et réapparaissent dans certains cancers, comme par exemple l'antigène carcinoembryonique (CEA) dans le cancer du colon, du sein et du pancréas<sup>28</sup>. Finalement, le groupe IV regroupe des protéines normales exprimées dans certains tissus sains. Plusieurs antigènes de différenciation ont été identifiés pour le mélanome, tels que MART-1, gp100 et tyrosinase. Il y a également dans cette catégorie, des protéines normales sur-exprimées dans les cellules tumorales, comme par exemple la « *prostate specific antigen* » (PSA) dans le cancer de la prostate et Her2/neu dans le cancer du sein, de l'ovaire et du poumon<sup>28</sup>.

En théorie, les antigènes des groupes I et II sont des meilleurs AT, puisqu'ils n'engendrent pas de tolérance immunitaire. C'est-à-dire que les lymphocytes T<sub>H</sub> et T<sub>C</sub> spécifiques pour ces antigènes devraient être présents dans la circulation sanguine et prêts à déclencher une réponse immunitaire contre les cellules tumorales exprimant l'AT. Les antigènes du groupe III ont probablement induit une certaine tolérance, mais à un moindre degré que ceux du groupe IV. Il ne faut toutefois pas oublier qu'avec un bon protocole d'immunisation, il est possible d'activer ces lymphocytes T de plus faible avidité et d'engendrer une réponse immunitaire effectrice.

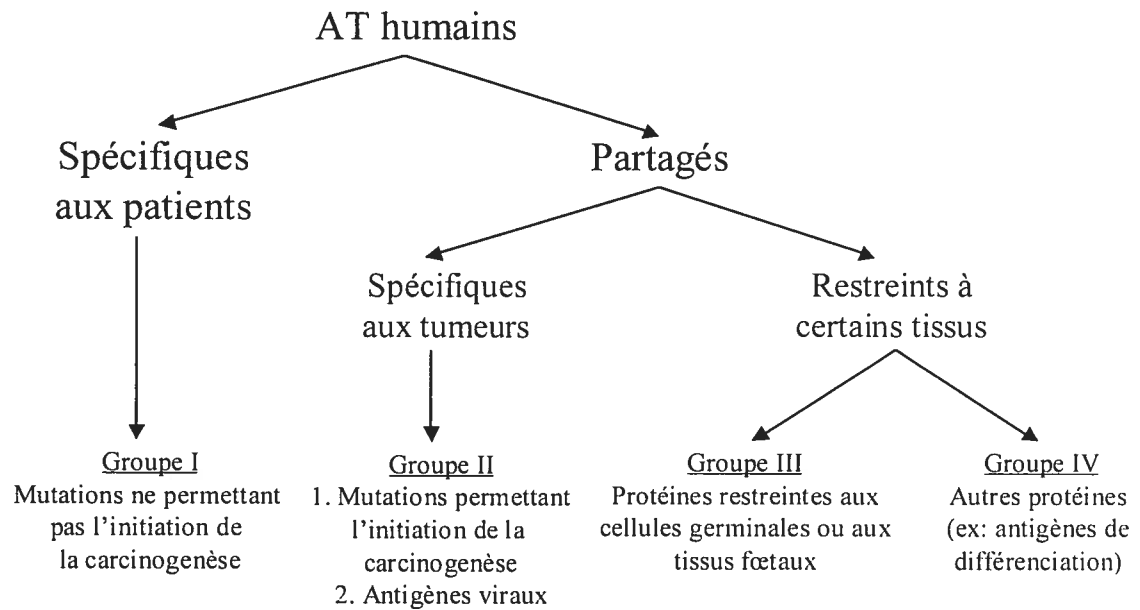


Figure 4 : Classification des AT selon Gilboa<sup>27</sup>.

Les AT du groupe I ne permettent pas l'initiation de la carcinogenèse, alors que ceux du groupe II le permettent. Le groupe III regroupe des AT dont l'expression est restreinte aux cellules germinales ou aux tissus fœtaux. Les AT du groupe IV sont également restreints à certains tissus et sont principalement des antigènes de différenciation ou des protéines normales sur-exprimées dans certains cancers.

## 1.4.2 Les AT des RCC

Jusqu'à présent, près de 20 protéines ont été suggérées comme étant des AT pour les RCC. La grande majorité d'entre eux se classent parmi les groupes III et IV.

### 1.4.2.1 Les AT du groupe III

Tels que mentionné, certains AT du groupe III sont absents des tissus normaux de l'organisme à l'exception des cellules germinales. Parmi ce groupe, nous retrouvons la famille des MAGE, « *renal tumor antigen* » (RAGE-1), « *preferentially expressed antigen in melanoma* » (PRAME) et « *human telomerase reverse transcriptase* » (hTERT). Parmi la famille des MAGE, MAGE-3<sup>29</sup> est exprimé dans 76% des RCC, alors que MAGE-9<sup>30</sup> est exprimé dans 38% des RCC. Pour leur part, RAGE-1 et PRAME sont exprimés dans 56%<sup>30</sup> et 40%<sup>31</sup> des RCC. Finalement, hTERT qui a comme rôle de maintenir la fonction des télomères, est un AT universel puisqu'il est exprimé dans plus de 80% de tous les cancers et dans 83% des RCC. Son expression est majoritairement restreinte aux cellules germinales, mais possiblement dans certaines cellules souches également<sup>32</sup>.

D'autres AT du groupe III sont uniquement impliqués dans le développement embryonnaire ou fœtal. Les protéines Survivin et « *onco-fœtal antigen immature laminin receptor* » (OFA-iLR) sont des AT universels<sup>33</sup> puisqu'ils sont exprimés dans de nombreux cancers, incluant les RCC. Survivin est membre de la famille des inhibiteurs d'apoptose et il est exprimé dans 31% des RCC<sup>34</sup>, alors que OFA-iLR est une protéine multi-fonctionnelle et son expression a été démontrée dans 100% des échantillons de RCC (n = 13)<sup>35</sup>.

### 1.4.2.2 Les AT du groupe IV

Parmi les AT du groupe IV, c'est-à-dire des protéines normales sur-exprimées par les cellules tumorales, il y a l'anhydrase carbonique IX (CA IX). Il y a environ 20 ans, un groupe de recherche a démontré que l'anticorps monoclonal G250 était capable de reconnaître un antigène exprimé à la surface de presque toutes les cellules de RCC, ainsi



que les métastases, mais absent de tissus normaux du rein<sup>36</sup>. Le même groupe de recherche a plus tard observé que cet AT était plus particulièrement exprimé dans les RCC à cellules claires (CCRCC, de *clear cell renal cell carcinoma*) et qu'il était également présent au niveau de l'estomac et du canal biliaire normal<sup>37</sup>. Cet AT a finalement été identifié comme étant la CA IX<sup>38</sup>. Son expression est généralement induite par l'hypoxie et son rôle est d'hydrater le dioxyde de carbone afin de faciliter l'extrusion des protons de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule. La CA IX est également exprimée par d'autres types de cancer, tels que le cancer du sein<sup>39</sup>, du poumon<sup>40</sup>, puis de la tête et du cou<sup>41,42</sup>.

Le proto-oncogène HER-2/*neu* (c-erbB2) est sur-exprimé dans plusieurs carcinomes et dans 30-40% des RCC, indépendamment du grade et du stade de la tumeur<sup>43</sup>. Lorsque cette protéine trans-membranaire est amplifiée dans les cellules tumorales, la dé-régulation de la cascade de signaux intracellulaires contribue à la transformation oncogénique.

La protéine « *mucin 1* » (MUC1) est une protéine trans-membranaire exprimée par la plupart des cellules épithéliales qui forment les glandes et les canaux. Sa sur-expression et sa sous-glycosylation sont fréquentes dans plusieurs cancers, incluant près du 2/3 des RCC<sup>44</sup>. La glycosylation incomplète de MUC1 dans les cellules tumorales expose le noyau de peptides, fournissant donc des peptides spécifiques aux tumeurs.

La protéine adipophiline est également un AT du groupe IV et elle est impliquée dans l'homéostasie des lipides dans les adipocytes et les macrophages, mais elle est également sur-exprimée dans certains cas de RCC<sup>45</sup>.

La cycline D1 est impliquée dans la progression de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. Elle est exprimée à des faibles niveaux dans plusieurs tissus normaux, mais elle est également sur-exprimée dans un certain nombre de cancers, notamment dans 75% des RCC<sup>46</sup>.

Finalement, le proto-oncogène C-Met est un récepteur tyrosine kinase impliqué dans la régénération de certains organes, l'embryogenèse, l'hématopoïèse, le développement des muscles, ainsi que la migration et l'adhésion des lymphocytes B et des monocytes<sup>47-50</sup>. De

plus, il est sur-exprimé dans plusieurs types de cancers, dont les RCC, mais plus particulièrement dans les RCC de type papillaire<sup>51</sup>.

### **1.5 La surveillance du cancer par le système immunitaire**

Un grand nombre de preuves expérimentales et cliniques ont suggéré que le système immunitaire est en mesure de surveiller la croissance des tumeurs. Cette théorie considère que la surveillance du cancer par le système immunitaire est un mécanisme important dans la protection contre la carcinogenèse. L'interaction du système immunitaire et des tumeurs se résume en trois étapes, soit l'élimination, l'équilibre et l'échappement<sup>52</sup>.

D'abord, la réponse immunitaire innée et adaptative contribuent toutes les deux à l'élimination des cellules tumorales en développement. La prochaine étape est la phase d'équilibre et elle est caractérisée par l'élimination continue des cellules tumorales et la production de cellules tumorales résistantes au système immunitaire. Finalement, les cellules tumorales qui persistent ont développé divers mécanismes qui leur permettent d'échapper au système immunitaire. Parmi ces mécanismes on retrouve une diminution de l'expression des molécules du CMH<sup>53</sup> ou des antigènes tumoraux. De plus, les tumeurs sont en mesure de sécréter une variété de facteurs solubles immunosuppresseurs, tels que le l'IL-10<sup>54</sup> et le TGF- $\beta$ <sup>55</sup>. Un troisième mécanisme d'évasion implique l'anergie ou l'apoptose des lymphocytes T qui rencontrent des APC qui n'ont pas reçu de signaux de danger par les tumeurs<sup>56</sup>. Finalement, les lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sont impliqués dans la tolérance au soi, donc pourraient contribuer à la suppression des lymphocytes T effecteurs.

### **1.6 L'historique de l'immunothérapie du cancer du rein**

L'histoire de l'immunothérapie du cancer du rein date de 1914, lorsque WB Coley a tenté de traiter des patients atteints du cancer du rein avec un mélange de toxines bactériennes, dans le but de développer une réponse immunitaire contre la tumeur<sup>57</sup>. Cependant, ce type d'immunothérapie non-spécifique était rarement efficace, donc les recherches subséquentes se sont concentrées sur l'utilisation de molécules agissant

directement sur le système immunitaire ou le transfert adoptif de cellules immunitaires activées.

### 1.6.1 L'IL-2

L'IL-2 est une cytokine produite par les lymphocytes T activés et elle se lie au récepteur de l'IL-2 sur les cellules cibles. L'IL-2 induit la prolifération des lymphocytes T activés, stimule la cytotoxicité des cellules NK et agit comme co-facteur lors de l'activation des macrophages et des lymphocytes B par les lymphocytes T.

L'utilisation de l'IL-2 pour l'immunothérapie des RCC métastatiques a commencé en 1984. Le pourcentage de patients ayant eu une réponse objective, c'est-à-dire une réponse complète ou partielle, varie entre 15 et 35%<sup>58,59</sup>. Le fait que presque la moitié de ces patients aient eu une réponse complète à long terme a mené à l'approbation de l'IL-2 pour le traitement des RCC par le « *Food and Drug Administration* » des États-Unis. L'utilisation de doses élevées d'IL-2 lors des premiers essais cliniques a entraîné de nombreux effets secondaires chez les patients traités. Deux essais cliniques ont comparé l'efficacité de l'IL-2 à faibles et à fortes doses<sup>60,61</sup>. Les traitements à faibles doses ont entraîné moins d'effets secondaires, mais moins de patients ont répondu à ce traitement comparativement au traitement à fortes doses, quoique la survie globale des patients était la même dans les deux groupes. Globalement, seulement 10-20% des patients traités avec l'IL-2 survivent 5 ans<sup>62,63</sup>.

### 1.6.2 L'IFN- $\alpha$

Les IFN- $\alpha$ , - $\beta$  et - $\gamma$  ont d'abord été décrits comme une famille de protéines produites par des cellules exposées à des virus et capables d'interférer avec la réplication virale<sup>64</sup>. L'activité anti-tumorale précise des IFN n'est pas bien connue, mais il a été démontré qu'ils inhibent la prolifération des cellules tumorales, augmentent l'activité lytique des cellules NK, augmentent l'expression des CMH de classe I par les cellules tumorales et ont des effets anti-angiogéniques<sup>65</sup>. Dans le cas du traitement des RCC, l'IFN- $\alpha$  s'est avéré plus efficace que l'IFN- $\beta$  et - $\gamma$ <sup>66</sup>. En effet, plusieurs études cliniques ont démontré des réponses

objectives chez 10-20% des patients. Cependant, la durée médiane de ces réponses était de 6-10 mois et seulement 1% des patients ont eu une réponse complète<sup>67-69</sup>. De plus, tout comme l'IL-2, le traitement à base d'IFN- $\alpha$  cause des effets toxiques.

Une étude clinique randomisée a réussi à démontrer que la combinaison d'IL-2 et d'IFN- $\alpha$  augmente le pourcentage de réponses objectives<sup>70</sup>, mais ces observations n'ont pas pu être reproduites par d'autres groupes<sup>61</sup>.

### 1.6.3 L'immunothérapie à base de lymphocytes

#### 1.6.3.1 Les cellules NK et « *lymphokine-activated killer cells* » (LAK)

Les cellules NK ne sont pas spécifiques à un antigène et sont capables de tuer des cellules tumorales et des cellules infectées par un virus sans immunisation ou activation préalable. La stimulation des cellules NK avec de l'IL-2 a permis d'identifier une population de cellules NK possédant une activité LAK. Les cellules LAK sont CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup> et possèdent une activité cytotoxique contre la majorité des cellules en prolifération, donc surtout les cellules tumorales. Ces cellules ont donc été utilisées dans plusieurs essais cliniques. Les patients ont reçu d'abord de l'IL-2 pendant quelques jours. Les cellules immunitaires du sang périphérique ont été retirées du patient par leukaphérèse, mises en culture avec de l'IL-2, puis re-administrées au patient avec de l'IL-2. Une dizaine d'études ont démontré une réponse objective chez 9-35% des patients et une réponse complète chez 0-11% des patients<sup>71-73</sup>. Cependant, d'autres études ont démontré que l'utilisation des cellules LAK et de l'IL-2 en combinaison ne conférait pas d'avantages au traitement à l'IL-2 seule<sup>74,75</sup>.

#### 1.6.3.2 Les lymphocytes activés avec de l'anti-CD3

Certaines études ont démontré que l'activation des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) avec un anticorps anti-CD3 sans IL-2, favorisait la prolifération de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Ces cellules ne sont pas cytotoxiques, mais sécrètent des cytokines qui peuvent induire une réponse immunitaire humorale et/ou cytotoxique. De nombreuses

études cliniques ont donc effectué un transfert adoptif de lymphocytes T qui ont été exposés aux cytokines sécrétées par des PBMC en réponse à la stimulation anti-CD3. Malheureusement, les résultats n'ont pas été encourageants<sup>76</sup>.

#### 1.6.3.3 Les « *tumor infiltrating lymphocytes* » (TIL)

Les RCC sont caractérisés par une infiltration de TIL. Plusieurs groupes de recherche ont été capables d'isoler des TIL dans 63-76% des tumeurs analysées<sup>76</sup>. La majorité des TIL sont des lymphocytes T capables dans certains cas de lyser des cellules tumorales *in vitro*<sup>77</sup>. Il y a eu diverses études cliniques qui ont tenté de traiter des patients atteints de RCC avec le transfert adoptif de TIL en combinaison avec l'IL-2. Le pourcentage de réponses objectives varie entre 0 et 33%, mais une étude n'a démontré aucune différence significative entre l'administration de l'IL-2 seule ou en combinaison avec les TIL<sup>76</sup>.

#### 1.6.3.4 La transplantation allogénique

La transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogéniques est utilisée depuis plusieurs années dans le traitement de la leucémie. Les résultats encourageants ont mené certains groupes de recherche à transposer ce genre de traitement pour traiter les RCC. D'abord, les patients sont traités par chimiothérapie pour supprimer le système immunitaire de l'hôte, afin que les cellules du système immunitaire allogénique, mais du même HLA, puissent être greffées avec succès. Les lymphocytes T greffés ont alors un effet greffe-versus-tumeur. Cette technique de transplantation non-myéloablatrice a été utilisée pour traiter plusieurs types de tumeurs solides, mais les résultats les plus positifs ont été obtenus chez les patients atteints de RCC. Une dizaine d'études cliniques ont rapporté des réponses objectives chez 0-57% des patients, mais peu de patients ont eu des réponses complètes (0-16%)<sup>78-80</sup>. De plus, un grand nombre de patients ont souffert d'effets secondaires dû à l'effet greffe-versus-hôte.

#### 1.6.4 Les vaccins à base de cellules tumorales ou de cellules dendritiques

Différents types de vaccins ont été utilisés pour stimuler une réponse immunitaire anti-tumorale. D'abord, deux essais cliniques ont traité des patients en leur injectant des cellules tumorales autologues irradiées. Un de ces essais a signalé une réponse d'hypersensibilité retardée cutanée médiée par les lymphocytes T, chez 70% des patients<sup>81</sup>. Le deuxième essai clinique a rapporté que la survie à cinq ans sans rechute chez les patients était légèrement augmentée comparativement au groupe contrôle<sup>82</sup>. D'autres études de ce genre sont nécessaires afin de tirer des conclusions.

Une autre approche de vaccination est l'utilisation de cellules dendritiques transfectées avec l'acide ribonucléique (ARN) tumoral<sup>83</sup> ou chargées avec du lysat tumoral<sup>84</sup>. L'efficacité du vaccin à base de cellules dendritiques transfectées avec l'ARN tumoral n'a pas pu être établie puisque la majorité des patients ont entrepris un deuxième traitement à la suite de celui-ci. Cependant, la présence de lymphocytes T spécifiques pour divers antigènes tumoraux connus a été démontrée chez 6 des 7 patients étudiés. Dans le cas de l'étude menée par Holtl *et al.*<sup>84</sup>, où des cellules dendritiques ont été chargées avec du lysat tumoral, 7% des patients ont eu une réponse complète, 4% une réponse partielle et 27% sont demeurés stables. Cependant, aucune réponse clinique objective n'a été observée lors de l'étude menée par le groupe de Oosterwijk-Wakka qui a tenté la même chose, mais en utilisant des cellules dendritiques immatures<sup>85</sup>.

Une approche alternative à l'utilisation de cellules dendritiques transfectées ou chargées est de former une fusion entre les cellules dendritiques et les cellules tumorales autologues ou allogéniques<sup>86,87</sup>. Dans les deux essais cliniques, près du tiers des patients ont vu leur maladie se stabiliser.

Finalement, il est connu que les « *heat-shock protein* » (HSP) ont comme rôle de chaperonner les peptides lors de la présentation antigénique et ils sont capables d'activer les cellules dendritiques. Certaines études cliniques ont donc isolé les complexes HSP-peptides à partir des cellules tumorales autologues, pour ensuite être injectés chez le patient, afin d'être captés et présentés par les cellules dendritiques<sup>88</sup>. Les résultats sont jusqu'à présent encourageants<sup>89</sup>.

### 1.6.5 La déplétion des cellules Treg

Il a été démontré que le nombre de cellules immunosuppressives périphériques (Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) est élevé chez les patients atteints de RCC métastatique et que ce nombre demeure élevé chez les patients qui ne répondent pas au traitement à l'IL-2. Cependant, le pourcentage de cellules Treg diminue à des niveaux semblables à ceux de donneurs normaux, chez les patients ayant atteint une réponse objective suite au traitement à l'IL-2<sup>90</sup>. Ainsi, la déplétion des cellules Treg avant la vaccination à base de cellules dendritiques transfectées avec l'ARN tumoral, a amélioré de façon significative la réponse anti-tumorale médiée par les lymphocytes T<sup>91</sup>.

### 1.6.6 Les anticorps bloquants

Les anticorps sécrétés par les lymphocytes B ont été récemment utilisés dans le traitement des RCC. Des anticorps monoclonaux se liant au « *vascular endothelial growth factor receptor* » (VEGFR) ou au « *epidermal growth factor receptor* » (EGFR) à la surface des cellules tumorales, ont été administrés aux patients dans le but de bloquer ces récepteurs qui sont nécessaires pour la progression tumorale (leurs rôles seront décrits plus en détails dans les sections ultérieures). Le pourcentage des patients ayant répondu au traitement est de 10% pour l'anticorps bloquant le VEGFR<sup>92</sup> et de 5,7% pour l'EGFR<sup>93</sup>.

Il y a également eu quelques essais cliniques qui ont évalué l'efficacité d'un anticorps bloquant le CA IX, un AT sur-exprimé dans 70-95% des RCC<sup>94</sup>. Le traitement a causé très peu d'effets secondaires et 30% des patients ont vu leur maladie se stabiliser.

## 1.7 L'étude des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs (TIC, de *tumor infiltrating immune cells*) RCC

La section précédente résume les différentes stratégies d'immunothérapies utilisées en phase clinique pour traiter les RCC. Certains de ces traitements sont efficaces chez un certain pourcentage de patients, mais il reste encore beaucoup de patients qui décèdent de cette maladie. Il a déjà été démontré que les RCC sont davantage infiltrés par des

lymphocytes comparativement à d'autres types de cancers<sup>95</sup> et que parmi ces lymphocytes, il semble y avoir une expansion clonale de lymphocytes T qui pourraient être spécifiques à la tumeur et ainsi participer à la réponse immunitaire anti-tumorale<sup>96,97</sup>. Alors si les cellules immunitaires sont capable d'infiltrer la tumeur, pourquoi ne sont-elles pas capables de l'éliminer? Plusieurs laboratoires ont étudié le phénotype ainsi que les fonctions des TIIC.

#### 1.7.1 Le phénotype des lymphocytes T CD3<sup>+</sup> parmi les TIIC des RCC

D'abord, il a été démontré que les TIIC qui infiltrent les RCC sont principalement composées de lymphocytes T CD3<sup>+</sup>, qu'il y a une plus grande infiltration de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> que de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et qu'il y a une augmentation des marqueurs d'activation CD69, CD54 et HLA-DR comparativement au tissu normal du rein ou aux PBMC<sup>98,99</sup>. La présence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup><sup>98</sup>, ainsi que la diminution de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> ont également été observées parmi les TIIC<sup>98,100</sup>. D'autres études ont démontré parmi les TIIC une augmentation de l'expression des récepteurs de chemokines CXCR3 et CCR5 associés à une polarisation de type T<sub>H</sub>1<sup>101</sup>, mais également une diminution de ces mêmes récepteurs et une augmentation du récepteur de chemokines CCR4 associé à une polarisation de type T<sub>H</sub>2 chez les patients métastatiques<sup>100</sup>.

#### 1.7.2 La diminution des fonctions des CTL parmi les TIIC

Il a été démontré que les CTL CD8<sup>+</sup> parmi les TIIC ont une activité cytotoxique *ex vivo* diminuée suite à leur activation avec de l'anti-CD3<sup>98</sup>. De plus, les CTL parmi les TIIC peuvent exprimer à leur surface des récepteurs inhibiteurs des cellules NK, tels que les KIR. Il a été démontré que les cellules de RCC pouvaient engager les récepteurs KIR à la surface des CTL et ainsi empêcher l'activation de ces CTL<sup>102</sup>. De plus, il semblerait que les cellules tumorales favoriseraient la persistance de ces CTL KIR<sup>+</sup> afin de promouvoir leur survie<sup>103</sup>.

#### 1.7.3 Les RCC sont caractérisés par une infiltration de cellules NK



Plusieurs études ont démontré la présence de cellules NK CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> et CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup> parmi les TIIC<sup>98,100</sup>. De plus, les tumeurs infiltrées par un grand nombre de cellules NK sont majoritairement infiltrées par des cellules CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> qui demeurent cytotoxiques suite à leur activation à l'IL-2. Par contraste, les tumeurs infiltrées par un petit nombre de cellules NK sont infiltrées majoritairement par des cellules CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup> qui ne sont pas cytotoxiques<sup>104,105</sup>.

## 1.8 Les CCRCC expriment la protéine von Hippel-Lindau (VHL) mutée

### 1.8.1 La maladie de von Hippel-Lindau (VHL)

La maladie de VHL est un syndrome héréditaire qui prédispose les patients à une variété de tumeurs malignes, tumeurs bénignes et kystes, les plus fréquents étant des hémangioblastomes du système nerveux central, des angiomes de la rétine, des CCRCC (ci-après nommé VHL<sup>-/-</sup>RCC) et des phéochromocytomes<sup>106</sup>. Environ la moitié des patients seront atteints d'au moins deux tumeurs ou kystes au cours de leur vie<sup>107,108</sup>. L'incidence de la maladie est relativement faible, soit de 1/36 000 naissances<sup>109</sup>. Les VHL<sup>-/-</sup>RCC sont la principale cause de décès chez les patients atteints de la maladie VHL, ce qui n'est pas surprenant puisque ces patients ont >70% de chances de développer un VHL<sup>-/-</sup>RCC au cours de leur vie<sup>110</sup>. Le syndrome VHL est causé par des mutations germinales héréditaires du gène suppresseur de tumeurs VHL, causant sa perte de fonction. La prédisposition aux tumeurs bénignes ou malignes se transmet de façon autosomique dominante, mais le développement de tumeurs est secondaire à la perte du second allèle. Donc, la première mutation du gène VHL est héréditaire, alors que l'inactivation de l'allèle sauvage survient suite à une mutation somatique<sup>111</sup>. La maladie de VHL peut également être sporadique dans le cas où les deux allèles sont inactivés suite à des mutations somatiques.

Cliniquement, la maladie de VHL peut être classée en deux types<sup>112,113</sup>. Le type 1 regroupe les familles à faible risque de développer un phéochromocytome, alors que le type 2 regroupe celles à risque élevé. À son tour, le type 2 peut être associé à un faible risque (type 2A) ou un risque élevé (type 2B) de développer un VHL<sup>-/-</sup>RCC. Finalement, le type 2C représente les familles à risque de développer un phéochromocytome uniquement. Le

risque de développer les différentes tumeurs qui constituent le syndrome VHL varie selon les différentes mutations du gène VHL. En effet, les mutations germinales du gène VHL sont hétérogènes quant à leurs types et positions. Parmi ces mutations, des micro-délétions de 1-9 paires de bases (pb), des délétions pouvant aller jusqu'à 50 pb, des micro-insertions et des mutations ponctuelles ont été observées<sup>110</sup>. Une étude menée sur 469 familles atteintes de la maladie VHL en Amérique du Nord, en Europe et au Japon, a identifié 137 mutations différentes chez 300 de ces familles<sup>114</sup>. De plus, la majorité de ces mutations (124/137) ne surviennent que dans une ou deux familles. Quelques corrélations ont pu être établies entre le génotype et le phénotype de la maladie. D'abord, aucun phéochromocytome n'a pu être détecté chez 96% des familles ayant des mutations susceptibles d'altérer la structure de la protéine VHL (pVHL) ou mener à son absence, c'est-à-dire des délétions, des micro-délétions, des mutations au site d'épissage ou des mutations non-sens. Par contraste, des mutations faux-sens subtiles ne causant potentiellement pas de changements dans la conformation du pVHL<sup>114-119</sup>, ont été détectées chez 92% des familles souffrant de phéochromocytomes. Malgré ces corrélations significatives, il n'est toujours pas possible de prédire de manière fiable le phénotype de la maladie à partir du génotype<sup>110</sup>.

Des mutations dans le gène VHL ne surviennent pas uniquement dans le cadre de la maladie VHL, étant donné que des mutations somatiques dans les deux allèles du gène VHL sont également retrouvées dans les hémangioblastomes du système nerveux central, les phéochromocytomes et 50-80% des CCRCC sporadiques (VHL<sup>-</sup>RCC)<sup>120</sup>, les tumeurs malignes les plus fréquentes du rein. En effet, selon la classification internationale de Heidelberg<sup>121</sup>, les RCC les plus fréquents sont les CCRCC (incidence : 65-80%), les RCC papillaires (7-14%) et les RCC chromophobes (6-11%).

Le pVHL forme un complexe avec plusieurs protéines incluant l'elongin B, l'elongin C, cullin-2 et Rbx-1 (VBC/cul-2)<sup>112</sup>, et possède une activité E3-ubiquitine ligase<sup>122-127</sup>. Le pVHL recrute la sous-unité  $\alpha$  du « *hypoxia-inducible factor* » (HIF) afin d'entraîner son ubiquitination et sa dégradation subséquente par le protéasome<sup>128-132</sup>. Le HIF est un facteur de transcription composé d'une sous-unité  $\beta$  et d'une des trois sous-unités  $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  étant les mieux caractérisés. Le rôle du HIF est de réguler la

transcription de plusieurs gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie. Lorsque les niveaux d'oxygène à l'intérieur d'une cellule sont normaux, l'affinité du HIF $\alpha$  envers le pVHL est augmentée, menant à l'ubiquitination et la dégradation du HIF $\alpha$ . Cependant, dans des conditions d'hypoxie, le HIF $\alpha$  ne se lie plus au pVHL<sup>133-138</sup> et par conséquent entraîne la transcription de divers gènes impliqués dans l'angiogénèse, le métabolisme du glucose et la survie cellulaire<sup>139</sup>. Il a été démontré que des lignées cellulaires VHL<sup>-/-</sup>RCC ne sont pas capables de dégrader le HIF $\alpha$  peu importe les niveaux d'oxygène, entraînant la sur-expression des gènes cibles<sup>132,140-143</sup>. Cependant, il est à noter que les mutations observées dans les familles souffrant de la maladie VHL de type 2C, n'affectent pas la capacité du pVHL à dégrader le HIF- $\alpha$ , mais affectent plutôt son rôle dans la formation de la matrice extra-cellulaire<sup>144</sup>.

### 1.8.2 Le lien entre VHL, HIF- $\alpha$ et TGF- $\alpha$ dans l'oncogénèse des VHL<sup>-/-</sup>RCC

En général, le HIF-1 $\alpha$  et le HIF-2 $\alpha$  ne sont pas détectés dans les cellules normales de l'organisme dont les niveaux d'oxygène sont normaux<sup>145</sup>. Dans le cancer, l'accumulation du HIF-1 $\alpha$  et du HIF-2 $\alpha$  peut être causée par l'hypoxie au niveau de l'environnement tumoral ou par la perte de fonction d'un gène suppresseur de tumeur, comme le VHL, due à des mutations germinales ou somatiques<sup>139</sup>. La présence de ces deux protéines a été démontrée dans plusieurs types de cancers incluant le cancer de la prostate, du sein et du colon<sup>145,146</sup>. Dans deux études, l'expression du HIF-1 $\alpha$  et du HIF-2 $\alpha$  a été majoritairement démontrée dans les régions nécrotiques des tumeurs. Cependant, en ce qui concerne les VHL<sup>-/-</sup>RCC, le nombre de cellules tumorales exprimant ces deux protéines était plus élevé que dans les autres types de cancers et l'expression était distribuée de façon homogène dans toutes les cellules de la tumeur<sup>145,147</sup>.

En ce qui concerne le HIF-1 $\alpha$ , il régule la transcription de plus de 60 gènes. En réponse à l'hypoxie, l'expression de la majorité de ces gènes est spécifique à un certain type de cellules. Étant donné que le HIF-1 $\alpha$  est induit par l'hypoxie dans la majorité des types de cellules, l'interaction avec un autre facteur de transcription déterminerait peut-être le sous-groupe de gènes transcrits par le HIF-1 $\alpha$ <sup>139</sup>. Une explication possible est que le

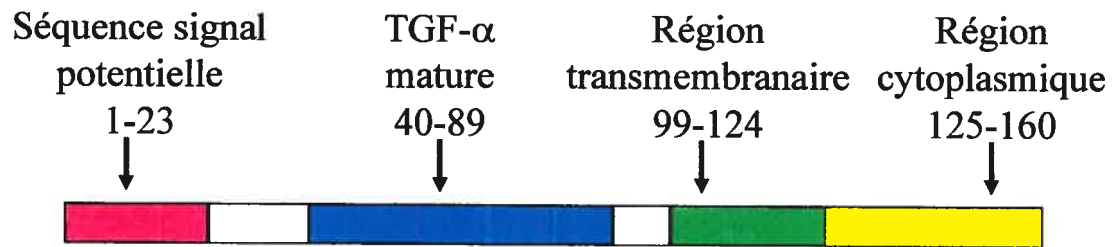
HIF-1 $\alpha$  et le HIF-2 $\alpha$  ont des caractéristiques qui se chevauchent mais qui sont distinctes quant à leur induction et les gènes qu'ils transcrivent<sup>148</sup>.

Dans le cas des VHL<sup>-/-</sup>RCC, il a été démontré que le HIF- $\alpha$  régule la transcription de plusieurs gènes incluant le « *glucose transporter-1* » (Glut-1), l'érythropoïétine et le « *vascular endothelial growth factor* » (VEGF)<sup>149</sup>. Cependant, certaines études ont suggéré que le HIF-2 $\alpha$  joue un rôle plus important que le HIF-1 $\alpha$  dans les VHL<sup>-/-</sup>RCC<sup>150</sup>, contrairement à d'autres types de cancers et cellules normales<sup>139,151-154</sup>. En effet, il a été suggéré que le HIF-2 $\alpha$ , mais pas le HIF-1 $\alpha$ , est nécessaire à la formation des VHL<sup>-/-</sup>RCC<sup>120,155,156</sup> et que le HIF-2 $\alpha$  a un effet positif, alors que le HIF-1 $\alpha$  a un effet négatif sur la prolifération tumorale<sup>157</sup>. Ces observations sont en accord avec d'autres études qui ont observé la présence de la protéine HIF-2 $\alpha$ , mais pas HIF-1 $\alpha$ , dans des îlots multicellulaires pré-malins au niveau du néphron suite à la perte de fonction du pVHL<sup>156,158</sup>. Parmi les gènes régulés par le HIF- $\alpha$ , le VEGF est un facteur angiogénique et sa sur-expression pourrait expliquer l'hyper-vascularisation des tumeurs VHL<sup>-/-</sup>RCC, mais pas la formation de ces tumeurs suite à la perte de fonction du pVHL. Il a été démontré que la lignée cellulaire 786-0 (VHL<sup>-/-</sup>RCC) sur-exprime le « *transforming growth factor- $\alpha$*  » (TGF- $\alpha$ ) et que cette expression est négativement régulée par le pVHL sauvage<sup>159</sup>. Le TGF- $\alpha$  est un facteur angiogénique<sup>160</sup> et un facteur de croissance pour les cellules épithéliales du tubule proximal du néphron<sup>161</sup>, les cellules qui donnent probablement naissance aux CCRCC. Plusieurs études ont démontré la sur-expression du TGF- $\alpha$  et de son récepteur EGFR dans les RCC, suggérant son implication dans la prolifération de ces tumeurs<sup>162-165</sup>. Notre collaborateur à l'Université d'Ottawa, Dr Stephen Lee, a identifié le TGF- $\alpha$  comme l'agent potentiel responsable de la prolifération des cellules VHL<sup>-/-</sup>RCC en absence de facteurs de croissance exogènes<sup>166</sup>. En d'autres mots, la perte de fonction du pVHL et la sur-expression subséquente du TGF- $\alpha$  provoquent une boucle autocrine où le TGF- $\alpha$  produit par les cellules VHL<sup>-/-</sup>RCC se lie à son récepteur à la surface des mêmes cellules, menant à la formation des VHL<sup>-/-</sup>RCC. Peu après, le même groupe a démontré que l'expression du TGF- $\alpha$  est régulée par le HIF-2 $\alpha$  et que ce dernier, mais pas HIF-1 $\alpha$ , est responsable de la tumorigénèse des VHL<sup>-/-</sup>RCC en activant spécifiquement la voie TGF- $\alpha$ /EGFR<sup>167,168</sup>.

### 1.8.3 Le rôle et l'expression du TGF- $\alpha$

#### 1.8.3.1 La structure du TGF- $\alpha$

Le TGF- $\alpha$  est membre de la famille des ligands du EGFR. Tous les membres de cette famille sont issus du clivage protéolytique de leur précurseur membranaire. Le précurseur du TGF- $\alpha$ , le pro-TGF- $\alpha$ , est composé de 159 ou 160 acides aminés, c'est-à-dire qu'il peut être retrouvé sous les deux formes selon la présence ou non d'un codon en tandem<sup>169</sup>. Le pro-TGF- $\alpha$  contient une séquence signal, un domaine extra-cellulaire codant le TGF- $\alpha$  mature, un domaine trans-membranaire et un domaine cytoplasmique<sup>170</sup> (figure 5). Le TGF- $\alpha$  mature soluble résulte du clivage protéolytique du pro-TGF- $\alpha$  membranaire et il est composé de 50 acides aminés. Comme tous les ligands du EGFR, le TGF- $\alpha$  mature contient une séquence riche en cystéines qui forment une structure à trois boucles qui est essentielle à la liaison de haute affinité au EGFR. Le TGF- $\alpha$  mature soluble, ainsi que le pro-TGF- $\alpha$  sont tous les deux biologiquement actifs, étant donné que le pro-TGF- $\alpha$  est capable de se lier à son récepteur à la surface des cellules avoisinantes<sup>171,172</sup>.



*Figure 5 : Structure du pro-TGF- $\alpha$ .*

Le précurseur du TGF- $\alpha$ , le pro-TGF- $\alpha$ , est une protéine membranaire qui contient une séquence signal, un domaine extra-cellulaire codant le TGF- $\alpha$  mature, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique. Le TGF- $\alpha$  mature soluble résulte du clivage protéolytique du pro-TGF- $\alpha$ .

### 1.8.3.2 Le rôle du TGF- $\alpha$

Le rôle physiologique précis du TGF- $\alpha$  *in vivo* chez l'humain n'est pas connu. Cependant, plusieurs études utilisant des modèles *in vitro* ou des modèles murins ont démontré son implication dans différents processus biologiques. D'abord, il a été démontré que le TGF- $\alpha$  est un mitogène puissant pour une variété de cellules épithéliales et mésenchymateuses *in vivo* chez la souris transgénique<sup>173,174</sup>. Le TGF- $\alpha$  est également capable d'induire la migration des kératinocytes humains et des cellules hépatiques du rat *in vitro*<sup>175,176</sup>. De plus, le TGF- $\alpha$  semble jouer un rôle dans l'inhibition de la différenciation des précurseurs d'adipocytes du rat *in vivo* et *in vitro*<sup>177,178</sup>, puis dans l'induction de l'expression de certains oncogènes<sup>179</sup>. Finalement, le TGF- $\alpha$  est impliqué dans l'angiogénèse chez le hamster<sup>180</sup>, dans la cicatrisation des plaies oculaires<sup>181</sup> et des brûlures de deuxième degré<sup>182</sup>, puis dans la résorption osseuse *in vitro*<sup>183</sup>.

### 1.8.3.3 L'expression du TGF- $\alpha$ dans les tissus normaux humains

Des niveaux faibles à modérés d'ARN messager (ARNm) du TGF- $\alpha$  ont été détectés dans quelques tissus normaux humains, alors que des niveaux élevés ont été retrouvés principalement chez le rat. La présence de la protéine a également été démontrée dans certaines études, mais la spécificité des anticorps utilisés n'a pas toujours été précisée<sup>160</sup>. D'abord chez l'humain, il a été démontré par hybridation *in situ* que l'ARNm du TGF- $\alpha$  peut doubler dans les cellules épithéliales des glandes mammaires pendant la grossesse et l'allaitement, et que le TGF- $\alpha$  peut également être exprimé dans 10-15% des cellules stromales pendant la grossesse<sup>184</sup>. Par immunohistochimie, la présence de la protéine TGF- $\alpha$  a été démontrée dans les neurones à travers le cerveau humain<sup>185</sup>, dans les poumons<sup>186</sup> et dans les cellules différenciées de l'estomac, de l'intestin grêle et du colon<sup>187</sup>. De plus, l'ARNm ainsi que la protéine TGF- $\alpha$  sont présents dans des cultures primaires de kératinocytes, dans des biopsies d'épiderme normal et dans des biopsies de plaques de psoriasis<sup>188-191</sup>. De plus, des faibles niveaux d'ARNm et de protéine ont été détectés dans le rein<sup>162-165,192</sup>. Finalement, les macrophages activés sont aussi en mesure d'exprimer et de sécréter le TGF- $\alpha$ <sup>193</sup>.

Chez le fœtus humain, l'ARNm du TGF- $\alpha$  a été détecté abondamment dans le duodénum, mais également dans la vésicule biliaire, les glandes salivaires, les glandes surrénales, le cerveau, les reins et le placenta<sup>194</sup>.

#### 1.8.3.4 L'expression du TGF- $\alpha$ dans le cancer

Malgré son expression faible ou modérée dans certains tissus normaux humains, le TGF- $\alpha$  est majoritaire et plus fortement exprimé dans divers types de cancer. D'abord, plusieurs études ont démontré la sur-expression du TGF- $\alpha$  dans les RCC par rapport au tissu normal du rein autologue. La sur-expression de l'ARNm par rapport au tissu normal autologue a été démontrée chez 6/10 patients étudiés<sup>162</sup>, puis par une autre étude, chez 33/33 patients étudiés<sup>163</sup>. Une autre étude a démontré la sur-expression de l'ARNm du TGF- $\alpha$  chez 5/5 tumeurs CCRCC, ainsi que la sur-expression de la protéine chez 2/2 de ces patients<sup>164</sup>. Par immunohistochimie, le groupe de Lager *et al.*<sup>165</sup> ont démontré la présence de la protéine TGF- $\alpha$  à la surface des cellules tumorales dans 73% des cas (n=68), sa présence au niveau des vaisseaux sanguins de la tumeur dans 100% des cas et sa présence au niveau du tubule distal et du tube collecteur dans 100% des tissus normaux du rein autologue. Une autre étude est venue confirmer la présence du TGF- $\alpha$  dans les tubules distaux et les tubes collecteurs du rein normal (n = 17), dans les cellules endothéliales des tumeurs (n = 14), dans les cellules tumorales de type granulaire (n = 4), mais pas dans les cellules tumorales de type CCRCC (n = 10)<sup>192</sup>. Finalement, une autre étude a démontré la présence du TGF- $\alpha$  dans la moitié des tumeurs étudiées (n = 175) et dans la moitié des vaisseaux sanguins irriguant les tumeurs de type autre que papillaire seulement<sup>195</sup>. À l'exception de Petrides *et al.*<sup>163</sup> qui a démontré une corrélation entre l'expression du TGF- $\alpha$  et le grade de la tumeur, aucune des études citées ci-haut n'a pu établir une corrélation avec la grosseur, le stade ou le grade de la tumeur. De plus, certaines des études citées ci-haut ont également démontré la sur-expression de l'EGFR, le récepteur du TGF- $\alpha$ , dans plusieurs RCC par rapport au tissu sain du rein autologue, mais la sur-expression de l'EGFR ne corrèle pas toujours avec la sur-expression du TGF- $\alpha$ <sup>163-165</sup>.



En plus de l'expression du TGF- $\alpha$  dans le cancer du rein, son expression a également été démontrée dans un grand nombre de cancers. L'ARNm du TGF- $\alpha$  a été détecté dans des tumeurs primaires de cancers des ovaires<sup>196</sup>, puis sa sur-expression a également été détectée dans des lignées de glioblastomes par rapport à des tissus de cerveaux normaux<sup>197</sup>. La présence de la protéine TGF- $\alpha$  a été confirmée dans 80/84 carcinomes du pancréas<sup>198</sup>, dans 16/17 cancers de la peau<sup>199</sup> et dans des lignées de cancers du sein<sup>200</sup>. Finalement, la sur-expression de la protéine par rapport au tissu normal autologue a été démontrée dans le cancer du colon<sup>186</sup>, dans des gangliocytomes de l'hypothalamus, des phéochromocytomes, des carcinomes des glandes surrénales<sup>201</sup>, dans 87/131<sup>202</sup> et 11/20<sup>203</sup> cancers du poumon, puis dans 16/19 cancers colorectaux<sup>204</sup>. De plus, le TGF- $\alpha$  a été détecté dans l'urine de patients atteints de divers cancers tel que le mélanome<sup>205</sup>, le cancer du sein<sup>206</sup>, le cancer de l'ovaire<sup>207</sup> et les carcinomes hépatocellulaires<sup>208</sup>. Tous comme dans les RCC<sup>209</sup> et les VHL<sup>-/-</sup>RCC<sup>166</sup>, il a été démontré *in vitro* que le TGF- $\alpha$  est responsable de la prolifération autonome de plusieurs lignées cellulaires de cancer du pancréas<sup>210-212</sup>, de cancer du colon<sup>213</sup>, de carcinomes squameux de la peau<sup>214</sup> et de carcinomes de la prostate<sup>212</sup>.

#### 1.8.3.5 L'abolition et la sur-expression du TGF- $\alpha$ dans des modèles murins

Chez la souris et le rat normal adulte, une forte expression du TGF- $\alpha$  a été détectée dans le cerveau, les poumons et la caduque utérine, et à des niveaux moindres dans la peau, les glandes mammaires, le système digestif, les organes reproducteurs et les reins<sup>160</sup>. Deux équipes ont produit des souris knockout pour le TGF- $\alpha$  afin d'identifier les rôles physiologiques du TGF- $\alpha$  *in vivo* chez la souris<sup>215,216</sup>. Les deux laboratoires ont rapporté que les souris knockout étaient viables, en santé et fertiles. En fait, seulement deux phénotypes ont été observés. D'abord, les souris avaient le poil et les moustaches ondulés. Au niveau histologique, la peau de ces souris démontrait une désorganisation des follicules pileux. Le deuxième phénotype observé chez 40% des souris knockout se traduit par des anomalies au niveau des yeux. En effet, certaines souris sont nées avec les yeux ouverts, alors que d'autres animaux plus âgés ont démontré de l'inflammation et de la cicatrisation au niveau de la cornée. Étant donné que le TGF- $\alpha$  est largement exprimé chez la souris, il

est surprenant que la perte de fonction du TGF- $\alpha$  soit associée à seulement deux phénotypes.

Certaines études ont démontré que la sur-expression du TGF- $\alpha$  dans des lignées cellulaires de rat peut induire la transformation maligne de ces cellules et former des petites tumeurs dans les souris nues<sup>217</sup>. Contrairement à ces observations, le groupe de Finzi *et al.*<sup>218,219</sup> n'a pas pu démontrer la transformation de diverses lignées cellulaires de rat, suite à la sur-expression du TGF- $\alpha$  dans ces cellules. Afin d'établir les conséquences pathologiques de la sur-expression du TGF- $\alpha$  *in vivo*, trois laboratoires ont produit des souris transgéniques. Le laboratoire de Sandgren *et al.*<sup>173</sup> ont observé une hyperplasie des cellules épithéliales de plusieurs organes du système digestif, une métaplasie de certaines cellules du pancréas, ainsi que des carcinomes mammaires. Pour leur part, Jhappan *et al.*<sup>174</sup> ont observé dans les souris transgéniques des carcinomes hépatocellulaires, ainsi que des développements anormaux du pancréas et des glandes mammaires. Cependant, une autre étude a démontré que la sur-expression du TGF- $\alpha$  dans les souris transgéniques pouvait entraîner une diminution de la masse des tissus dérivés du mésoderme tels que le tissu adipeux, musculaire et osseux<sup>178</sup>. Ces études portant sur la sur-expression du TGF- $\alpha$  dans des souris transgéniques ont démontré l'effet mitogène du TGF- $\alpha$  sur les cellules épithéliales et mésenchymateuses, mais surtout qu'il peut initier la transformation néoplasique dans certains tissus, sans être directement oncogénique dans la majorité des tissus.

#### 1.8.3.6 Le TGF- $\alpha$ mature soluble ou associé à la membrane

Le TGF- $\alpha$  mature soluble résulte du clivage protéolytique du pro-TGF- $\alpha$  membranaire médié par le « *tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -converting enzyme/disintegrin and metalloproteinase 17* » (TACE/ADAM17)<sup>220,221</sup>. Le premier clivage s'effectue en N-terminal du TGF- $\alpha$  mature, alors que le deuxième clivage se fait en C-terminal afin de générer la forme soluble du TGF- $\alpha$  mature<sup>222-225</sup>. Physiologiquement, le TGF- $\alpha$  est impliqué dans le développement de la vulve chez le nématode *Caenorhabditis elegans*<sup>226</sup> et l'organisation des follicules pileux chez les mammifères<sup>220</sup>. Dans les deux situations, il a

été démontré que la forme soluble du TGF- $\alpha$  est sécrétée au niveau de la membrane baso-latérale et rapidement consommée par les EGFR sur la membrane baso-latérale de la même cellule, démontrant son action autocrine. Cependant, le clivage protéolytique du pro-TGF- $\alpha$  peut être défectueux ou incomplet dans certaines cellules cancéreuses<sup>227</sup>, notamment dans certaines lignées de RCC<sup>167,228</sup>. Il semblerait que le deuxième clivage soit défectueux, donc que le TGF- $\alpha$  mature demeure à la surface membranaire. De nombreuses études ont tenté de démontrer une différence entre les fonctions du TGF- $\alpha$  mature soluble ou membranaire. Le TGF- $\alpha$  membranaire est capable de se lier à l'EGFR de façon autocrine et/ou juxtacrine<sup>172</sup>, mais certaines études ont démontré qu'il active son récepteur de façon moins efficace<sup>171</sup>, alors que d'autres ont prouvé le contraire<sup>227,229</sup>.

## 1.9 Hypothèses et objectifs du projet de maîtrise

Les patients atteints de carcinomes du rein (RCC) ont accès à un nombre limité de traitements et il n'existe présentement aucun traitement efficace pour traiter les cas métastatiques. Beaucoup d'efforts ont été déployés pour développer de nouvelles immunothérapies, mais très peu de patients ont eu une réponse complète objective. Ceci est peut-être dû à des effets immunosuppresseurs médiés par les tumeurs. La première hypothèse de ma maîtrise est qu'une meilleure caractérisation du phénotype des différentes populations de cellules immunitaires qui infiltrent les RCC pourrait nous aider à développer de meilleures immunothérapies. De plus, parmi les différentes immunothérapies essayées pour traiter les RCC, très peu d'essais cliniques à base d'AT spécifiques pour les RCC ont été effectués. Étant donné que le TGF- $\alpha$  est sur-exprimé dans les VHL<sup>-/-</sup>RCC et qu'il est absent ou faiblement exprimé dans les tissus normaux vitaux de l'organisme, la deuxième hypothèse de mon projet de maîtrise est que le TGF- $\alpha$  pourrait être un AT potentiel pour les RCC.

Pour réaliser la première hypothèse, notre objectif était d'identifier les différentes populations de TIIC qui infiltrent les RCC et de caractériser le phénotype naïf ou mémoire, ainsi que le degré d'activation des lymphocytes T. Pour ce faire, les TIIC ont été extraites des tumeurs et immédiatement analysées en cytométrie de flux sans culture *in vitro* ou congélation préalable.

En ce qui concerne la deuxième hypothèse, notre premier objectif était d'évaluer l'expression du TGF- $\alpha$  dans des spécimens cliniques de RCC et de tissus de reins sains autologues à l'aide de la technique de transcription inverse-réaction en chaîne de la polymérase (RT-PCR) quantitatif. Par la même technique, le deuxième objectif était de confirmer l'absence ou la faible expression du TGF- $\alpha$  dans une vingtaine de tissus normaux importants provenant d'une banque commerciale d'ARN. Finalement, le troisième objectif était d'établir l'immunogénicité du TGF- $\alpha$ , c'est-à-dire évaluer la présence de lymphocytes T qui ont la capacité de reconnaître le TGF- $\alpha$  présenté par les molécules du CMH à la surface des CPA. Les lymphocytes T périphériques ou infiltrant les tumeurs des patients atteints de RCC ont été stimulés *in vitro* avec différents peptides synthétiques dérivés du

TGF- $\alpha$ . Ensuite, la reconnaissance de ces lymphocytes T pour les peptides du TGF- $\alpha$  a été évaluée sur la base de sécrétion d'IFN- $\gamma$  ou de GM-CSF par l'essai «*enzyme-linked immunosorbent spot*» (ELISPOT) ou l'essai «*enzyme-linked immunosorbent assay*» (ELISA).

## **CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **Spécimens cliniques**

Les échantillons cliniques de tumeurs et de tissus sains du rein ont été obtenus suite à une néphrectomie totale ou partielle provenant de patients recrutés et opérés par Dr Simon Tanguay à l'Hôpital Général de Montréal du Centre Universitaire de Santé McGill (CUSM). L'histologie, le grade ainsi que le pTNM des 38 tumeurs étudiées sont présentés dans le tableau I. Du sang périphérique a également été prélevé immédiatement avant la chirurgie. Tous les patients ont signé un formulaire de consentement et le projet a été révisé et approuvé par les comités d'éthique de la recherche de l'Hôpital Notre-Dame du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) et de l'Hôpital Général de Montréal. Un schéma du plan expérimental est illustré dans la figure 6.

Patients	Type de carcinome	Grade	pTNM
1	CCRCC	2	pT2
2	CCRCC	2	pT1a
3	CCRCC	n/a	pT1a
4	RCC chromophile	-	pT1b
5	RCC papillaire	-	pT1b
6	RCC chromophile	-	pT3a
7	RCC chromophile	-	pT1a
8	CCRCC	2	pT2
9	CCRCC	2	pT3a
10	CCRCC	2	pT2
11	CCRCC	3	pT1b
12	CCRCC	3	pT1b
13	CCRCC	2	pT1b
14	CCRCC	2	pT1a
15	CCRCC	1	pT1a
16	CCRCC	3	pT1a
18	RCC papillaire	-	pT1b
19	CCRCC	3	pT2
20	CCRCC	2	pT3b
21	CCRCC	2	pT1a
22	CCRCC	1	pT1a
23	CCRCC	2	pT2
24	RCC chromophile	-	pT3a
25	CCRCC	2	pT1a
27	CCRCC	1	pT1a
28	CCRCC	3	pT3a
29	Angiomyolipome	-	-
30	RCC papillaire	-	pT1a
31	CCRCC	2	pT1a
34	RCC papillaire	-	pT1a
35	Carcinoïde	-	pT3b
38	CCRCC	3	pT3b

*Tableau I: Caractéristiques clinico-pathologiques des patients atteints du cancer du rein*

Le grade correspond à la différenciation des cellules tumorales, le grade 1 étant le mieux différencié et le grade 3 étant le moins bien différencié. À noter que le grade ne s'applique pas aux RCC chromophobes, papillaires et carcinoïdes. Le classement pTNM est selon le « *AJCC Cancer Staging manual* »<sup>230</sup>. p : stade pathologique; T : taille et envahissement de la tumeur primaire; N : métastases aux ganglions lymphatiques régionaux; M : métastases à distance; T1a : 4 cm maximum; T1b : 4,1 à 7 cm maximum; T2 : plus de 7,1 cm, mais sans envahissement à l'extérieur du rein; T3a : envahissement extra-rénal, limité au fascia de Gerota; T3b : envahissement vasculaire (veine rénale ou veine cave inférieure infra diaphragmatique). À noter que tous les patients inclus dans cette étude sont N0 et M0, c'est-à-dire qu'aucun patient n'est atteint de métastases ganglionnaires ou à distance.

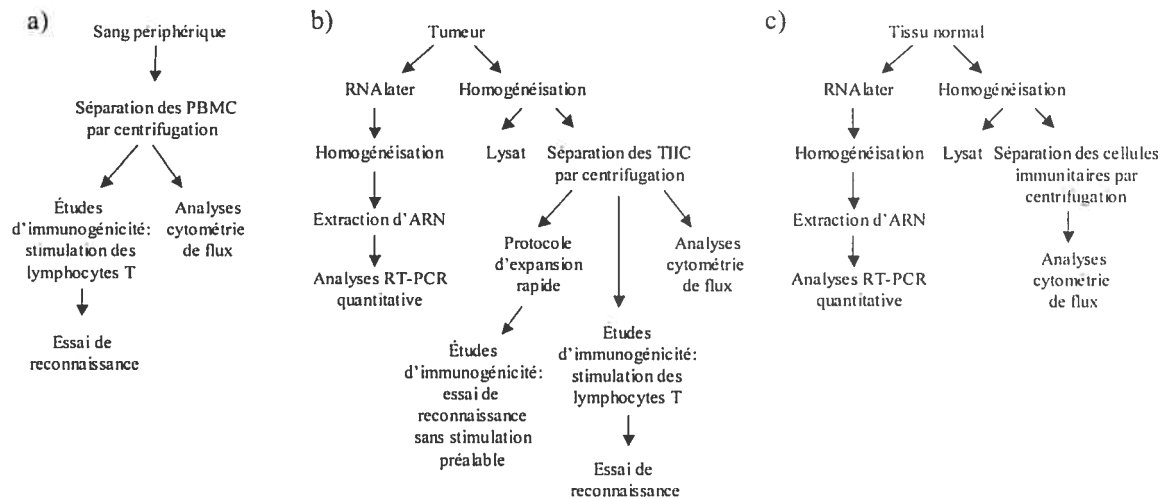


Figure 6 : Plan expérimental.

a) Les PBMC des patients atteints du cancer du rein ont été isolées du sang périphérique pour être stimulées *in vitro* afin d'évaluer l'immunogénicité du TGF- $\alpha$ . Les PBMC ont également été analysées par cytométrie de flux pour étudier leur phénotype.

b) Les échantillons cliniques de tumeurs du rein ont été conservés dans le RNAlater afin d'évaluer l'expression du TGF- $\alpha$  par RT-PCR quantitative. Les échantillons de tumeurs ont également été homogénéisés pour produire du lysat tumoral ou pour isoler les TIIC par centrifugation. Les TIIC ont ensuite été ou non stimulées *in vitro* afin d'évaluer l'immunogénicité du TGF- $\alpha$ . Les TIIC ont également été analysées par cytométrie de flux pour étudier leur phénotype.

c) Les échantillons cliniques de tissus sains du rein autologue ont été conservés dans le RNAlater afin d'évaluer l'expression du TGF- $\alpha$ . Finalement, tout comme les tumeurs, les échantillons de tissus sains ont été homogénéisés pour produire du lysat tumoral ou pour isoler les cellules immunitaires afin d'étudier leur phénotype par cytométrie de flux.



### Culture cellulaire des lignées et des PBMC

Les lignées cellulaires 786-0, A498 et KTCL140 sont des lignées de VHL<sup>-</sup>RCC, alors que WT-7 et A498+VHL sont le résultat d'une transfection stable des lignées 786-0 et A498, respectivement, avec le gène codant pour le VHL sauvage lié à une séquence hémagglutinine-tag. La lignée de cancer de l'utérus HeLa contient le gène VHL sauvage<sup>231</sup>. Toutes ces lignées nous ont été généreusement données par Dr Stephen Lee (Université d'Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada). Elles ont été cultivées dans du milieu «*Dulbecco's modified Eagle's medium*» (DMEM) (Wisent; St-Bruno, Québec, Canada) additionné de 10% sérum bovin fœtal (FBS) (Invitrogen; Carlsbad, CA et Wisent), 2 mM L-glutamine, 100 µg/ml pénicilline/streptomycine et 10 µg/ml gentamicine (tous de Invitrogen). Les cellules HEK-293T exprimant HLA-DRβ1\*0401 ou HLA-DRβ1\*0101, généreusement données par le Surgery Branch du «*National Cancer Institute/National Institutes of Health*» (NCI/NIH) (Bethesda, MD), ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Wisent) additionné de 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 µg/ml pénicilline/streptomycine et 10 µg/ml gentamicine.

Les PBMC ont été isolées du sang de patients atteints du cancer du rein ou de donneurs normaux, suite à une centrifugation de 30 min sur une solution de séparation de lymphocytes (Cellgro, Herndon, VA et Wisent) (figure 4a). Les PBMC ont été analysées immédiatement ou congelées dans 90% sérum fœtal de veau (FCS) (Wisent)/10% DMSO (Sigma; Oakville, Ontario, Canada) pour utilisation ultérieure.

Les lymphocytes B activés suite à la stimulation de leur récepteur CD40 (CD40-B) ont été générés en cultivant des PBMC dans du milieu complet pour CD40-B, soit du «*Iscove's Modified Dulbecco's medium*» (Invitrogen) additionné de 7,5% sérum humain (décomplémenté et préparé à partir de trois donneurs normaux recrutés par Dr Jean-Pierre Routy à l'Hôpital Royal Victoria (CUSM), Montréal, Québec, Canada), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml pénicilline/streptomycine et 10 µg/ml gentamicine. Le milieu pour CD40-B a été complémenté de 500 ng/ml CD40L soluble trimérique (Immunex Corporation; Seattle, WA), 250 U/ml IL-4 recombinant humain (Peprotech; Rocky Hill, NJ) et 0.66 µg/ml cyclosporine A (Calbiochem, San Diego, CA). Au jour 3, du milieu

complet frais, 500 ng/ml CD40L et 250 U/ml IL-4 ont été ajoutés. Lorsque les cellules ont atteint une confluence supérieure à  $1,5 \times 10^6$  cellules/ml (habituellement entre les jours 5 et 8), elles ont été congelées pour utilisation future ou re-stimulées à tous les 2-3 jours (250 ng/ml CD40L et 250 U/ml IL-4) en les conservant à une concentration de  $7 \times 10^5$  cellules/ml.

Les lymphocytes B immortalisés par EBV (EBV-B) ont été générés à partir des PBMC de patients atteints du cancer du rein, tels que décrit précédemment<sup>232</sup>.

### Culture cellulaire des TIIC et des clones

Suite au prélèvement, les échantillons cliniques de tumeurs et de tissus sains du rein ont été homogénéisés mécaniquement à l'aide du « *Medimachine* » (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) selon les instructions du fabricant. La suspension cellulaire a été utilisée pour préparer un lysat cellulaire brut (5 cycles successifs de congélation/décongélation;  $1 \times 10^7$  cellules/ml dans milieu complet pour CD40-B) ou centrifugée sur une solution de séparation de lymphocytes afin d'isoler les TIIC ou les cellules immunitaires ayant infiltrées le tissu sain. Les cellules ont été immédiatement analysées en cytométrie de flux, stimulées avec des peptides synthétiques ou subissent un protocole d'expansion rapide (REP) pour favoriser la prolifération non spécifique des lymphocytes T (figure 6b et c). Le REP a été fait selon le protocole suivant<sup>233</sup> :  $1-5 \times 10^5$  TIIC ont été mis en présence de  $2,5 \times 10^7$  PBMC irradiées à 5 000 rads (de trois donneurs normaux), 300 UI/ml d'IL-2 (Chiron; Emeryville, CA) et 5 µg/ml PHA (Sigma), dans un volume total de 25 ml de milieu complet pour lymphocytes T (AIM-V (Invitrogen) additionné de 5% sérum humain AB décomplémenté (Gemini Bio-Products, Calabasas, CA), 2 mM L-glutamine, 100 µg/ml pénicilline/streptomycine et 10 µg/ml gentamicine). Au jour 2, 300 UI/ml d'IL-2 ont été ajoutés et au jour 5, le surnageant a été remplacé par du milieu complet frais et 300 UI/ml d'IL-2. Lorsque les cellules ont atteint une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules/ml, elles ont été congelées ou diluées à une concentration de  $5-8 \times 10^5$  cellules/ml dans du milieu complet pour lymphocytes T et 300 UI/ml d'IL-2.

Les clones anti-TGF- $\alpha$  ont été obtenus suite à un clonage par dilution limite à partir d'une lignée de lymphocytes T, à une concentration de 1-2, 5-8 et 20-25 cellules/puits dans des plaques à 96 puits à fond rond. Les cellules ont été cultivées dans du milieu complet pour lymphocytes T additionné de  $5 \times 10^4$  PBMC irradiés à 5 000 rads (de trois donneurs normaux), 30 ng/ml anti- $\text{CD}3$  (OKT3; eBioscience, San Diego, CA) et 300 UI/ml IL-2<sup>233</sup>. Les clones positifs ont subi un REP tel que décrit dans le paragraphe précédent.

Certaines des lignées de lymphocytes T ont été enrichies sur une colonne magnétique à l'aide du « *IFN- $\gamma$  Secretion Assay cell enrichment and detection kit* » (Miltenyi Biotec; Auburn, CA), selon les instructions du manufacturier.

### Cytométrie de flux

Les TIIC et les PBMC enrichies par centrifugation telles que décrit ci-dessus, de 9 patients atteints du cancer du rein ont été analysées par cytométrie de flux. Les anticorps monoclonaux (mAbs) conjugués utilisés dans cette étude sont listés dans le tableau II. Nous avons inclus dans notre étude les contrôles isotypiques suivants afin d'estimer le bruit de fond : IgG1-FITC, IgG1-PE, IgG2a-PE et IgG2a-APC (BD Pharmingen); IgG1-FITC, IgG2a-FITC, IgG1-APC et IgG1-Alexa Fluor 488 (Caltag laboratories). Les TIIC et les PBMC ont été lavées dans du « *phosphate-buffered saline* » (PBS) (Wisent)/0,5% albumine de sérum bovin (BSA) (Sigma)/0,1% azide de sodium (BioShop; Burlington, ON, Canada), puis incubées 30 min à 4°C avec les anticorps spécifiques ou les contrôles isotypiques appropriés. Suite à l'incubation, les cellules ont été lavées, puis incubées avec 25  $\mu\text{g}/\text{test}$  de 7-amino-actinomycine D (7-AAD) (BD Pharmingen), afin de discriminer les cellules mortes lors de l'analyse. Il est à noter que les cellules du patient #15 ont été fixées avec 2% formaldéhyde (Sigma). L'acquisition des données a été faite sur le FACSCalibur (BD Biosciences) à l'aide du logiciel « *CellQuest* » (BD Biosciences) et sur le LSR-II (BD Biosciences) à l'aide du logiciel « *FACS Diva* » (BD Biosciences) pour les patients #35 et #38. Les analyses ont été faites avec le logiciel « *WinMDI 2,8* » (développé par Joseph Trotter, Scripps Research Institute).

Manufacturier	Anticorps	Isotype	Espèce	Clone	Fluorochrome
BD Biosciences (Mississauga, ON, Canada)	CD3	IgG1	Souris	SK7	FITC
	CD8 (BD pharmingen)	IgG1, $\kappa$	Souris	RPA-T8	FITC
	HLA-DR	IgG2a	Souris	L243	PE
	CD62L (BD pharmingen)	IgG1, $\kappa$	Souris	Dreg 56	APC
Caltag Laboratories (Burlingame, CA)	CD3	IgG2a	Souris	S4.1	APC
	CD4	IgG2a	Souris	S3.5	FITC
	CD8	IgG2a	Souris	3B5	R-PE
	CD16	IgG1	Souris	3G8	APC
	CD19	IgG1	Souris	SJ25-C1	Alexa-488
	CD25	IgG1	Souris	CD25-3G10	R-PE
	CD45RA	IgG2b	Souris	MEM-56	R-PE
	CD45RO	IgG2a	Souris	UCHL1	APC
	CD56	IgG2a	Souris	MEM-188	R-PE
	R&D Systems (Minneapolis, MN)	CCR7	IgG2a	Souris	150503
CCR7		IgG2a	Souris	150513	APC

*Tableau II : Liste des anticorps monoclonaux conjugués utilisés en cytométrie de flux*

Liste des anticorps monoclonaux utilisés en cytométrie de flux, ainsi que leur manufacturier, isotype, espèce, clone et fluorochrome auquel ils sont conjugués.

### Extraction d'ARN

Les échantillons de tumeurs et de tissus sains du rein ont été conservés dans le RNAlater (Sigma), afin de stabiliser et de prévenir la dégradation de l'ARN (figure 6b et c). Les spécimens ont été homogénéisés par désagrégation mécanique à l'aide du « *Medimachine* » selon les instructions du fabricant. L'ARN a été extrait selon le protocole de Qiazol (Qiagen; GmbH; Hilden, Germany), puis ensuite purifié à l'aide du « *RNeasy mini ou micro kit* » (Qiagen) selon les instructions du fabricant.

### Reverse transcription (RT)

L'ADNc a été synthétisé à partir de l'ARN (1 µg) à l'aide des amorces oligo-dT (Invitrogen) ou « *random hexamer* » (Operon Biotechnologies; Huntsville, Alabama, USA) et du kit « *Omniscript RT* » (Qiagen) sous les conditions du fabricant. L'ADNc synthétisé avec les amorces oligo-dT a été utilisé pour normaliser l'expression de notre gène d'intérêt, soit le TGF- $\alpha$ , avec l'expression des gènes de référence, soit la  $\beta$ -actine- et la RNA polymérase II. Cependant, puisque l'ARN codant pour la sous-unité 18S du ribosome ne contient pas de queue poly-A, l'ADNc synthétisé avec le « *random hexamer* » a été utilisé pour normaliser l'expression du TGF- $\alpha$  avec l'expression du gène de référence, soit la sous-unité 18S du ribosome.

### PCR quantitative en temps réel

Les réactions de PCR quantitative en temps réel ont été faites à partir de 10 ng d'ADNc dans un volume de 25 µl. Les amorces et les sondes pour quantifier les gènes du TGF- $\alpha$  et de la RNA polymérase II proviennent du « *QuantiTect custom assay kit* » (Qiagen), alors que celles pour quantifier les gènes de la  $\beta$ -actine et de la sous-unité 18S du ribosome proviennent du « *QuantiTect Gene Expression Assay kit* » (Qiagen) (les séquences sont listées dans le tableau III). Les amorces et les sondes sont utilisées à une concentration finale de 1X, mais la concentration en unité n'est pas dévoilée par le fabricant. La Taq ADN polymérase et le tampon proviennent du « *QuantiTect Probe PCR Master mix* » (Qiagen). Ils sont utilisés à une concentration finale de 1X, mais la

concentration en unité n'est pas dévoilée par le fabricant. Les conditions d'amplification sont les suivantes pour les quatre gènes étudiés : 15 min à 95°C, puis 25-40 cycles (selon le gène) : 15 sec à 94°C, 30 sec à 56°C et 30 sec à 76°C. La quantification a été effectuée sur le « *Rotor Gene* » (Corbett Research; Sydney, Australia) et l'expression relative du TGF- $\alpha$  a été calculée à l'aide de la formule d'expression relative établi par Dr Michael W. Pfaffl<sup>234,235</sup> :

$$\text{Ratio} = (E_{\text{TGF-}\alpha})^{\Delta\text{CP TGF-}\alpha(\text{contrôle-échantillon})} / (E_{\text{référence}})^{\Delta\text{CP référence(contrôle-échantillon)}}$$

Le ratio d'expression relative a été calculé à partir de l'expression du TGF- $\alpha$  dans des échantillons par rapport à un contrôle, dans notre cas la lignée de cancer du rein A498. Plus spécifiquement, c'est la différence ( $\Delta\text{CP}$ ) entre le moment où la fluorescence d'un échantillon et celle du contrôle croise le seuil établi. Cette équation permet de normaliser le ratio par rapport à l'expression d'un gène de référence et elle tient compte également de l'efficacité (E) des réactions de PCR des deux gènes, calculée à partir de la courbe standard préparée avec l'ADNc de la lignée de cancer du rein 786-0. Tous les échantillons ont été testés en duplicata dans au moins deux expériences indépendantes.

Gènes	Séquence des amorces et des sondes
TGF- $\alpha$	<u>amorce sens</u> : 5'-CAGATTCCCACACTCAGTT-3' <u>amorce anti-sens</u> : 5'-TACCCAGAATGGCAGACACA-3' <u>sonde</u> : 5'-( <i>Eclipse Dark Quencher</i> )-GCAGGAGGACAAGCCAG-(FAM)-3'
B-actine	Les amorces et la sonde proviennent du kit « <i>QuantiTect Gene Expression Assay</i> » (Qiagen). Le fabricant valide leur bon fonctionnement, mais ne dévoile pas leur séquence.
RNA polymérase II	<u>amorce sens</u> : 5'-CGTCCAATGACATTGTGGAG-3' <u>amorce anti-sens</u> : 5'-ACAGGTCATGGTATCACACAAG-3'; <u>sonde</u> : 5'-( <i>Eclipse Dark Quencher</i> )-ATTACCGACACTTGGCT-(FAM)-3'
sous-unité 18S du ribosome	Les amorces et la sonde proviennent du kit « <i>QuantiTect Gene Expression Assay</i> » (Qiagen). Le fabricant valide leur bon fonctionnement, mais ne dévoile pas leur séquence.

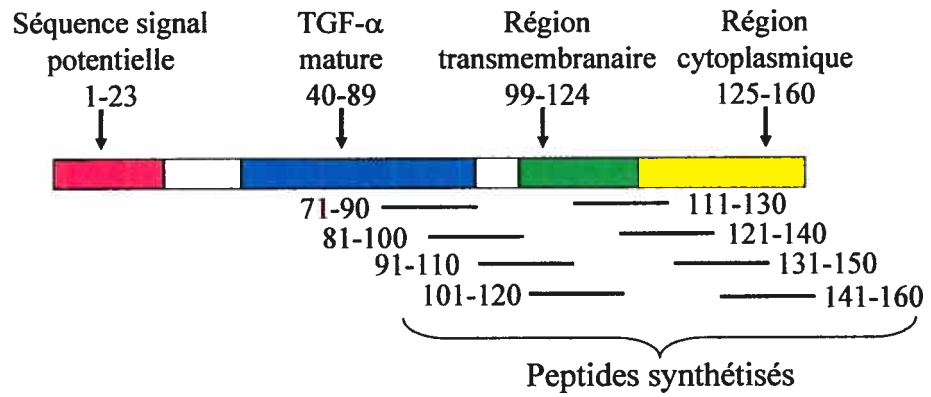
*Tableau III : Amorces et sondes utilisées en PCR quantitative en temps réel.*

Voici les séquences des amorces et des sondes utilisées pour quantifier l'expression du TGF- $\alpha$  normalisée avec les gènes de référence suivants :  $\beta$ -actine, RNA polymérase II et sous-unité 18S du ribosome.

### Chargement des CPA avec des antigènes exogènes

Huit peptides dérivés du pro-TGF- $\alpha$ , d'une longueur de 20 acides aminés, puis se chevauchant tous de 10 acides aminés, ont été synthétisés (figure 7) (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX; Service de synthèse de peptides de l'Est du Québec, Centre Hospitalier de l'Université Laval, Québec, Qc (peptide 81-100 seulement); GL Biochem, Shanghai, Chine (peptide 121-140 seulement)). Les peptides ont été reconstitués dans le DMSO à une concentration finale de 25 mM, à l'exception des peptides 91-110 et 111-130 qui sont à 12,5 mM et le peptide 101-120 qui est à 6,25 mM, dû à leur solubilité. Les CD40-B ont été chargés dans du milieu complet pour CD40-B additionné de 500 ng/ml CD40L à  $1 \times 10^6$  cellules/ml, alors que les EBV-B ont été chargés dans du RPMI 1640 additionné de 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml pénicilline/streptomycine et 10  $\mu\text{g/ml}$  gentamicine également à  $1 \times 10^6$  cellules/ml. Le TGF- $\alpha$  mature recombinant (PeproTech) ou les peptides du TGF- $\alpha$  ont été ajoutés à une concentration finale de 10  $\mu\text{g/ml}$  pour la protéine et de 6-115  $\mu\text{M}$  pour les peptides, selon leur solubilité. Les cellules ont été incubées pendant 16-20 h avant d'être lavées. Lors de certains essais de reconnaissance, les CD40-B ont été incubés pendant 20 min avec 40-80  $\mu\text{g/ml}$  d'anticorps anti-CMH de classe I (W6/32), anti-CMH de classe II (IV A12) ou anti-HLA-DR (HB55), avant d'être co-cultivés avec les cellules effectrices. Il est à noter que les CD40-B ont été utilisés pour les essais de stimulation et les essais de reconnaissance, alors que les EBV-B ont été utilisés pour les essais de reconnaissance seulement.





*Figure 7 : Peptides synthétiques dérivés du pro-TGF- $\alpha$ .*

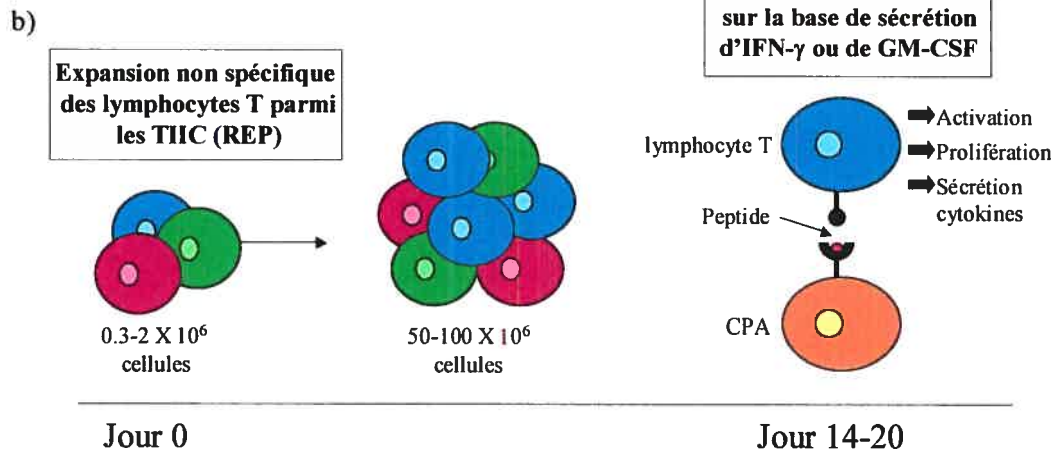
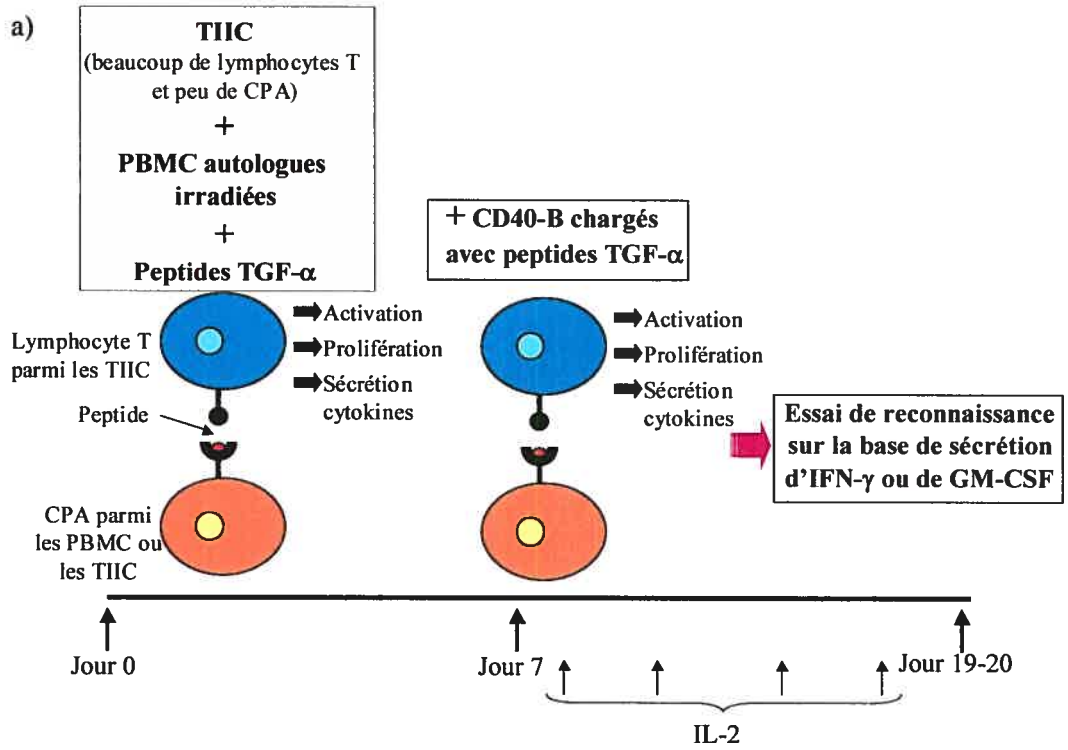
Les huit peptides synthétisés couvrent une section du TGF- $\alpha$  mature, la région transmembranaire et la région cytoplasmique du pro-TGF- $\alpha$ .

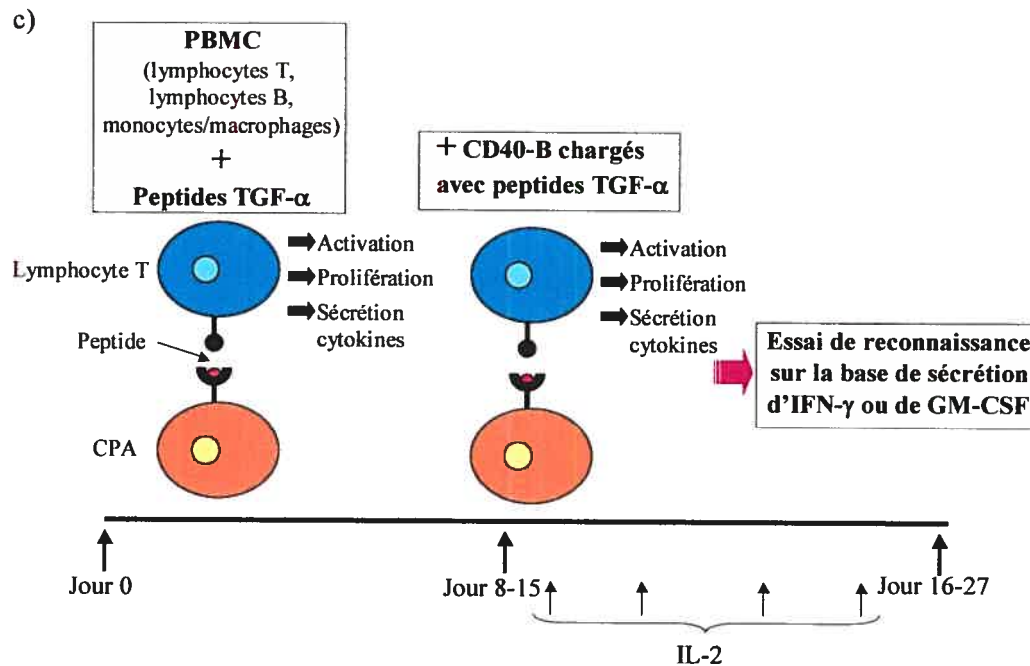
### Stimulation de lymphocytes T parmi les TIIC

Une fois les TIIC isolées de la tumeur (figure 8a),  $4,2-5 \times 10^4$  cellules ont été stimulées avec  $5 \times 10^4$  PBMC autologues irradiées (5 000 rads), 500 ng/ml CD40L et un des peptides synthétiques (12,5-50  $\mu$ M) ou protéine mature (10  $\mu$ g/ml) du TGF- $\alpha$ , dans 100  $\mu$ l de milieu complet pour lymphocytes T dans un puits d'une plaque à 96 puits. Si les TIIC étaient congelées, les PBMC irradiées ont alors été remplacées par des CD40-B autologues chargés pendant 16 h. Au jour 5, 300 UI/ml d'IL-2 ont été ajoutés, puis au jour 7, les cultures ont été re-stimulées avec  $5 \times 10^4$  CD40-B chargés pendant 16 h et 250-500 ng/ml CD40L. À tous les 2-3 jours, 150-300 UI/ml d'IL-2 ont été ajoutés. Finalement, l'essai de reconnaissance a été fait au jour 19-20.

### Stimulation de lymphocytes T périphériques

Les PBMC de patients atteints du cancer du rein ont été décongelées, puis distribuées dans 5 ou 8 puits d'une plaque à 96 puits pour chacun des peptides ou protéine du TGF- $\alpha$ , à une concentration de  $1,2-1,5 \times 10^5$  cellules dans 100  $\mu$ l de milieu complet pour lymphocytes T additionné de 500-590 ng/ml CD40L. La protéine mature ou un des peptides du TGF- $\alpha$  ont été ajoutés aux PBMC à une concentration de 6-10  $\mu$ g/ml pour la protéine et de 7-60  $\mu$ M pour les peptides, selon leur solubilité (figure 8c). Au jour 8-15, les cellules ont été re-stimulées avec le même peptide ou protéine présenté par des CD40-B (17 000-55 000 cellules) qui ont été chargés pendant 16 h. Par la suite, 150-300 UI/ml d'IL-2 ont été ajoutés aux cellules T à tous les 2-3 jours. L'essai de reconnaissance a été fait au jour 16-27.





*Figure 8: Stimulation des PBMC ou des TIIC avec des peptides synthétiques dérivés du TGF- $\alpha$ , afin d'identifier des lymphocytes T spécifiques au TGF- $\alpha$ .*

a) Les TIIC sont co-cultivées avec des PBMC autologues irradiées et un des peptides ou la protéine TGF- $\alpha$ , afin que les CPA parmi les PBMC ou les TIIC présentent le peptide aux lymphocytes T parmi les TIIC. Les lymphocytes T parmi les TIIC qui reconnaissent le peptide présenté par les CPA deviennent activés, prolifèrent et sécrètent des cytokines, dont l'IFN- $\gamma$  et le GM-CSF. Au jour 8, les TIIC sont re-stimulées avec des CD40-B chargés avec le même peptide du TGF- $\alpha$ , puis au jour 19-20, l'essai de reconnaissance se fait sur la base de sécrétion d'IFN- $\gamma$  ou de GM-CSF.

b) Les TIIC sont cultivées selon le protocole de REP, afin de favoriser l'expansion non spécifique des lymphocytes T. Après 2-3 semaines de culture, un grand nombre de lymphocytes T est disponible pour un essai de reconnaissance sur la base de sécrétion d'IFN- $\gamma$  ou de GM-CSF.

c) Les PBMC sont co-cultivées avec un des peptides ou la protéine TGF- $\alpha$ , afin que les CPA présentent le peptide aux lymphocytes T. Au jour 8, les PBMC sont re-stimulées avec des CD40-B chargés avec le même peptide du TGF- $\alpha$ , puis au jour 16-27, l'essai de reconnaissance se fait sur la base de sécrétion d'IFN- $\gamma$  ou de GM-CSF.

### Essai de reconnaissance

La spécificité des lignées de lymphocytes T pour le TGF- $\alpha$  a été évaluée sur la base de sécrétion de cytokines. La sécrétion d'IFN- $\gamma$  est détectée par ELISPOT ou ELISA, alors que la sécrétion de GM-CSF est détectée par ELISA seulement. Lors du premier essai de reconnaissance des stimulations de lymphocytes T périphériques, 100  $\mu$ l de lymphocytes T ont été co-cultivés avec 3-5X10<sup>4</sup> CD40-B ou EBV-B chargés avec les peptides ou la protéine mature TGF- $\alpha$ . Dans tous les autres cas, l'essai de reconnaissance a été fait avec 5X10<sup>4</sup> lymphocytes T (ou moins lorsque le nombre de cellules est limité) et 5X10<sup>4</sup> CD40-B ou EBV-B chargés avec les peptides ou la protéine mature TGF- $\alpha$ . Les cellules effectrices et les CPA ont toujours été préalablement lavées dans du PBS, puis co-cultivées dans un volume de 100  $\mu$ l de milieu complet pour lymphocytes T dans le cas d'une plaque à 96 puits ELISPOT, ou dans un volume de 200  $\mu$ l dans le cas d'une plaque à 96 puits à fond plat. Les cellules ont été incubées 16-20 h.

### ELISPOT

Les plaques à 96 puits (MultiScreen-HTS<sup>TM</sup> et MultiScreen®-IP; Millipore; Bedford, MA) ont été incubées pendant 16-18 h à 4°C avec un anticorps monoclonal anti-IFN- $\gamma$  (5  $\mu$ g/ml, Mabtech; Stockholm, Sweden). Au jour suivant, les plaques ont été lavées avec du PBS, puis bloquées avec du milieu complet pour lymphocytes T pendant 2 h à 37°C. Ensuite, les cellules effectrices ont été distribuées dans les puits à 50  $\mu$ l/puits. Après 1 h, les CD40-B ou EBV-B ont été ajoutés aux cellules effectrices (50  $\mu$ l/puits), puis incubés pendant 16-18 h. Le lendemain, les surnageants ont été récoltés et congelés à -20°C pour évaluer la sécrétion de GM-CSF par ELISA, alors que les plaques à ELISPOT ont été lavées avec du PBS/0,01% Tween 20 (Sigma), puis incubées 2 h à 37°C avec un anticorps monoclonal biotinylé anti-IFN- $\gamma$  (2  $\mu$ g/ml, Mabtech) filtré (0,22  $\mu$ m). Finalement, les plaques ont été de nouveau lavées, puis incubées avec la Streptavidine-HRP (dilué 1:100 ou 1:1000, Mabtech) à la température ambiante. Après 45 min, les plaques ont été lavées avec du PBS/0,01% Tween 20 et ensuite avec du PBS seulement, puis les spots ont été révélés à l'aide du substrat 3-amino-9-éthyl-carbazole (AEC) (Sigma). Une fois les

plaques séchées, le nombre de spots a été évalué à l'aide de l'appareil « *ImmunoSpot* » (Cellular Technology Ltd., Cleveland, OH).

### ELISA

Les plaques à 96 puits à fond plat « *MaxiSorp* » (Nalge Nunc International, Rochester, NY) ont été incubées pendant une nuit à 4°C avec un anticorps monoclonal anti-IFN- $\gamma$  ou anti-GM-CSF (0,4  $\mu\text{g/ml}$ ; Endogen, Rockford, IL). Les plaques ont été lavées avec du PBS/0.5% Tween 20, puis ensuite bloquées 30 min avec du PBS/5%FBS. Les plaques ont été à nouveau lavées, puis l'anticorps secondaire biotinylé (IFN- $\gamma$  = 0,2  $\mu\text{g/ml}$ ; GM-CSF = 1,4  $\mu\text{g/ml}$ ) (Endogen) ainsi que les surnageants à évaluer ont été ajoutés à la plaque. Après 90 min d'incubation à la température ambiante, les plaques ont été lavées et incubées avec la Poly HRP20-streptavidine à 0,25  $\mu\text{g/ml}$  (Research Diagnostic Inc; Concord, MA) pendant 30-45 min, puis révélées avec un substrat TMB (Neogen, Lexington, KY) et du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. La densité optique a été lue à 450 nm avec le « *Versamax microplate reader* » (Molecular Device, Sunnyvale, CA).

### Clonage HLA-DR $\beta$ 1\*0402 et HLA-DR $\beta$ 1\*1305

Les gènes HLA-DR $\beta$ 1\*0402 et HLA-DR $\beta$ 1\*1305 ont été amplifiés par RT-PCR standard à l'aide de la « *Platinum Pfx DNA polymérase* » (Invitrogen) à partir de l'ADNc du patient #8. Séquence des amorces utilisées: HLA-DR $\beta$ 1\*0402 sens: CACCATGGTGTGTCTGAAGTTCCTGG; HLA-DR $\beta$ 1\*0402 anti-sens: TCAGCTCAGGAATCCTGTTGGC; HLA-DR $\beta$ 1\*1305 sens: CACCATGGTGTGTCTGAGGCTCCCTGG; HLA-DR $\beta$ 1\*1305 anti-sens: TCAGCTCAGGAATCCTCTTGGC. Le produit d'amplification a été détectée par migration sur un gel d'agarose 1,5% marqué au bromure d'éthidium. La bande de la taille attendue, c'est-à-dire 800 pb, a été découpée du gel, puis purifiée sur colonne selon le « *GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* » (Amersham Biosciences; Buckinghamshire, UK). Le produit de PCR a ensuite été cloné dans le vecteur d'expression pcDNA3.1 selon les instructions du « *pcDNA3.1 Directional TOPO Expression kit* » (Invitrogen). L'insertion des gènes HLA-DR $\beta$ 1\*0402 et HLA-DR $\beta$ 1\*1305 dans le vecteur

a été confirmée par PCR, alors que la séquence exacte des gènes a été vérifiée par séquençage.

### Transfection et nucléofection

Le jour précédent la transfection,  $1-1,5 \times 10^5$  cellules HEK-293T HLA-DR $\beta$ 1\*0401 ou HLA-DR $\beta$ 1\*0101 ont été cultivées dans des plaques à 12 puits. Les cellules ont été transfectées avec les plasmides pcDNA3.1/HLA-DR $\beta$ 1\*0402, pcDNA3.1/HLA-DR $\beta$ 1\*1305, pcDNA3.1/GFP ou pcDNA3.1/TGF- $\alpha$  selon les instructions du kit « *Lipofectamine Plus Reagent* » (Invitrogen). Dans d'autres expériences, ces cellules, ainsi que des CD40-B allogéniques ont été nucléofectés avec les mêmes plasmides à l'aide du « *Human B cell nucleofector kit* » (Amaxa Biosystems ; Gaithersburg, MD). Lors de la nucléofection,  $1-3 \times 10^6$  cellules ont été lavées dans du PBS, puis re-suspendues dans  $100 \mu$ l de solution Amaxa. Les cellules ont été nucléofectées avec  $2 \mu$ g de plasmide, puis mises en culture à  $1 \times 10^6$  cellules/ml. Nous avons regardé les cellules transfectées ou nucléofectées avec pcDNA3.1/GFP au microscope à fluorescence ou en cytométrie du flux, afin de confirmer que chaque expérience de transfection ou de nucléofection a fonctionné.

### Analyses statistiques

L'existence d'une association entre l'expression du TGF- $\alpha$  et les facteurs clinico-pathologiques, ainsi que des différences entre les TIIC et les PBMC, ont été testés avec les tests paramétriques suivants : t-test si deux groupes indépendants et test d'analyse de variances à un facteur si plus de deux groupes. Le test Levene a toujours été préalablement effectué afin d'assurer l'homogénéité de variance. Dans les cas où les variables n'étaient pas homogènes, les valeurs ont été transformées en log ou encore en racine carrée. Dans le cas de l'association de l'expression du TGF- $\alpha$  dans les tumeurs et les tissus normaux du rein autologue, le test paramétrique suivant a été effectué : t-test en séries appariées. Les tests statistiques utilisés ont été choisis avec l'aide de M. Robert Boileau, bio-statisticien au CHUM. Tous les tests statistiques ont été effectués avec le logiciel « *SPSS 13.0* » pour Windows (LEAD Technologies, Chicago, IL). Les valeurs de  $p < 0.05$  ont été considérées statistiquement significatives.

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

### 3.1 Étude des populations de cellules immunitaires qui infiltrent les cancers du rein

Il a déjà été démontré que les RCC sont davantage infiltrés par des lymphocytes comparativement à d'autres types de cancers<sup>95</sup> et que parmi ces lymphocytes, il semble y avoir une expansion clonale de lymphocytes T qui pourraient être spécifiques à la tumeur et ainsi participer à la réponse immunitaire anti-tumorale<sup>96,97</sup>. Notre objectif est d'identifier les différentes populations de TIIC qui infiltrent les RCC et de caractériser le phénotype naïf ou mémoire, ainsi que le degré d'activation des lymphocytes T.

#### 3.1.1 Phénotype des lymphocytes T

Des analyses par cytométrie de flux à quatre couleurs ont été utilisées pour comparer l'immuno-phénotype des PBMC et des TIIC de patients atteints du cancer du rein. Les analyses ont été réalisées en ciblant les cellules de la région R1 établie selon la granulométrie (*side scatter* = SSC) et la taille (*forward scatter* = FSC) des cellules (figure 9a). Un marquage au 7-AAD a permis d'exclure les cellules mortes (figure 9b).

Les tumeurs du rein analysées sont caractérisées par une infiltration de lymphocytes T, dont des cellules CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> et CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (figure 9c). Cependant, le ratio CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>/CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> est plus élevé dans les PBMC que dans les TIIC (3,02±2,51 et 1,13±0,87, p = 0,02) (figure 9d). Le ratio CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>/CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> est particulièrement élevé dans les PBMC du patient #28 (représenté par un point jaune), donc si nous excluons ce patient, l'écart type est diminué et la différence entre le ratio des PBMC et celui des TIIC demeure significative (p = 0,004).



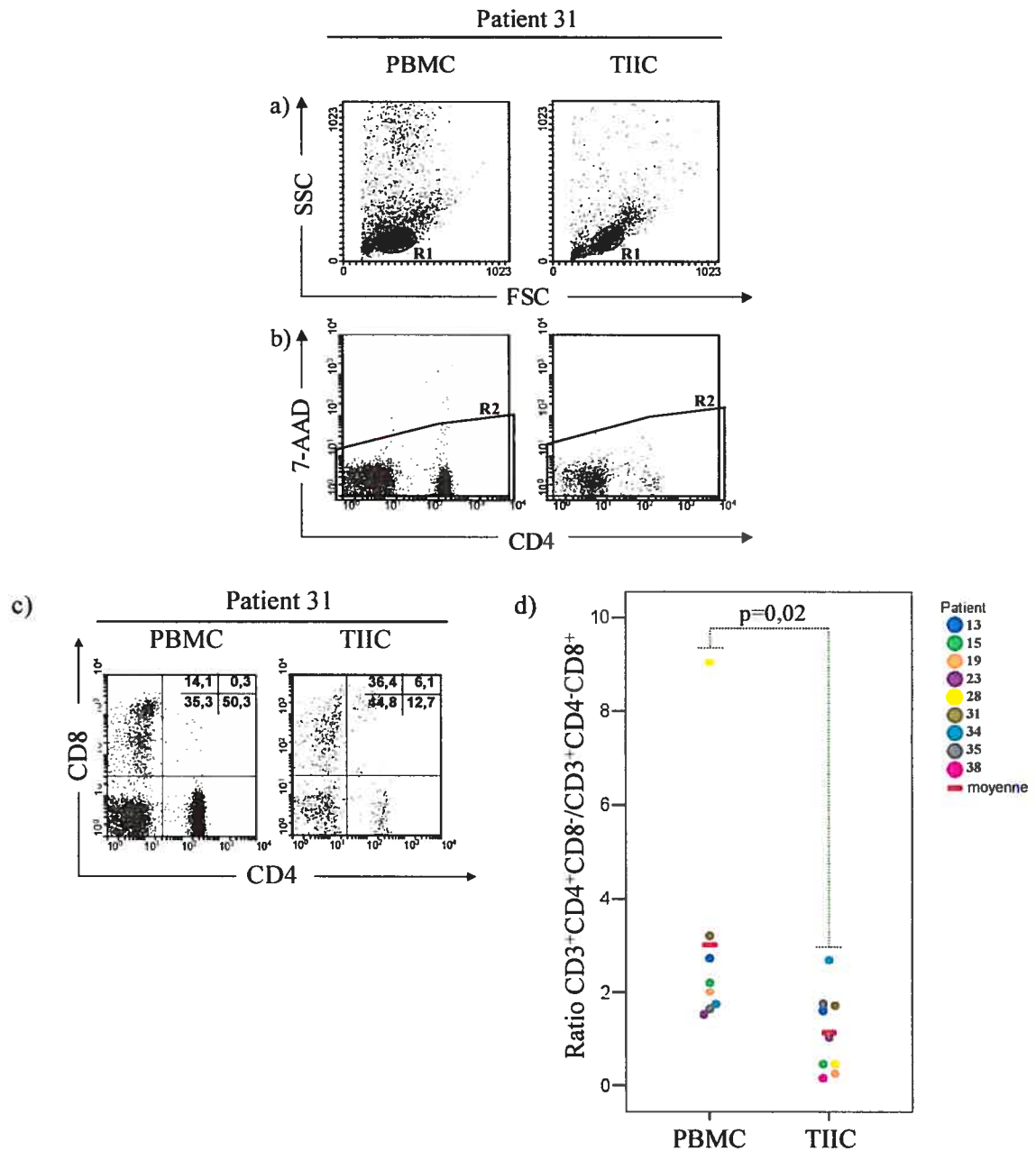


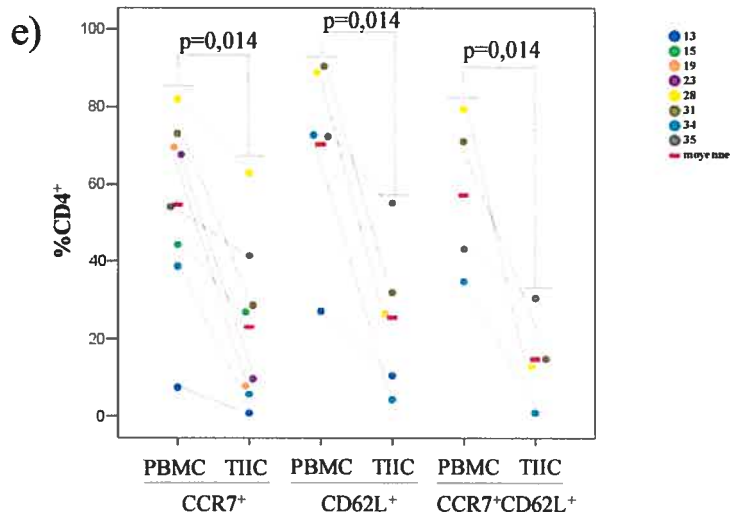
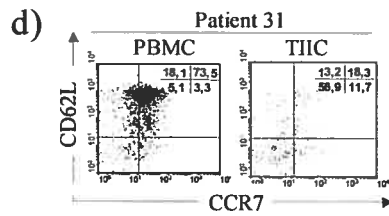
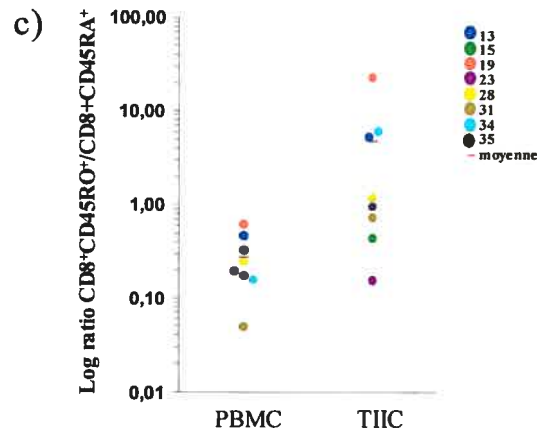
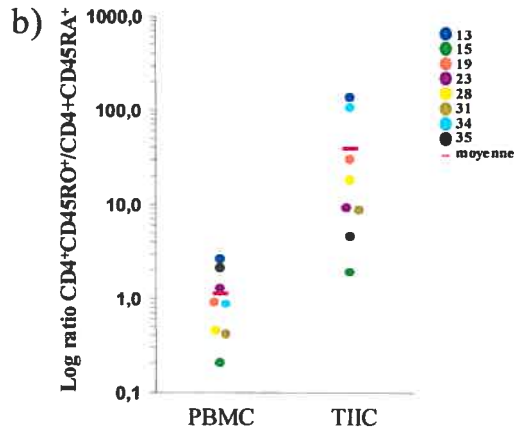
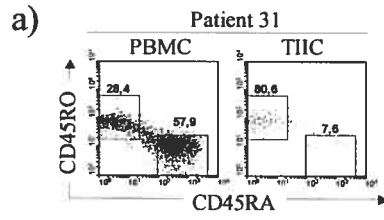
Figure 9 : Étude des lymphocytes T  $CD3^+CD4^+CD8^-$  et  $CD3^+CD4^-CD8^+$  parmi les PBMC et les TIIC.

- a) Nuage de points FSC/SSC des PBMC et des TIIC enrichies.
- b) Nuage de points CD4/7-AAD des PBMC et des TIIC ciblé sur la région R1. La région R2 correspond aux cellules vivantes.
- c) Nuage de points CD4/CD8 des PBMC et des TIIC enrichies ciblé sur la région R1 et R2. Le pourcentage d'événement dans chaque quadrant est indiqué dans le coin supérieur droit de chaque nuage de points.

d) Le ratio  $CD3^+CD4^+CD8^-/CD3^+CD8^+CD4^-$  de chaque patient est représenté par un point de couleur différente, alors que la moyenne des PBMC et des TIIC est représentée par une ligne rouge horizontale.

Nous avons ensuite étudié le phénotype des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> parmi les PBMC et les TIIC. Les premiers marqueurs de surface étudiés ont été CD45RA et CD45RO, permettant de différencier entre un phénotype naïf et mémoire, respectivement. Pour ce qui est des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, le pourcentage des cellules CD45RA<sup>+</sup> est plus élevé dans les PBMC que dans les TIIC (40,65±14,06% et 6,37±5,55%) alors que le pourcentage de cellules CD45RO<sup>+</sup> est plus faible dans les PBMC que les TIIC (36,16±15,95% et 68,64±22,67%,  $p = 0,005$ ) (figure 10a et b). Cette observation se reproduit pour les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (CD45RA<sup>+</sup> : 62,23±18,56% et 28,80±23,48%,  $p = 0,007$ ; CD45RO<sup>+</sup> : 14,63±5,51% et 38,22±22,23%,  $p = 0,013$ ) (figure 10c).

Nous avons également étudié des sélectines, comme le CD62L, et des récepteurs de chémokines, comme le CCR7, à la surface des lymphocytes T. Le CD62L est impliqué dans la localisation des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques périphériques, alors que la co-expression de CCR7 semble nécessaire pour leur migration dans la région des lymphocytes T des ganglions lymphatiques<sup>236-238</sup>. En comparaison avec les PBMC, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> parmi les TIIC expriment moins de CD62L et également moins de CCR7 (CD62L<sup>+</sup> : 70,42±25,62% et 25,73±19,91%,  $p = 0,015$ ; CCR7<sup>+</sup> : 54,69±24,11% et 23,09±21,32%,  $p = 0,015$ ; CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> : 57,20±21,57% et 14,86±12,14%,  $p = 0,014$ ) (figure 10d et e). En ce qui concerne les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, le pourcentage de cellules CCR7<sup>+</sup> est le même parmi les TIIC et les PBMC, alors que le pourcentage de cellules CD62L<sup>+</sup> est plus élevé dans les PBMC, mais pas de façon significative (CD62L<sup>+</sup> : 43,21±26,46% et 15,83±17,18%; CCR7<sup>+</sup> : 21,51±11,98% et 21,10±21,72%; CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> : 27,12±21,60% et 6,98±7,6%) (figure 10f).



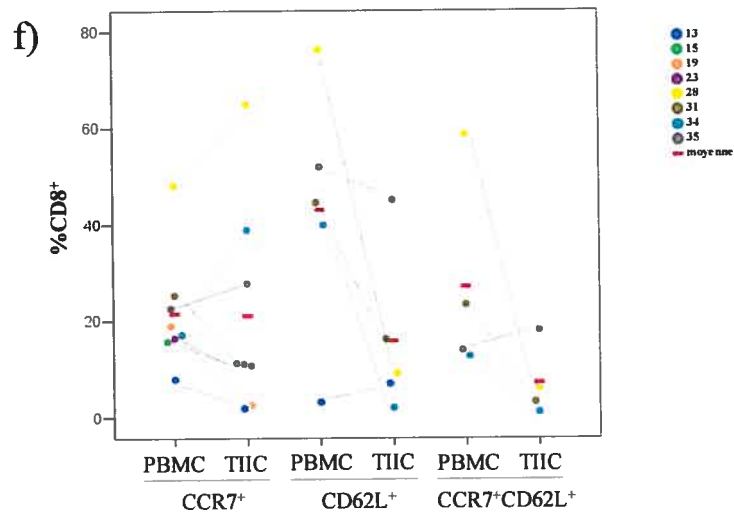


Figure 10: Phénotype mémoire et naïf des lymphocytes T  $CD4^+$  et  $CD8^+$ .

a) Nuage de points CD45RA/RO représentatif des PBMC et des TIIC enrichies ciblé sur les cellules  $CD4^+$ . Les cellules intermédiaires exprimant faiblement CD45RA ou CD45RO sont exclues.

Graphique représentant le log du ratio  $CD45RO^+/CD45RA^+$  parmi les cellules b)  $CD4^+$  et c)  $CD8^+$ . Nous avons choisi de représenter le log du ratio  $CD45RO^+/CD45RA^+$ , afin de mieux visualiser les points dont le ratio est  $<1$ .

d) Nuage de points CCR7/CD62L représentatif des PBMC et des TIIC enrichies ciblé sur les cellules  $CD4^+$ . Le pourcentage d'évènements dans chaque quadrant est indiqué dans le coin supérieur droit de chaque nuage de points.

Graphique représentant le pourcentage de cellules  $CCR7^+$  et  $CD62L^+$  parmi les cellules e)  $CD4^+$  et f)  $CD8^+$ .

Finalement, nous avons regardé deux marqueurs d'activation à la surface des lymphocytes T, soit HLA-DR qui est une molécule de classe II du CMH et CD25 qui est la chaîne  $\alpha$  du récepteur de haute affinité de l'IL-2. Le pourcentage de cellules CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> est remarquablement faible dans les PBMC comparativement aux TIIC ( $14,01 \pm 12,26\%$  et  $72,28 \pm 12,28\%$ ,  $p < 0,001$ ) (figure 11a et b). Pour les patients #7 et #8, nous avons évalué si c'était davantage les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> qui étaient HLA-DR<sup>+</sup>. Dans les deux cas, les cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> expriment des niveaux semblables de HLA-DR. Le CD25 est un autre marqueur d'activation, mais sa forte expression (CD25<sup>high</sup>) est également un marqueur de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs (T<sub>reg</sub>). La proportion de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> qui sont CD25<sup>+</sup> ou CD25<sup>high</sup> est semblable parmi les PBMC et les TIIC (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>:  $22,90 \pm 9,00$  et  $29,76 \pm 18,54$ ; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>:  $3,79 \pm 2,00$  et  $5,63 \pm 5,68$ ; CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>:  $8,23 \pm 8,83$  et  $9,70 \pm 10,10$ ; CD8<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>:  $1,14 \pm 1,82$  et  $1,50 \pm 2,30$ ) (figure 11c).

En conclusion, comparativement aux PBMC, les lymphocytes T qui infiltrent les tumeurs sont davantage CD45RO<sup>+</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CCR7<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> et une certaine sous-population sont CD25<sup>+</sup>. Par conséquent, un plus grand nombre de TIIC possèdent un phénotype mémoire.

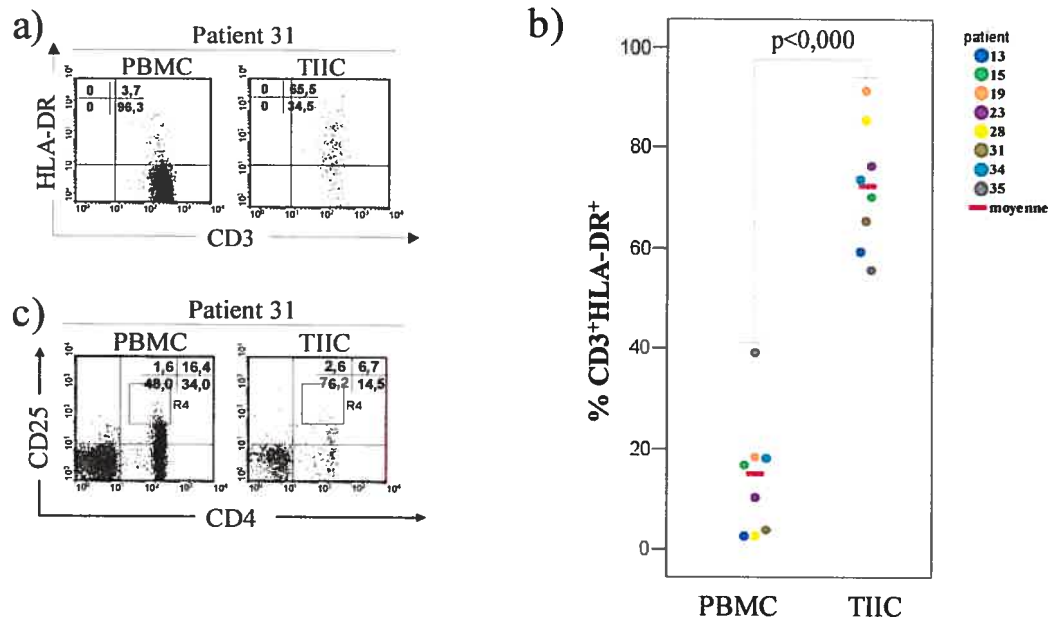


Figure 11: Étude des marqueurs d'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>.

a) Nuage de points CD3/HLA-DR représentatif des PBMC et des TIIC enrichies ciblé sur les cellules CD3<sup>+</sup>. Le pourcentage d'évènements dans chaque quadrant est indiqué dans le coin supérieur gauche de chaque nuage de points.

b) Le pourcentage de cellules CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> est plus faible dans les PBMC que les TIIC. Chaque patient est représenté par un point de couleur différente, alors que la moyenne des PBMC et des TIIC est représentée par une ligne rouge horizontale.

c) Nuage de points CD4/CD25 représentatif des PBMC et des TIIC enrichies. Le pourcentage d'évènements dans chaque quadrant indiqué dans le coin supérieur droit de chaque dot plot est ciblé sur la région R2. La région R4 est ciblée sur les T<sub>reg</sub> qui expriment CD25<sup>high</sup>.

### 3.1.2 Caractérisation des autres populations cellulaires CD3<sup>+</sup>

Parmi les TIIC, nous avons observé la présence de deux autres populations de cellules CD3<sup>+</sup>. D'abord, des cellules CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ont été retrouvées parmi les PBMC à une fréquence plus faible que parmi les TIIC (1,47±1,62% et 5,18±3,86%, p = 0,01) (figure 12a). Deuxièmement, nous avons observé autant parmi les PBMC que les TIIC une population de cellules CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (3,26±1,69% et 4,71±3,12%) (figure 12b et c). Ce qui est intéressant, c'est que le pourcentage de cette population est semblable dans les PBMC et les TIIC du même patient. Cette population pourrait être associée à des lymphocytes T TCRγδ ou à des cellules NKT.



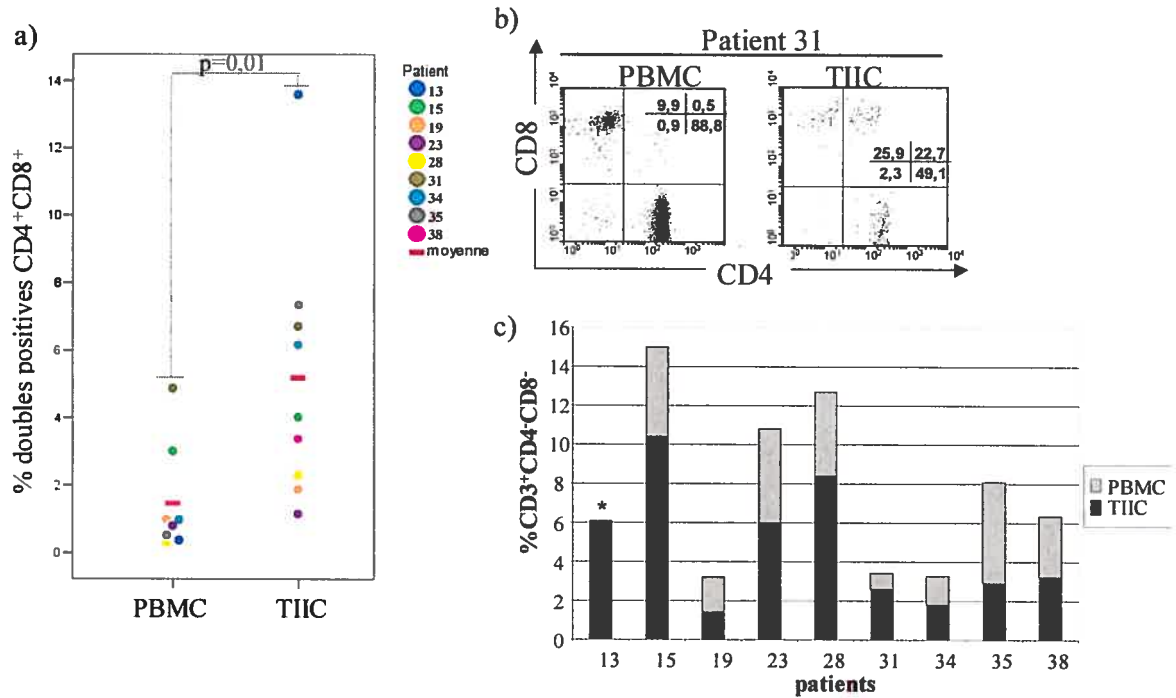


Figure 12: Caractérisation des autres populations cellulaires  $CD3^+$ .

a) Le pourcentage de cellules  $CD4^+CD8^+$  est plus faible dans les PBMC que dans les TIIC. Chaque patient est représenté par un point de couleur différente et la moyenne des PBMC et des TIIC est représentée par une ligne rouge horizontale.

b) Nuage de points CD4/CD8 représentatif des PBMC et des TIIC enrichies ciblé sur les cellules  $CD3^+$ . Le pourcentage d'évènements dans chaque quadrant est indiqué dans le coin supérieur droit de chaque nuage de points.

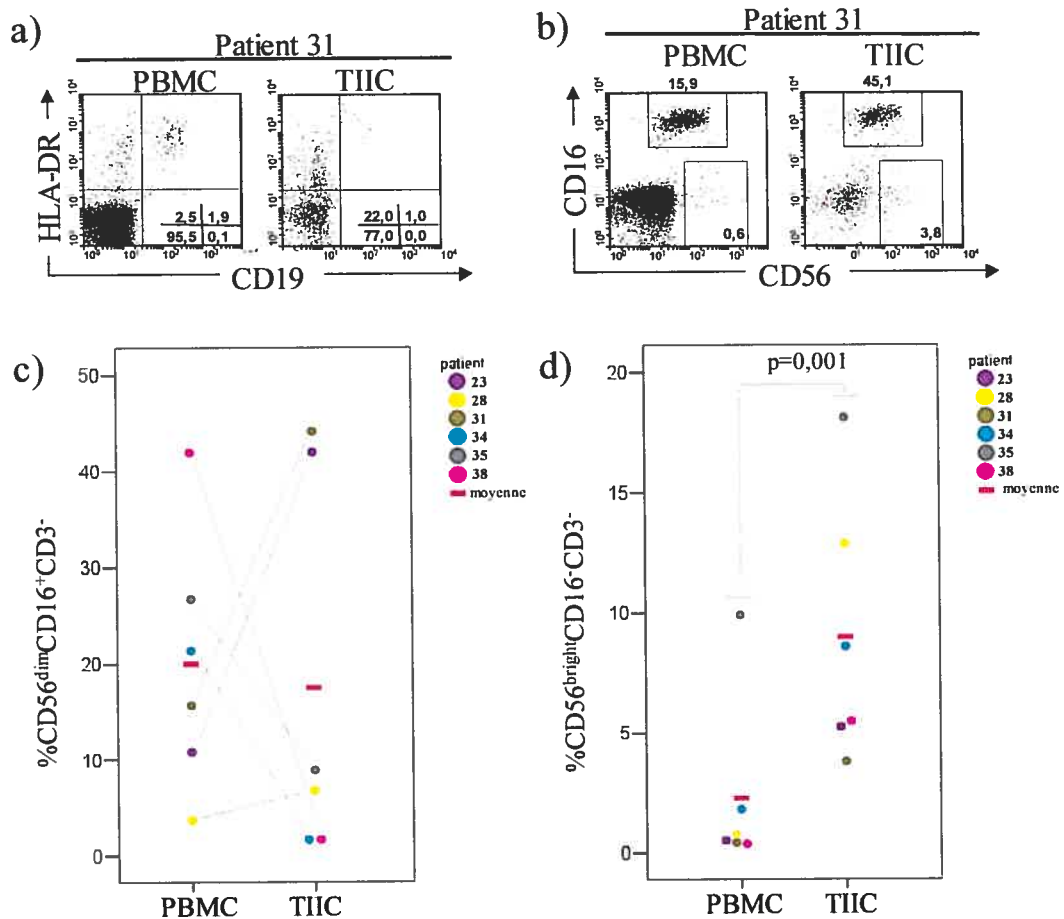
c) Graphique représentant la proportion de cellules  $CD3^+CD4^-CD8^-$  parmi les PBMC et les TIIC. \*Les PBMC du patient #13 n'ont pas été analysées.

### 3.1.3 Caractérisation des autres leucocytes

Finalement, nous avons évalué si les tumeurs du rein étaient infiltrées par d'autres populations de leucocytes, comme par exemple des lymphocytes B et des cellules NK. Nous avons observé la présence de cellules  $CD19^+HLA-DR^+$ , soit des lymphocytes B, dans des proportions similaires parmi les PBMC et les TIIC ( $4,02\pm 3,75\%$  et  $3,10\pm 2,71\%$ ) (figure 13a). Il est à noter que les pourcentages de lymphocytes B parmi les PBMC et les TIIC sont inférieurs à ceux parmi les PBMC de donneurs normaux ( $11,8\pm 4,6\%$ ) rapportés dans la littérature<sup>239</sup>.

Les tumeurs du rein sont également caractérisées par une infiltration de deux populations distinctes de cellules NK, soit les  $CD56^{dim}CD16^+CD3^-$  et les  $CD56^{bright}CD16^-CD3^-$ . La première population est reconnue pour ses capacités cytotoxiques, alors que la deuxième joue un rôle dans la sécrétion de nombreuses cytokines. Les NK  $CD56^{dim}CD16^+CD3^-$  sont retrouvés à des niveaux semblables parmi les PBMC et les TIIC ( $20,03\pm 13,46\%$  et  $17,50\pm 20,06\%$ ) (figure 13b et c), alors que les NK  $CD56^{bright}CD16^-CD3^-$  sont moins abondants dans les PBMC ( $0,70\pm 0,74\%$  et  $6,43\pm 5,17\%$ ,  $p = 0,001$ ) (figure 13d).

Les pourcentages des différentes populations de cellules immunitaires parmi les TIIC et les PBMC sont récapitulés dans le tableau IV.



**Figure 13: Infiltration de lymphocytes B et de cellules NK.**

a) Nuage de points CD19/HLA-DR des PBMC et des TIIC enrichies ciblé sur la région R1. Le pourcentage d'évènements dans chaque quadrant est indiqué dans le coin inférieur droit de chaque dot plot.

b) Nuage de points CD56/CD16 des PBMC et des TIIC enrichies ciblé sur la région R1. Le pourcentage d'évènements dans chacune des deux populations de cellules NK est indiqué pour chaque nuage de points.

Les cellules c) NK CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> et d) NK CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup> parmi les PBMC et les TIIC. Chaque patient est représenté par un point de couleur différente et la moyenne des PBMC et des TIIC est représentée par une ligne rouge horizontale.

	n =	PBMC		TIIC		p=
		%	Écart-type	%	Écart-type	
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	9*	35,69	10,69	20,39	16,51	<b>0,041</b>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	9*	14,66	5,09	26,43	19,77	>0,05
ratio CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> /CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> **	9*	3,02	2,51	1,13	0,87	<b>0,020</b>
CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> (% des CD4 <sup>+</sup> )	8	40,65	14,06	6,37	5,55	>0,05
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (% des CD4 <sup>+</sup> )	8	36,16	15,95	68,64	22,67	<b>0,005</b>
CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> (% des CD8 <sup>+</sup> )	8	62,23	18,56	28,80	23,48	<b>0,007</b>
CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (% des CD8 <sup>+</sup> )	8	14,63	5,51	38,22	22,23	<b>0,013</b>
CD4 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> (% des CD4 <sup>+</sup> )	8	54,69	24,11	23,09	21,32	<b>0,015</b>
CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> (% des CD4 <sup>+</sup> )	5	70,42	25,62	25,73	19,91	<b>0,015</b>
CD8 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> (% des CD8 <sup>+</sup> )	8	21,51	11,98	21,10	21,72	>0,05
CD8 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> (% des CD8 <sup>+</sup> )	5	43,21	26,46	15,83	17,18	>0,05
CD3 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> (% des CD3 <sup>+</sup> )	3	68,81	14,43	19,91	2,23	<b>0,004</b>
CD4 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> (% des CD4 <sup>+</sup> )	4	57,20	21,57	14,86	12,14	<b>0,014</b>
CD8 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> (% des CD8 <sup>+</sup> )	4	27,12	21,60	6,98	7,60	>0,05
CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> (% des CD3 <sup>+</sup> )	8	14,01	12,26	72,28	12,28	<b>&lt;0,000</b>
CD4 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> (% des CD4 <sup>+</sup> )	2	24,79	14,33	65,69	20,04	***
CD8 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> (% des CD8 <sup>+</sup> )	2	36,04	19,54	75,56	17,52	***
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	8	8,54	4,1	5,97	1,29	>0,05
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> (% des CD4 <sup>+</sup> )	8	22,90	9,0	29,76	18,54	>0,05
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup>	8	1,33	0,9	1,10	0,67	>0,05
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> (% des CD4 <sup>+</sup> )	8	3,79	2,0	5,63	5,68	>0,05
CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	8	1,07	1,00	1,9	1,6	>0,05
CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> (% des CD8 <sup>+</sup> )	8	8,23	8,83	9,7	10,1	>0,05
CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup>	8	0,24	0,36	0,2	0,3	>0,05
CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> (% des CD8 <sup>+</sup> )	8	1,14	1,82	1,5	2,3	>0,05
CD8 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	9*	1,47	1,62	5,18	3,86	<b>0,010</b>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>	9*	3,26	1,69	4,71	3,12	>0,05
CD19 <sup>+</sup> DR <sup>+</sup>	7	4,02	3,75	3,1	2,71	>0,05
CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>dim</sup> CD3 <sup>-</sup>	6	20,03	13,46	17,50	20,06	>0,05
CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>bright</sup> CD3 <sup>-</sup>	6	0,70	0,74	6,43	5,17	<b>0,001</b>

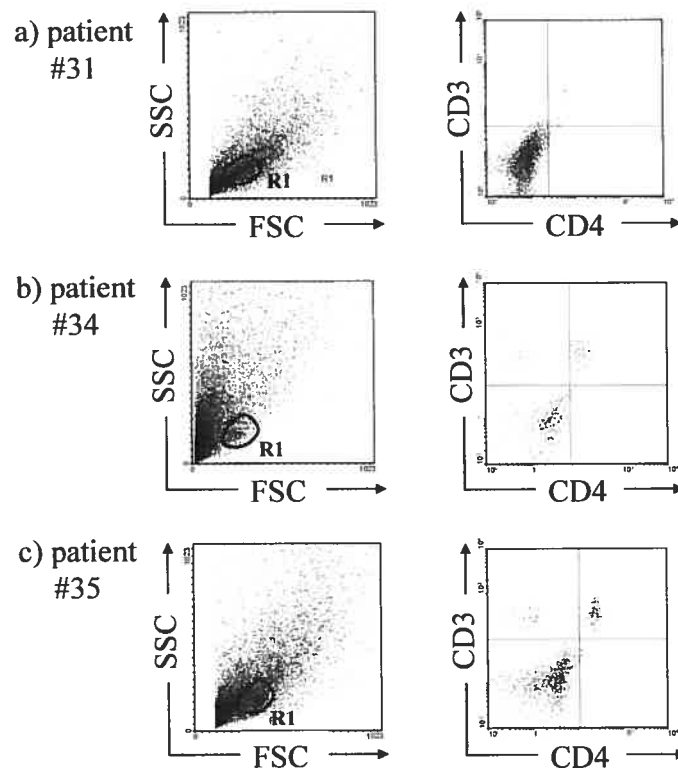
Tableau IV: Récapitulatif des différentes populations de cellules immunitaires parmi les PBMC et les TIIC.

À moins d'avis contraire, les pourcentages sont ceux de toutes les cellules de la région R2, telle que définie dans la figure 3a. \*n = 9 pour les TIIC, mais n = 8 pour les PBMC. \*\*Le ratio CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>/CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> a été calculé à partir de la moyenne des ratios. \*\*\*Aucun test statistique n'a été effectué puisque le nombre d'échantillons est trop petit (n = 2).

### 3.1.4 Tumeur bénigne et tissu normal du rein

Nous avons eu la chance d'avoir une tumeur rénale bénigne de type angiomyolipome. Nous avons réussi à extraire assez de TIIC pour faire une analyse complète par cytométrie de flux. Parmi les TIIC, la seule différence retrouvée est qu'il y a beaucoup plus de cellules NK  $CD56^{bright}CD16^{-}CD3^{-}$  dans la tumeur bénigne que dans les 6 tumeurs malignes analysées dans la section 3.1.3 ( $20,87\%$  et  $6,43\pm 5,17\%$ ). En ce qui concerne les PBMC du patient atteint de la tumeur bénigne, le pourcentage de lymphocytes T  $CD3^{+}CD4^{+}CD8^{-}$  et  $CD3^{+}CD4^{-}CD8^{+}$  est inférieur à celui des tumeurs malignes ( $CD3^{+}CD4^{+}CD8^{-}$ :  $17,49\%$  et  $35,69\pm 10,69\%$ ;  $CD3^{+}CD4^{-}CD8^{+}$ :  $5,86\%$  et  $14,66\pm 5,09\%$ ), mais le ratio  $CD3^{+}CD4^{+}CD8^{-} / CD3^{+}CD4^{-}CD8^{+}$  demeure le même ( $2,98$  et  $3,02\pm 2,51$ ). Ces observations sont très intéressantes puisqu'elles pourraient refléter des différences de populations infiltrant les tissus bénins et cancéreux, mais un nombre plus élevé d'échantillons bénins serait nécessaire pour tirer des conclusions.

Nous avons tenté de faire les mêmes analyses à partir des tissus normaux du rein des patients #31, #34 et #35, mais ces tissus ne semblent pas infiltrés par un grand nombre de cellules immunitaires même si les échantillons de tissus normaux étaient de volume et de masse supérieurs aux tumeurs (figure 14).



*Figure 14: Étude des cellules immunitaires infiltrant les tissus normaux du rein*

a) patient #31, b) patient #34, c) patient #35. À gauche, nuage de points FSC/SSC des cellules immunitaires infiltrant les tissus normaux du rein. À droite, nuage de points CD4/CD3 ciblé sur la région R1.

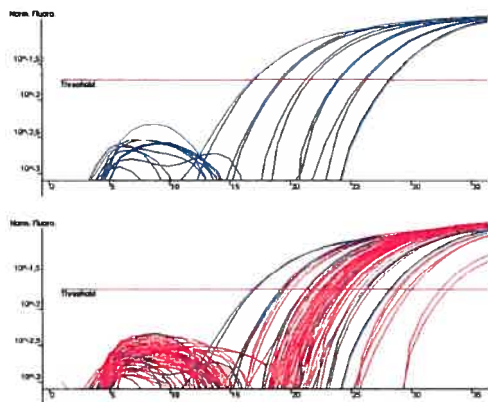
## 3.2 Profil d'expression du TGF- $\alpha$

Les tumeurs VHL<sup>-/-</sup>RCC possèdent des mutations au niveau du gène VHL qui affectent les fonctions du pVHL. Le pVHL n'est alors plus capable de dégrader le HIF- $\alpha$  et il y a transcription de divers gènes impliqués dans la réponse cellulaire à l'hypoxie, tels que le VEGF et le TGF- $\alpha$ . La sur-expression subséquente du TGF- $\alpha$  provoque une boucle autocrine où le TGF- $\alpha$  produit par les cellules VHL<sup>-/-</sup>RCC se lie à son récepteur, le EGFR, à la surface des mêmes cellules, menant à la formation des VHL<sup>-/-</sup>RCC<sup>166</sup>. Il a déjà été démontré que le TGF- $\alpha$  est sur-exprimé dans les RCC comparativement aux tissus sains du rein autologue<sup>162-165</sup> et nous avons également voulu confirmer ces observations à l'aide d'une technique quantitative et moderne, soit le RT-PCR quantitatif.

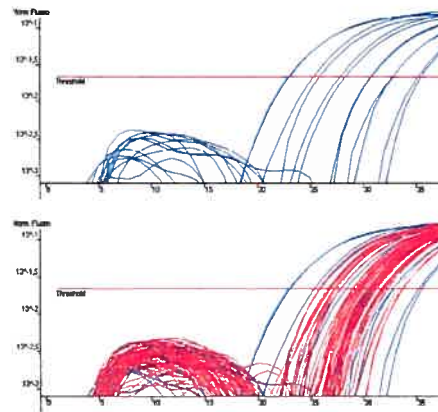
### 3.2.1 Expression du TGF- $\alpha$ dans les tumeurs et tissus normaux du rein

#### 3.2.1.1 Gènes de référence

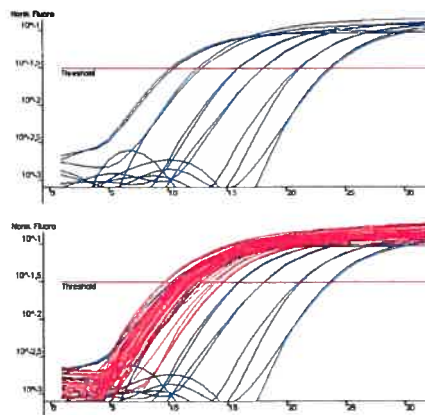
L'ARN a été extrait de la tumeur et du tissu normal du rein autologue de 23 patients. Afin de choisir le meilleur gène de référence, par RT-PCR quantitatif nous avons évalué l'expression de trois gènes de référence couramment utilisés, soit la  $\beta$ -actine, l'ARN polymérase II et la sous-unité 18S du ribosome. La figure 15 représente les graphiques de la fluorescence en fonction du nombre de cycles. La  $\beta$ -actine varie considérablement entre les 13 tumeurs et tissus normaux autologues analysés. Les échantillons plus denses en actine- $\beta$  croisent le seuil au même cycle que la 2<sup>e</sup> dilution (1:25) de la courbe standard, alors que les échantillons l'exprimant faiblement sont à l'extérieur de la courbe standard (<1:15 625). Pour ce qui est de l'ARN polymérase II, elle varie également beaucoup entre les différents échantillons qui croisent le seuil aux mêmes cycles que la 2<sup>e</sup> (1:25) et la 6<sup>e</sup> (1:15 625) dilution de la courbe standard. Finalement, en ce qui concerne la sous-unité 18S du ribosome, son expression semble relativement stable parmi les échantillons de tumeurs et de tissus normaux, croisant le seuil aux mêmes cycles que la 1<sup>re</sup> (1:5) et la 3<sup>e</sup> (1:125) dilution de la courbe standard.

a)  $\beta$ -actine

## b) ARN polymérase II



## c) sous-unité 18S du ribosome



*Figure 15 : Évaluation de la  $\beta$ -actine, de l'ARN polymérase II et de la sous-unités 18S du ribosome comme gène de référence.*

Graphiques de la fluorescence (sur l'axe de l'ordonnée) en fonction du nombre de cycles (sur l'axe de l'abscisse) pour a) la  $\beta$ -actine, b) l'ARN polymérase II et c) la sous-unité 18S du ribosome. Le graphique pour chaque gène testé représente la courbe standard en duplicata (courbes bleues) préparée à partir de l'ADNc de la lignée de cancer du rein 786-0. Chaque courbe standard est constituée de 6 points dilués d'un facteur de 5 (de 1:5 à 1:15625). Les graphiques du bas représentent 13 tumeurs et 13 tissus normaux du rein autologue en duplicata (courbes rouges) qui superposent la courbe standard.



### 3.2.1.2 Lignées cellulaires

Toujours par RT-PCR quantitative, nous avons par la suite évalué l'expression relative du TGF- $\alpha$  dans des lignées cellulaires. Suite aux résultats décrits ci-dessus, la sous-unité 18S du ribosome semble être le meilleur gène de référence, donc l'expression du TGF- $\alpha$  a été normalisée avec l'expression de la sous-unité 18S du ribosome. L'expression relative a été calculée à l'aide de la formule mathématique développée par Dr Michael W. Pfaffl<sup>234</sup> (figure 16a). La lignée de cancer du rein A498 (VHL<sup>-/-</sup>RCC) sur-exprime le TGF- $\alpha$ <sup>166,167</sup> et a été utilisée comme contrôle dans cette équation donc son ratio = 1. L'expression du TGF- $\alpha$  dans cette lignée cancéreuse est diminuée d'un facteur de 2,5 lorsqu'elle est transfectée avec le gène VHL sauvage (colonne bleue pâle). La lignée KTCL (VHL<sup>-/-</sup>RCC) exprime également un niveau élevé du TGF- $\alpha$ , alors que le niveau d'expression dans la lignée HeLa (VHL sauvage) est presque indétectable.

### 3.2.1.3 Échantillons cliniques

Nous avons par la suite évalué l'expression relative du TGF- $\alpha$  dans 23 échantillons cliniques de tumeurs et de tissus normaux du rein autologue (figure 16a). En ce qui concerne les échantillons cliniques du rein, nous observons que l'expression du TGF- $\alpha$  est variable d'une tumeur à l'autre, allant d'un ratio de 0,004 à 2,4, alors qu'elle est plus stable dans les tissus sains, allant d'un ratio de 0,009 à 0,289. De plus, la différence d'expression du TGF- $\alpha$  entre les 22 tumeurs malignes (ratio moyen = 0,615) et tissus normaux (ratio moyen = 0,092) est statistiquement significative ( $p = 0,003$ ).

Parmi les 23 échantillons de tumeurs analysés, 17 d'entre eux sont des CCRCC, 3 sont des RCC chromophobes (patients #4, 7, 24), 2 sont des RCC papillaires (patients #5, 18) et 1 est une tumeur bénigne (patient #29). L'expression relative moyenne du TGF- $\alpha$  dans les tumeurs CCRCC est de 0,780, alors que celle des autres tumeurs malignes est de 0,057 ( $p = 0,005$ ) (figure 16b), ce qui n'est pas surprenant, puisque les mutations du gène VHL n'ont été démontrées que dans les tumeurs CCRCC<sup>120</sup>. De plus, la différence d'expression du TGF- $\alpha$  entre les CCRCC et les tissus sains du rein autologue est significative ( $p = 0,002$ ) (figure 16c), mais celle entre les autres tumeurs malignes et les

tissus sains du rein autologue n'est pas significative (figure 16d). Aucune corrélation n'a pu être établie entre l'expression du TGF- $\alpha$  et le grade, ou la taille des tumeurs CCRCC.

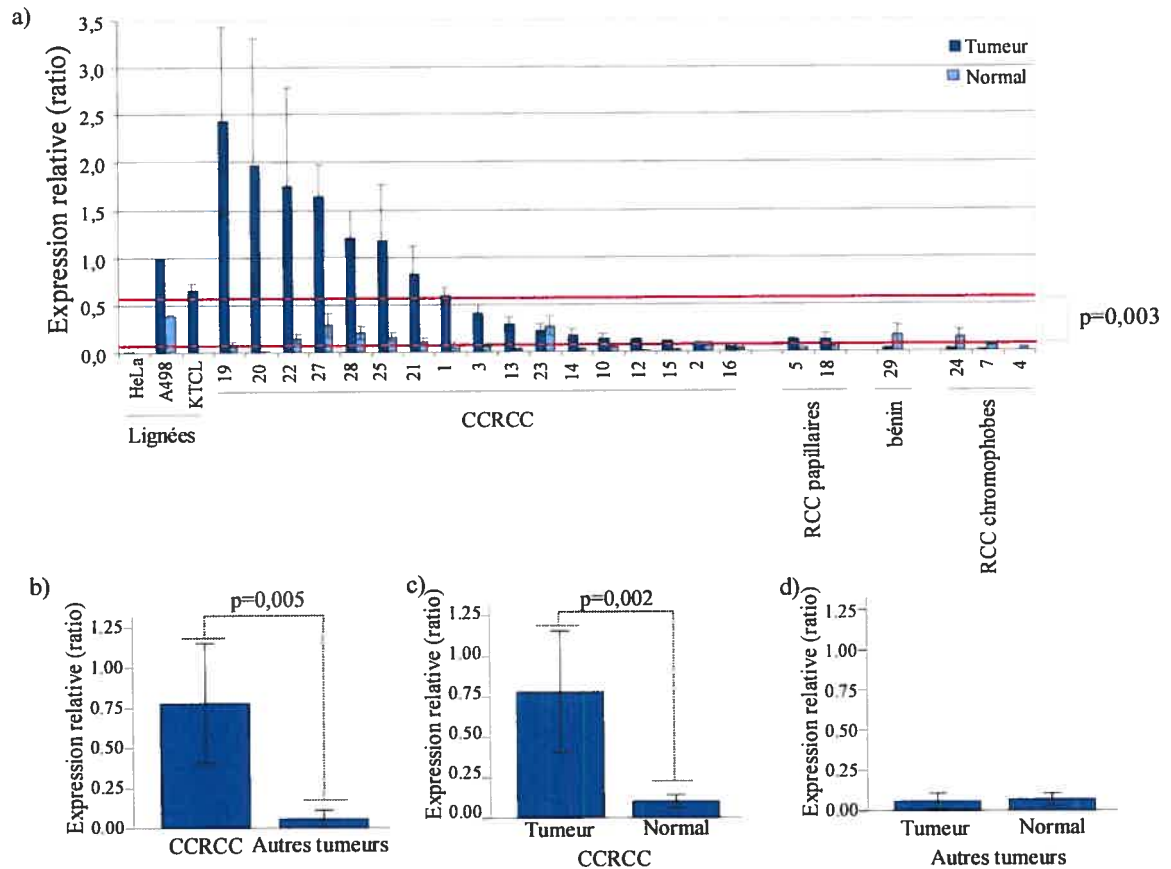
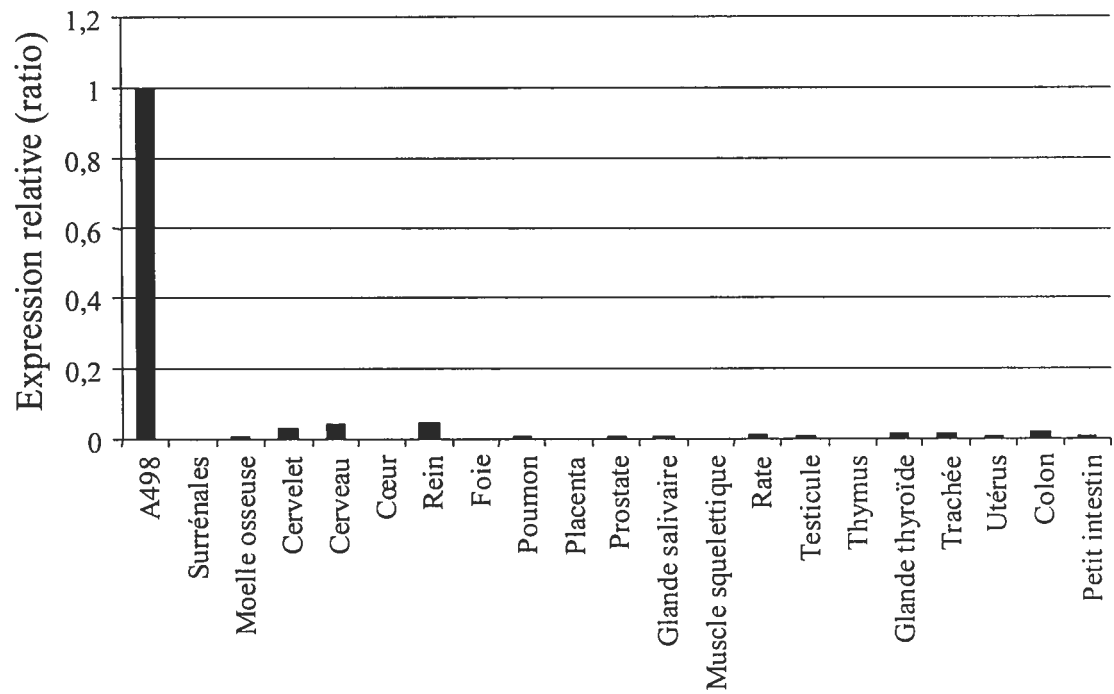


Figure 16: Expression relative du TGF- $\alpha$  dans les tumeurs et tissus normaux du rein.

- a) Expression relative du TGF- $\alpha$  par rapport à la lignée de cancer du rein A498 (ratio = 1), dans 23 tumeurs et tissus sains autologues. Les patients sont groupés selon l'histologie de leur tumeur. Les 2 lignes rouges horizontales représentent le ratio moyen des échantillons cliniques de tumeurs malignes et le ratio moyen des échantillons cliniques de tissus sains autologues.
- b) Le TGF- $\alpha$  est sur-exprimé dans les CCRCC comparativement aux autres tumeurs.
- c) Le TGF- $\alpha$  est sur-exprimé dans les CCRCC comparativement aux tissus sains du rein autologue.
- d) Le TGF- $\alpha$  n'est pas sur-exprimé dans les autres tumeurs comparativement aux tissus sains du rein autologue.

### 3.2.2 Expression du TGF- $\alpha$ dans les organes vitaux

Le TGF- $\alpha$  est fortement exprimé dans les VHL<sup>-/-</sup>RCC, mais des niveaux faibles à modérés du TGF- $\alpha$  ont été détectés dans quelques tissus normaux humains, tels que les seins<sup>184</sup>, le cerveau<sup>185</sup>, les poumons<sup>186</sup>, le système digestif<sup>187</sup>, les kératinocytes<sup>188-191</sup>, les reins<sup>162-165,192</sup> et les macrophages activés<sup>193</sup>. Nous avons évalué l'expression du TGF- $\alpha$  dans une banque d'ARN de 20 tissus normaux (figure 17). Tel que documenté, le TGF- $\alpha$  est absent ou faiblement exprimé dans les organes vitaux, comparativement à la lignée de cancer du rein A498. L'organe exprimant le plus le TGF- $\alpha$  est le rein, avec un ratio de 0,045. Il est intéressant de comparer ce ratio avec celui des 23 échantillons cliniques de reins normaux analysés dans la section précédente (3.2.1.3) qui ont un ratio d'expression moyen de 0,103. Cette différence d'expression peut s'expliquer par le fait que les échantillons de reins normaux recueillis dans notre étude proviennent de reins atteints d'une tumeur donc des cellules tumorales peuvent avoir contaminé le tissu normal péri-tumoral. Nous pouvons conclure que le TGF- $\alpha$  est absent ou faiblement exprimé dans les organes vitaux, donc une immunothérapie dirigée contre cette protéine serait moins dangereux pour la santé des patients traités.



*Figure 17: Expression du TGF- $\alpha$  dans les organes vitaux.*

Expression par rapport à la lignée de cancer du rein A498 (ratio = 1) normalisée avec la sous-unité 18S du ribosome.

### 3.3 Immunogénicité du TGF- $\alpha$

Plusieurs techniques ont permis l'expansion de lymphocytes T spécifiques à des AT, soit à partir des PBMC sensibilisées *in vitro* par des cellules tumorales<sup>240</sup>, ou à partir des TIIC<sup>241,242</sup>. Plusieurs de ces études ont démontré que les lymphocytes T peuvent reconnaître des épitopes d'AT présentés par les molécules de classe I<sup>243,244</sup> et de classe II du CMH<sup>245,246</sup>.

#### 3.3.1 Recherche de lymphocytes T spécifiques pour le TGF- $\alpha$ parmi les TIIC

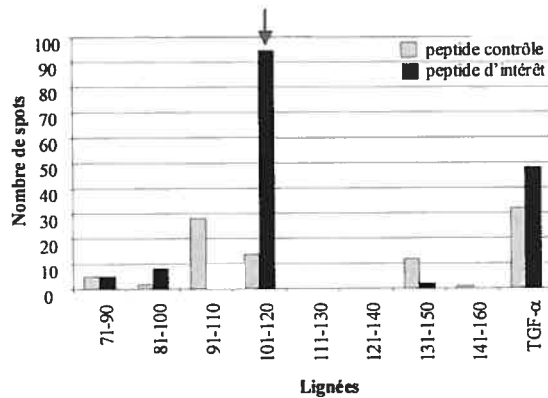
Il a déjà été démontré que les RCC sont davantage infiltrés par des lymphocytes comparativement à d'autres types de cancers<sup>95</sup> et que parmi ces lymphocytes, il semble y avoir une expansion clonale de lymphocytes T qui pourraient être spécifiques à la tumeur et ainsi participer à la réponse immunitaire anti-tumorale<sup>96,97</sup>. En effet, des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques pour des cellules RCC ont été identifiés parmi les TIIC de certains patients<sup>247-249</sup>. Dans le cadre de mon projet de maîtrise, j'ai recherché des lymphocytes T spécifiques pour le TGF- $\alpha$  parmi les TIIC.

Les tumeurs du rein de trois patients ont été homogénéisées, les TIIC ont été extraites par centrifugation, puis stimulées *in vitro* deux fois avec un des huit peptides synthétiques ou la protéine mature du TGF- $\alpha$  (figure 8a). Ces peptides sont dérivés du précurseur du TGF- $\alpha$  (pro-TGF- $\alpha$ ), ont une longueur de 20 acides aminés, puis se chevauchent tous de 10 acides aminés (figure 7). Après environ trois semaines de culture, nous avons fait un essai de reconnaissance, afin de vérifier la présence de lymphocytes T capables de reconnaître le TGF- $\alpha$ . Lors de l'essai de reconnaissance, chacune des lignées de lymphocytes T est co-cultivée avec des CPA autologues chargées avec le peptide d'intérêt (le peptide avec lequel la lignée a été stimulée) et avec des CPA chargées avec un peptide contrôle, donc un autre peptide du TGF- $\alpha$  avec lequel la lignée n'a pas été stimulée. Nous avons évalué la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par ELISPOT, puis la sécrétion de GM-CSF par ELISA. Les lignées ayant deux fois plus de cellules qui ont sécrété de l'IFN- $\gamma$ , donc deux fois plus de spots que le contrôle négatif, et ayant au moins dix spots ont été considérées

positives. Selon nos critères, la sécrétion de GM-CSF n'est pas obligatoire pour considérer une lignée comme étant positive.

Pour le patient #19, la lignée stimulée avec le peptide 101-120 du TGF- $\alpha$  a été considérée positive lors de l'ELISPOT (figure 18a). À l'aide des anticorps bloquant les CMH de classe I, les CMH de classe II ou les CMH de classe II HLA-DR à la surface des CPA, nous avons démontré que le peptide 101-120 est présenté par les CMH de classe II (figure 18b). Même si la sécrétion d'IFN- $\gamma$  n'est pas tout à fait le double du contrôle négatif, cette expérience nous démontre toutefois que cette lignée reconnaît le peptide 101-120 du TGF- $\alpha$  présenté par le CMH de classe II HLA-DR.

a) Essai de reconnaissance des lignées de lymphocytes T stimulées avec les différents peptides du TGF- $\alpha$ .



b) Essai de reconnaissance de la lignée 101-120 avec des anticorps bloquant la présentation du peptide.

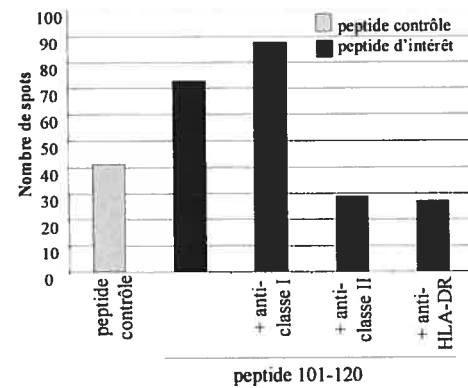


Figure 18: Les TIIC du patient #19 sont spécifiques pour le peptide 101-120 du TGF- $\alpha$ .

a) Des PBMC ont été stimulées avec des peptides ou la protéine mature du TGF- $\alpha$ , puis la reconnaissance a été évaluée sur la base de sécrétion d'IFN- $\gamma$  en ELISPOT. La flèche rouge indique une lignée de lymphocytes T positive.

b) La lignée positive dans le schéma a) (lignée 101-120) a été davantage caractérisée en bloquant la présentation du peptide 101-120 à l'aide d'anticorps bloquant. La reconnaissance du peptide 101-120 par cette lignée de lymphocytes T est bloquée par les anticorps bloquant le CMH de classe II et le CMH de classe II HLA-DR.



De plus, une lignée spécifique au peptide 71-90 du TGF- $\alpha$  a été produite à partir des TIIC du patient #20 et des lignées spécifiques aux peptides 71-90, 101-120 et 111-130 ont été produites à partir des TIIC du patient #21. Ces lignées spécifiques n'ont pas pu être caractérisées davantage dû à leur durée de vie limitée *in vitro*, mais les résultats démontrent toutefois qu'il y a des lymphocytes T spécifiques pour le TGF- $\alpha$  parmi les TIIC des RCC.

### 3.3.2 Recherche de lymphocytes T spécifiques pour le TGF- $\alpha$ parmi les TIIC, suite à leur culture selon le protocole de REP

Les tumeurs de 15 patients atteints de RCC ont été homogénéisées, les TIIC ont été extraites par gradient, puis mises en culture selon le protocole REP, afin de favoriser la prolifération non spécifique des lymphocytes T (figure 8b). Les quelques centaines de milliers de TIIC ont alors proliféré pendant 2-4 semaines pour donner plusieurs dizaines de millions de lymphocytes T (% de cellules CD3<sup>+</sup> = 40-99%, moyenne = 86%, n = 12). C'est alors à partir de ces cellules que nous avons recherché la présence de lymphocytes T spécifiques pour le TGF- $\alpha$ . Lors de l'essai de reconnaissance, les lymphocytes T sont co-cultivés avec des CPA chargées avec un des peptides du TGF- $\alpha$  et avec des CPA chargées avec un peptide contrôle, soit le peptide gp100<sub>170-190</sub>. Nous avons évalué la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par ELISPOT ou ELISA et la sécrétion de GM-CSF par ELISA. Tel que décrit dans la section précédente, les lymphocytes T doivent avoir sécrété deux fois plus d'IFN- $\gamma$  que le contrôle négatif pour être considérés comme positifs.

Des 15 patients analysés, 6 patients semblent avoir des lymphocytes T reconnaissant un ou plusieurs peptides du TGF- $\alpha$  (tableau V). Cependant, ces résultats sont difficiles à reproduire, puisque le protocole de REP stimule les lymphocytes T de façon non spécifique, donc d'un essai de reconnaissance à l'autre, la diversité des lymphocytes T varie beaucoup. Aucune corrélation n'a pu être établie entre la présence de lymphocytes T spécifiques et le niveau d'expression du TGF- $\alpha$  par les cellules tumorales du même patient. Même si ces résultats n'ont pas pu être caractérisés davantage, ils démontrent toutefois qu'il y a présence de lymphocytes T spécifiques pour le TGF- $\alpha$  au site de la tumeur. En conclusion, le fait que ces tumeurs prolifèrent en présence de lymphocytes T spécifiques pour le TGF- $\alpha$ , laisse croire que ces lymphocytes T sont soit tolérants ou anergiques.

Patients #	Peptides du TGF- $\alpha$							Protéine	
	71-90	81-100	91-110	101-120	111-130	121-140	131-150	141-160	TGF-alpha
1									
3			+			+			
6	+					+			+
8									
9	+			+	+	+			
10		+	+	+					+
11									
12									
13									
19	+	+							
20	+								
21									
22									
23									
27									

*Tableau V : Récapitulatif des patients pour lesquels des lymphocytes T spécifiques pour le TGF- $\alpha$  ont été identifiés, parmi les TIIC cultivées selon le protocole de REP.*

### 3.3.3 Recherche de lymphocytes T périphériques spécifiques pour le TGF- $\alpha$

Les PBMC ont été enrichies du sang périphérique par centrifugation, puis stimulées *in vitro* deux fois avec les peptides synthétiques ou la protéine mature du TGF- $\alpha$  (figure 8c). Après 16-27 jours de prolifération, nous avons évalué la présence de lymphocytes T spécifiques pour le TGF- $\alpha$  sur la base de sécrétion d'IFN- $\gamma$  par ELISPOT et de GM-CSF par ELISA, en co-cultivant chacune des lignées de lymphocytes T avec des CPA autologues chargées avec le peptide d'intérêt (le peptide avec lequel la lignée a été stimulée) et avec des CPA chargées avec un peptide contrôle, donc un autre peptide du TGF- $\alpha$  avec lequel la lignée n'a pas été stimulée. Dans le cas des patients #1 et #2, des CPA non chargées ont servi de contrôle négatif. Les critères pour considérer une lignée comme étant positive sont les mêmes que décrits dans les sections précédentes.

Des lymphocytes T spécifiques pour le TGF- $\alpha$  ont été recherchés parmi les PBMC de huit patients. Chez tous les patients, des lignées de lymphocytes T périphériques spécifiques pour au moins un des peptides ou la protéine mature du TGF- $\alpha$  ont été identifiées (tableau VI), et quelques-unes d'entre elles ont été caractérisées davantage.

Patient #	71-90	81-100	91-110	101-120	111-130	121-140	131-150	141-160	TGF- $\alpha$
<b>1</b>	0/8	4/5	2/8	-	-	4/8	5/8	7/8	3/8
<b>2</b>	1/8	2/8	7/8	-	-	0/8	0/8	5/8	2/8
<b>4</b>	0/8	0/8	1/8	0/8	2/8	0/8	0/8	0/8	1/8
<b>7</b>	0/8	0/8	3/8	1/8	1/8	0/8	1/8	2/8	2/8
<b>8</b>	2/8	0/8	0/8	0/8	0/8	3/8	0/8	0/8	0/8
<b>13</b>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	4/5
<b>14</b>	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/4	0/5
<b>22</b>	1/5	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5	1/5	2/5	0/5

*Tableau VI: Récapitulatif des patients pour lesquels des lymphocytes T périphériques spécifiques pour le TGF- $\alpha$  ont été identifiés.*

Les résultats sont présentés sous forme du « nombre de lignées positives/nombre de lignées stimulées ». Les lignées positives sont en rouge.

Tel que présenté au tableau VI, des lymphocytes T du patient #1 reconnaissent plusieurs peptides du TGF- $\alpha$ . La figure 19a et b montre un exemple, soit les lignées stimulées avec le peptide 131-150 du TGF- $\alpha$ . Plusieurs spécificités ont été perdues au fil des passages et des re-stimulations, mais les lignées 131-150B et 131-150F ont été caractérisées davantage (figure 19c). Avec des anticorps bloquant les CMH de classe I, les CMH de classe II ou les CMH de classe II HLA-DR, nous avons tenté de déterminer par quel CMH le peptide 131-150 du TGF- $\alpha$  est présenté. De façon surprenante, la reconnaissance du peptide par la lignée a été bloquée par les trois anticorps bloquants (figure 19d). Du fait au nombre limité de CD40-B disponibles, nous avons vérifié si les lymphocytes T étaient capables de se présenter le peptide entre eux, puisqu'il est connu que les lymphocytes T activés expriment les molécules du CMH de classe II. Ainsi, nous avons vérifié que les lymphocytes T sont capables de se présenter le peptide 131-150 entre eux (figure 19d). Une fois que nous avons démontré qu'une lignée de lymphocytes T peut reconnaître un peptide synthétique dérivé du TGF- $\alpha$ , il est important de démontrer que ce peptide peut être généré de façon naturelle lors de la dégradation de la protéine en peptides à l'intérieur des compartiments du CMH de classe II. Nous avons donc chargé des CD40-B avec du lysat tumoral autologue, du lysat tumoral allogénique, du lysat des lignées de cancer du rein 786-0 et WT-7, ainsi que du lysat du rein sain allogénique et du lysat de la lignée HeLa comme contrôle négatif. Cependant, aucun des lysats n'a été reconnu (figure 19d) et plusieurs facteurs peuvent expliquer pourquoi. D'abord, il est possible que le lysat tumoral autologue ou le lysat des lignées tumorales contiennent trop peu de TGF- $\alpha$  ou que ce dernier soit dégradé par les protéases présentes dans le sérum humain utilisé pour co-cultiver les lymphocytes T et les CPA. Il est également possible que les CD40-B ne soient pas aussi efficaces que les cellules dendritiques pour dégrader le TGF- $\alpha$  et présenter les peptides. Finalement, le peptide 131-150 du TGF- $\alpha$  n'est peut-être pas généré de façon naturelle lors de la dégradation de la protéine en peptides par le protéasome ou il ne se lie peut-être pas aux molécules de classe II du CMH avec une assez grande affinité.

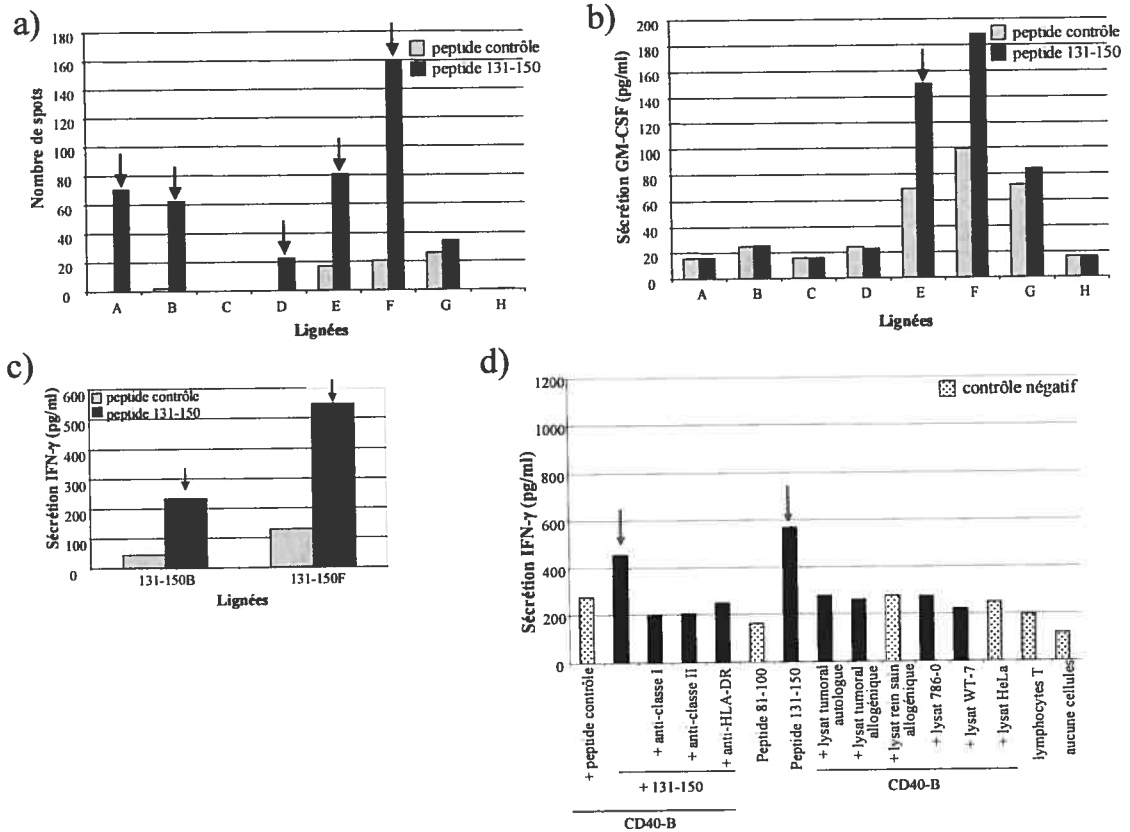


Figure 19: Des lymphocytes T du patient #1 reconnaissent le peptide 131-150 du TGF- $\alpha$ .

Sécrétion a) d'IFN- $\gamma$  en ELISPOT, b) de GM-CSF en ELISA, des huit lignées (A-H) stimulées avec le peptide 131-150 du TGF- $\alpha$ , lors du premier essai de reconnaissance. Les flèches rouges indiquent les lignées positives.

c) Sécrétion d'IFN- $\gamma$  en ELISA des lignées 131-150B et 131-150F, suite au protocole de REP.

d) Caractérisation de la lignée 131-150F sur la base de sécrétion d'IFN- $\gamma$  en ELISA.

En conclusion, à partir des PBMC de différents patients, j'ai établi plusieurs lignées de lymphocytes T spécifiques pour certains peptides du TGF- $\alpha$ . Finalement, les lignées de lymphocytes T du patient #8 sont celles qui ont été caractérisées le plus.

### 3.3.4 Caractérisation d'un clone de lymphocytes T périphériques spécifique au peptide 121-140 du TGF- $\alpha$

Lors du premier essai de reconnaissance des lignées du patient #8, trois lignées stimulées avec le peptide 71-90 et deux lignées stimulées avec le peptide 121-140 ont été considérées positives (figure 20a et b). La lignée 121-140E a ensuite été enrichie sur colonne magnétique à l'aide du « IFN- $\gamma$  Secretion Assay cell enrichment and detection kit » (figure 20c). Nous avons par la suite démontré, à l'aide des anticorps bloquant, que cette lignée reconnaît le peptide 121-140 présenté par le CMH de classe II HLA-DR et que cette reconnaissance est spécifique au HLA-DR du patient #8, puisque la lignée ne reconnaît pas le peptide présenté par des CD40-B allogéniques (figure 20d et e). Un typage à haute résolution du HLA-DR du patient #8, a révélé que ce patient a un allèle HLA-DR $\beta$ 1\*0402 et un allèle HLA-DR $\beta$ 1\*1305. La lignée de lymphocytes T a ensuite été cultivée selon le protocole de REP, afin de la caractériser davantage. Nous avons d'abord procédé à un essai de reconnaissance avec des CD40-B ou EBV-B allogéniques possédant un allèle HLA-DR se rapprochant à un des allèles du patient #8. Puisque tous les allèles HLA-DR $\beta$ 1\*04 par exemple, ont une séquence très semblable, le peptide 121-140 peut potentiellement être présenté par le CMH de classe II HLA-DR $\beta$ 1\*0402 et HLA-DR $\beta$ 1\*0401. Les CD40-B ou EBV-B suivants étaient disponibles dans notre laboratoire : HLA-DR $\beta$ 1\*0301\*0401, HLA-DR $\beta$ 1\*04011\*0701, HLA-DR $\beta$ 1\*03\*04, HLA-DR $\beta$ 1\*04\*13, HLA-DR $\beta$ 1\*03\*13 et HLA-DR $\beta$ 1\*0701\*1301. Cependant, la lignée 121-140E n'a pas reconnu le peptide présenté par ces CD40-B ou EBV-B allogéniques.

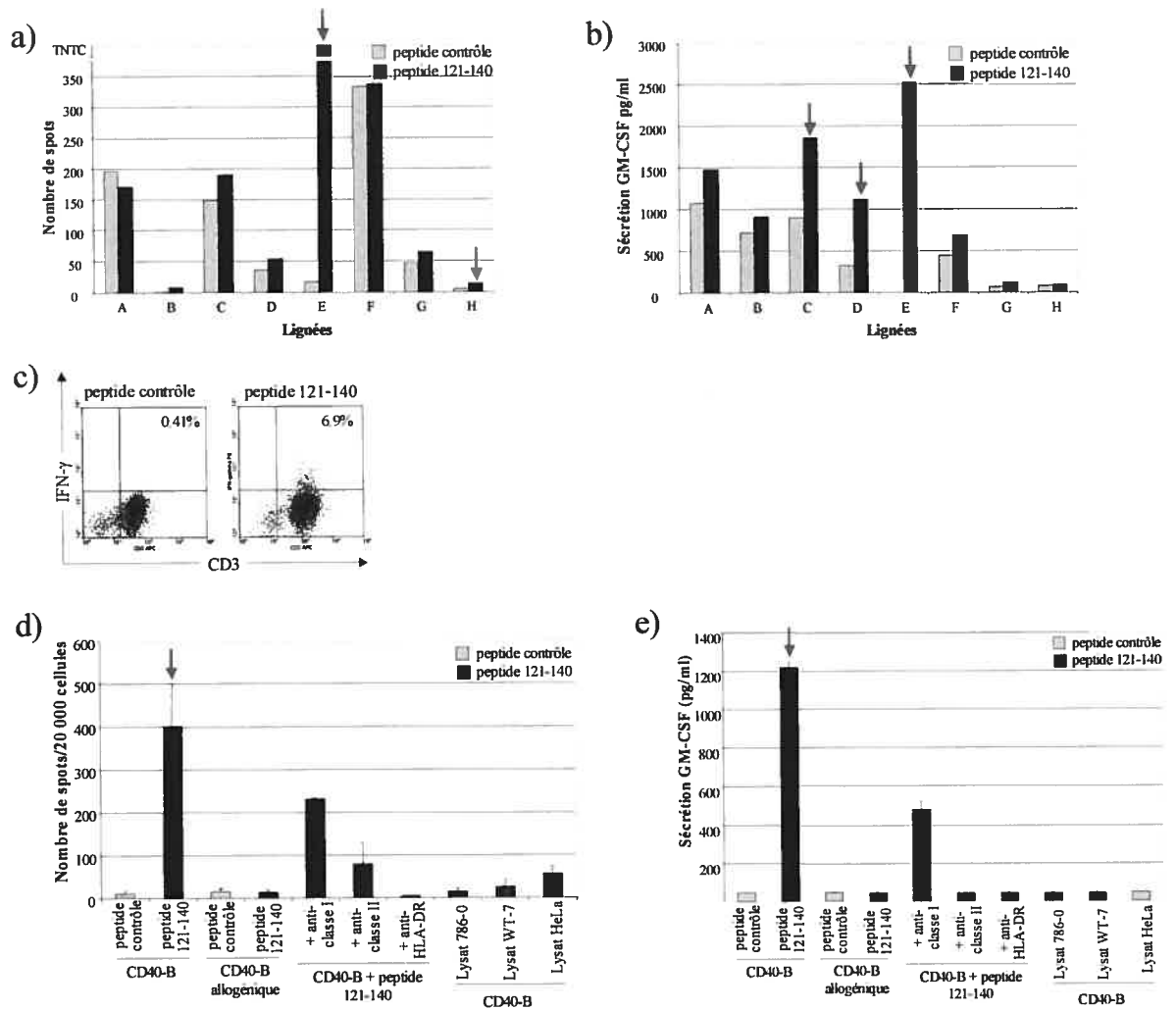


Figure 20: Caractérisation de lymphocytes T spécifiques pour le peptide 121-140 du TGF- $\alpha$ .

Sécrétion a) d'IFN- $\gamma$  en ELISPOT et b) de GM-CSF en ELISA, par les huit lignées (A-H) stimulées avec le peptide 121-140 du TGF- $\alpha$ . Les flèches rouges indiquent les lignées positives.

c) Dot plot CD3/IFN- $\gamma$ . À gauche: la lignée 121-140E est stimulée avec le peptide contrôle et seulement 0,41% des cellules CD3<sup>+</sup> sécrètent de l'IFN- $\gamma$ . À droite : la lignée 121-140E est stimulée avec le peptide 121-140 et 6,9% des cellules CD3<sup>+</sup> sécrètent de l'IFN- $\gamma$ . Ces cellules sont alors passées sur une colonne magnétique afin d'enrichir celles qui sécrètent de l'IFN- $\gamma$ , donc les cellules spécifiques.

Sécrétion d) d'IFN- $\gamma$  en ELISPOT et e) de GM-CSF en ELISA par la lignée 121-140E enrichie.



Nous avons ensuite fait un clonage par dilution limite, afin d'isoler un clone de lymphocytes T spécifique pour le peptide 121-140 du TGF- $\alpha$ . À partir des 76 clones obtenus, 72 clones (94.5%) étaient spécifiques pour le peptide 121-140 du TGF- $\alpha$  (figure 21a). Afin de déterminer par quel allèle le peptide 121-140 est présenté, nous avons cloné les gènes HLA-DR $\beta$ 1\*0402 ou HLA-DR $\beta$ 1\*1305 dans le vecteur d'expression pcDNA3.1. Les vecteurs pcDNA3.1/HLA-DR $\beta$ 1\*0402, pcDNA3.1/HLA-DR $\beta$ 1\*1305 ou pcDNA3.1/GFP ont été transfectés ou nucléofectés dans des CD40-B allogéniques ou des cellules HEK-293T exprimant HLA-DR $\beta$ 1\*0401 ou HLA-DR $\beta$ 1\*0101, donc qui expriment toutes les protéines nécessaires à la présentation de peptides par les molécules du CMH de classe II. Les cellules ont été soit chargées avec le peptide 121-140, ou soit co-transfectées avec le plasmide pcDNA3.1/TGF- $\alpha$ , afin de démontrer que le peptide peut être généré de façon naturelle à partir de la protéine (figure 21b). À l'heure actuelle, on ignore encore si les CMH de classe II sont capables de présenter le TGF- $\alpha$  endogène. Cependant, nous avons quand même tenté l'expérience. Les résultats obtenus ne nous ont pas permis de déterminer l'allèle qui présente le peptide 121-140, mais nous avons quand même isolé un clone de lymphocytes T spécifique pour le peptide 121-140 du TGF- $\alpha$  présenté par les molécules du CMH de classe II HLA-DR. De plus, afin de démontrer que notre clone de lymphocytes T reconnaît le peptide 121-140 du TGF- $\alpha$  et non une contamination quelconque, nous avons fait resynthétiser le peptide par une autre compagnie. La figure 21c démontre que le clone reconnaît le nouveau peptide 121-140 et que cette reconnaissance est dépendante de la concentration du peptide. Ces résultats seront davantage discutés dans la section discussion.

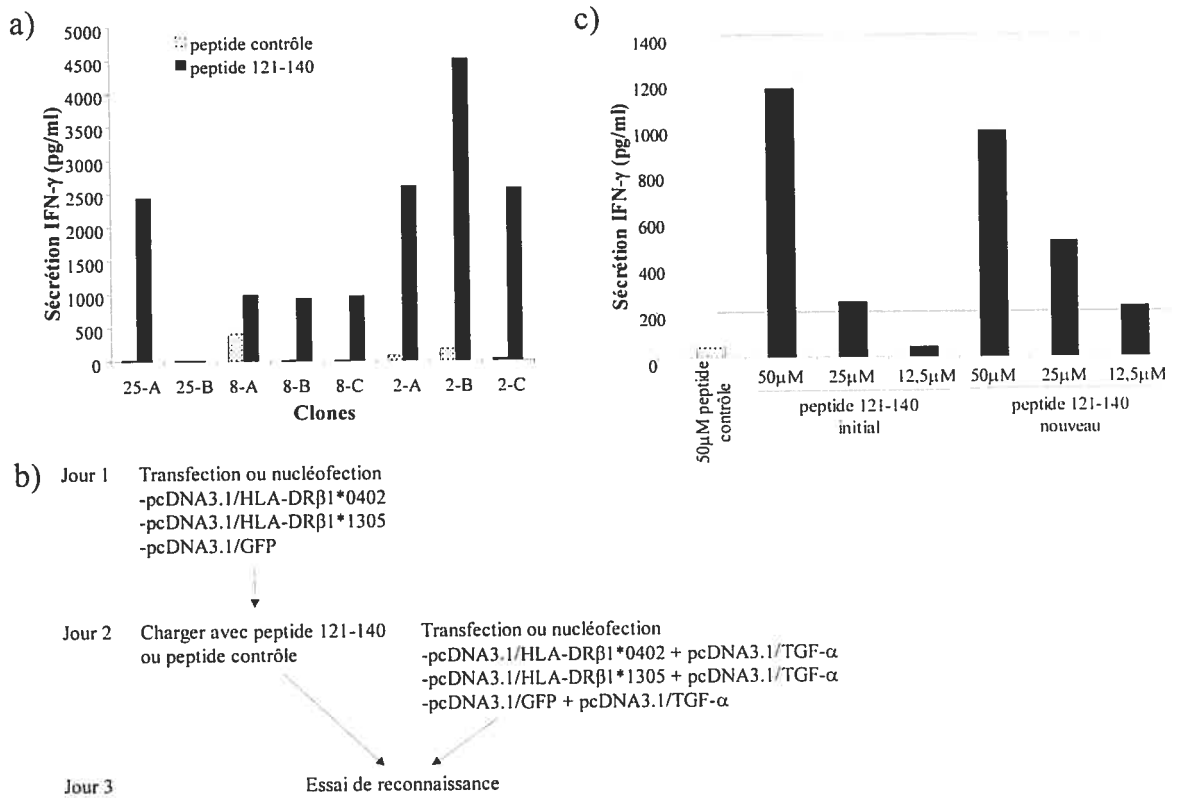


Figure 21 : Isolement d'un clone spécifique pour le peptide 121-140 du TGF-α

- a) Sécrétion d'IFN-γ par ELISA de 8 des 76 clones obtenus suite au clonage par dilution limite de la lignée de lymphocytes T 121-140E. Des huit clones montrés, seul le clone 25B n'est pas positif. Il est à noter que le nombre de lymphocytes T utilisé pour l'essai de reconnaissance n'est pas connu, donc la sécrétion d'IFN-γ ne peut pas être comparée entre les différents clones. Sur l'axe des abscisses, les clones nommés 25, 8 ou 2 signifie qu'ils proviennent d'un puits qui avait initialement 25, 8 ou 2 cellules de la lignée.
- b) Plan expérimental pour déterminer l'allèle qui présente le peptide 121-140.
- c) Sécrétion d'IFN-γ par ELISA du clone 121-140 qui reconnaît le peptide synthétisé par une deuxième compagnie.

En conclusion, j'ai établi plusieurs lignées et même un clone de lymphocytes T spécifiques pour certains peptides du TGF- $\alpha$  présentés à la surface des CPA par l'intermédiaire des molécules du CMH. Certaines de ces lignées ont été établies à partir des PBMC de patients atteints de RCC, alors que d'autres ont été établies à partir des TIIC infiltrant les RCC. Nous avons démontré que le TGF- $\alpha$  est une protéine immunogénique, donc qu'il est un AT valide pour les RCC.

## CHAPITRE 4: DISCUSSION

### 4.1 Sommaire des résultats

Les patients atteints de carcinomes du rein (RCC) ont accès à un nombre limité de traitements et il n'existe présentement aucun traitement efficace pour traiter les cas métastatiques. Beaucoup d'efforts ont été déployés pour développer de nouvelles immunothérapies qui consistent à stimuler le système immunitaire à cibler et éliminer les cellules tumorales. Cependant, très peu de patients ont eu une réponse complète objective et ceci est peut-être dû à des effets immunosuppresseurs médiés par les tumeurs.

Lors de mon projet de maîtrise, je me suis donc intéressée à l'identification des différentes populations de TIIC qui infiltrent les RCC, ainsi qu'à la caractérisation du phénotype et du stade d'activation des lymphocytes T parmi les TIIC. Nous avons démontré que les RCC sont infiltrés par des lymphocytes T et que le ratio  $CD3^+CD4^+CD8^- / CD3^+CD4^-CD8^+$  est plus faible parmi les TIIC que parmi les PBMC. Nous avons également démontré qu'un plus grand nombre de lymphocytes T parmi les TIIC ont un phénotype mémoire et expriment certains marqueurs d'activation. Finalement, en plus des lymphocytes T  $CD3^+CD4^+CD8^-$  et  $CD3^+CD4^-CD8^+$ , les RCC sont infiltrés par une population de lymphocytes T  $CD4^+CD8^+$ , une population de cellules  $CD3^+CD4^-CD8^-$ , ainsi que deux populations distinctes de cellules NK.

De plus, parmi les différentes immunothérapies utilisées pour traiter les RCC, très peu d'essais cliniques à base d'AT spécifiques pour les RCC ont été effectués. Étant donné que le TGF- $\alpha$  est sur-exprimé dans les VHL<sup>-/-</sup>RCC et qu'il est absent ou faiblement exprimé dans les tissus normaux vitaux de l'organisme, le deuxième volet de mon projet de maîtrise a été de démontrer que le TGF- $\alpha$  est un AT valide pour les VHL<sup>-/-</sup>RCC. Nous avons donc confirmé que le TGF- $\alpha$  est sur-exprimé dans un grand nombre de RCC en comparaison avec le tissu sain du rein autologue. Nous avons également confirmé l'absence ou la faible expression du TGF- $\alpha$  dans plusieurs tissus normaux importants de l'organisme. Finalement, nous avons démontré que le TGF- $\alpha$  semble être une protéine immunogénique, c'est-à-dire qu'il est capable d'être reconnu par des lymphocytes T spécifiques *in vitro*.

Nous avons même potentiellement identifié un épitope du TGF- $\alpha$  pouvant être présenté par les molécules du CMH de classe II et être reconnu par un clone de lymphocytes T périphériques CD4<sup>+</sup>.

## 4.2 Étude des populations de cellules immunitaires qui infiltrent les RCC

### 4.2.1 Phénotype des lymphocytes T

Nous avons d'abord observé que le ratio CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>/CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> est plus faible parmi les TIIC que les PBMC, ce qui suggère que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ont préférentiellement migré au site de la tumeur ou proliféré *in situ* après leur migration dans la tumeur. En effet, dans les RCC, il a déjà été démontré qu'il semble y avoir une expansion clonale de lymphocytes T qui pourraient être spécifiques à la tumeur et ainsi participer à la réponse immunitaire anti-tumorale<sup>96,97</sup>.

Le pourcentage de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> est plus élevé parmi les PBMC que les TIIC, alors que le pourcentage de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> est plus élevé parmi les TIIC que les PBMC. Ceci suggère qu'un plus grand nombre de TIIC ont un phénotype mémoire. En ce qui concerne d'autres marqueurs de phénotype naïf, soit le CD62L et le CCR7, ils sont exprimés en moyenne chez moins de 25% des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> parmi les TIIC. Parmi les PBMC, chez 7/8 patients étudiés, plus de 30% des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> expriment le CCR7 et/ou CD62L, alors que moins de 30% des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> expriment ces deux marqueurs (voir figure 10; p = 0,004). Ces résultats démontrent qu'un plus grand nombre de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> parmi les PBMC de patients atteints de RCC ont un phénotype mémoire comparativement aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de ces mêmes patients et comparativement aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> de donneurs normaux (% CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> = 46%<sup>250</sup> et 60%<sup>251</sup>).

Finalement, nous avons étudié l'expression de deux marqueurs d'activation, soit le HLA-DR et le CD25, qui apparaissent à la surface des lymphocytes T à différents stades d'activation. Chez les patients de notre étude atteints de RCC, le pourcentage de lymphocytes T CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> est remarquablement élevé parmi les TIIC

comparativement aux PBMC, alors que les pourcentages de lymphocytes T  $CD4^+CD25^+$  et  $CD8^+CD25^+$  sont faibles parmi les TIIC. Ces observations sont en accord avec une autre étude portant sur les TIIC des RCC<sup>99</sup>. Étant donné que l'expression du HLA-DR survient plus tard que celle du CD25 et persiste plus longtemps à la surface des lymphocytes T<sup>252,253</sup>, les résultats que nous avons obtenus laissent croire que les lymphocytes T parmi les TIIC sont à un stade d'activation tardif. Une autre explication possible est que l'activation chronique des lymphocytes T dans un environnement déficient en IL-2 entraîne une baisse de l'expression du CD25, mais n'affecte pas l'expression du HLA-DR<sup>254</sup>. Une autre explication pour la forte expression du HLA-DR et la faible expression du CD25 parmi les TIIC des RCC, est que l'expression du CD25 peut être inhibée par l'IL-10<sup>255,256</sup>. Il a déjà été démontré que l'IL-10 n'est pas sécrétée par les cellules tumorales de RCC, mais qu'elle est détectée dans l'environnement tumoral, ce qui suppose qu'elle pourrait être sécrétée par les cellules stromales ou immunitaires<sup>99,257,258</sup>. Par conséquent, la présence de l'IL-10 dans l'environnement tumoral pourrait jouer un rôle dans la faible expression du CD25 et ainsi supprimer la fonction des lymphocytes T parmi les TIIC.

Nous avons également observé des cellules  $CD4^+CD25^{high}$  et à un plus faible pourcentage des cellules  $CD8^+CD25^{high}$  parmi les TIIC et les PBMC. Les cellules  $CD4^+CD25^{high}$  sont probablement des  $T_{reg}$ , mais l'expression du facteur de transcription Foxp3 confirmerait l'infiltration de ce type de cellules dans la tumeur<sup>259-261</sup>.

#### 4.2.2 Caractérisation des autres populations cellulaires $CD3^+$

Les tumeurs RCC incluses dans notre étude sont caractérisées par une infiltration de lymphocytes T  $CD4^+CD8^+$ . Des lymphocytes T immatures  $CD4^+CD8^+$  sont normalement retrouvés dans le thymus, mais des lymphocytes T matures  $CD4^+CD8^+$  peuvent être également retrouvés en faible pourcentage dans le sang périphérique de donneurs normaux<sup>262</sup>. En général, ces lymphocytes T matures  $CD4^+CD8^+$  extra-thymiques ne possèdent pas de marqueurs thymiques et leur fréquence est augmentée dans le sang et dans certains organes cibles de patients souffrant de maladies auto-immunes<sup>262</sup>. Le rôle précis des lymphocytes T matures  $CD4^+CD8^+$  n'est pas bien défini, mais les deux co-récepteurs CD4 et CD8 semblent participer dans les fonctions de ces lymphocytes. En général,

seulement 0,1% des donneurs normaux possèdent > 6 % de cellules CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> parmi leur PBMC<sup>263</sup>, alors que parmi les 9 RCC étudiés, 4 d'entre eux sont infiltrés par > 6 % de cellules CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Ceci suppose que les cellules CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ont une infiltration préférentielle ou une expansion *in situ* au niveau de la tumeur et elles jouent potentiellement un rôle au niveau de la réponse immunitaire anti-tumorale.

De plus, une population de cellules CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> a été identifiée parmi les TIIC infiltrant les 9 RCC étudiés. Cette population pourrait être des cellules NKT qui expriment le CD3 et d'autres marqueurs spécifiques aux cellules NK. Les NKT ont un répertoire du TCR extrêmement restreint, composé d'une chaîne invariante V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q préférentiellement assemblée avec une chaîne V $\beta$ 11<sup>264,265</sup>. Les cellules CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> identifiées parmi les TIIC pourraient également être des lymphocytes T dont le TCR est composé des chaînes  $\gamma\delta$ . En effet, parmi les TIIC des patients #34, #35 et #38, nous avons observé 0,7%, 1,7% et 1,1% de lymphocytes T CD3<sup>+</sup>TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, respectivement (résultats non présentés). En général, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  ne représentent qu'un faible pourcentage des lymphocytes T parmi les PBMC, mais leur présence a été démontrée parmi les TIIC infiltrant les RCC<sup>99,266</sup>. Les cellules CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> observées parmi les TIIC pourraient donc être impliquées dans l'élimination des cellules tumorales.

#### 4.2.3 Caractérisation des autres leucocytes

Tels que démontré par d'autres études, les RCC sont caractérisés par une infiltration de cellules NK CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> et CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup><sup>98,104,105</sup> comparativement à d'autres types de cancers<sup>100</sup>. Dans les PBMC de donneurs normaux, il y a en moyenne neuf fois plus de cellules CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> que de cellules CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup><sup>267,268</sup>. Cependant, dans notre étude, le ratio CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup> est de 28,6 parmi les PBMC de patients atteints de RCC, ce qui est en désaccord avec d'autres études qui ont démontré que ce ratio est semblable chez des patients atteints de RCC et des donneurs normaux<sup>105,269</sup>. De plus, le ratio CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup> est de 2,7 parmi les TIIC infiltrant les RCC inclus dans notre étude et le pourcentage de NK CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup> est plus élevé dans les TIIC que les PBMC pour les 6 patients étudiés, ce qui démontre qu'il y a une infiltration préférentielle ou une prolifération *in situ*

des NK CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup> dans l'environnement des RCC. Les cellules NK CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup> peuvent sécréter diverses cytokines immuno-modulatrices comme l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ . Ces cytokines sont importantes pour la maturation des cellules dendritiques et l'induction subséquente de la réponse immunitaire à médiation cellulaire<sup>270</sup>. Cette sous-population de cellules NK est donc potentiellement importante pour l'obtention d'une réponse anti-tumorale à médiation cellulaire.

#### 4.2.4 Signification de l'infiltration des TIIC dans les RCC

Nous avons démontré que les RCC sont infiltrés par diverses populations de cellules immunitaires, dont des lymphocytes T mémoires et activés. Alors pourquoi ces cellules immunitaires ne sont-elles pas capables d'éliminer les tumeurs? Les différences significatives que nous avons démontrées entre le profil des TIIC et des PBMC suggèrent que les TIIC ont infiltré les tumeurs parce qu'elles ont reçu des signaux chimiotactiques de la part des cellules tumorales. Ceci laisse croire que les TIIC sont présentes au site de la tumeur dans le but d'accomplir leur tâche, soit l'élimination des cellules anormales ou étrangères.

Une des hypothèse qui expliquerait la croissance des tumeurs malgré la présence des TIIC, serait que les TIIC seraient fonctionnelles, mais pas suffisamment nombreuses pour contrôler la croissance rapide des tumeurs. En effet, les TIIC pourraient éliminer un certain nombre de cellules tumorales et réussissent à ralentir la progression tumorale et la formation de métastases, mais pas suffisamment pour éliminer les tumeurs entières.

Une autre possibilité serait que les tumeurs disposeraient de mécanismes pour échapper aux TIIC. En effet, plusieurs mécanismes permettant aux tumeurs d'échapper à l'action du système immunitaire ont été identifiés. Parmi ces mécanismes, il y a la diminution de l'expression des molécules du CMH de classe I et II<sup>53</sup>, la sélection naturelle des cellules tumorales réfractaires au système immunitaire<sup>271</sup>, la sécrétion de facteurs inhibiteurs tels que le TGF- $\beta$  et IL-10, par les tumeurs ou les cellules NKT<sup>56</sup>, ainsi que l'absence de signaux de co-activation sur les CPA entraînant l'anergie des lymphocytes T<sup>56</sup>.



Il est donc possible qu'un ou plusieurs de ces mécanismes favorisent la croissance des RCC plutôt que leur élimination par les TIIC.

### 4.3 Profil d'expression du TGF- $\alpha$

Parmi les AT des RCC identifiés jusqu'à présent, plusieurs ne sont exprimés que dans un faible pourcentage de RCC, alors que d'autres sont également exprimés dans certains tissus normaux, d'où l'importance d'identifier de meilleurs AT. Au cours de mon projet de maîtrise, nous avons démontré que le TGF- $\alpha$  est sur-exprimé de façon significative dans le cancer du rein par rapport au tissu sain du rein autologue. En effet, 14/23 (61%) tumeurs expriment au moins trois fois plus de TGF- $\alpha$  que le tissu normal autologue et parmi les 9 tumeurs qui ne sur-expriment pas le TGF- $\alpha$ , 5 ne sont pas de type CCRCC. Nous avons démontré que le TGF- $\alpha$  est plus fortement exprimé dans les tumeurs de type CCRCC comparativement aux autres types de RCC. De plus, le TGF- $\alpha$  est sur-exprimé dans 13/17 (77%) CCRCC comparativement au tissu sain du rein autologue. De plus, le TGF- $\alpha$  est sur-exprimé de 3 à 215 fois plus (moyenne = 21) dans les CCRCC que dans les tissus sains du rein autologue. Les 4 CCRCC qui ne sur-expriment pas le TGF- $\alpha$  peuvent s'être développés suite à des mutations somatiques survenues dans d'autres gènes que le VHL. Les résultats que nous avons obtenus sont en accord avec d'autres études qui ont démontré la sur-expression du TGF- $\alpha$  dans les RCC<sup>162-165,195</sup>, mais nous avons démontré pour la première fois une différence significative entre les CCRCC et les autres types de tumeurs. De plus, aucune corrélation n'a pu être établie entre l'expression du TGF- $\alpha$  et la taille ou le stade des tumeurs dans notre étude, ce qui est en accord avec d'autres études<sup>162,164,165,195</sup>, mais en désaccord avec une étude publiée par Petrides *et al.*<sup>163</sup>. De plus, il a été démontré que le HIF-2 $\alpha$ , le facteur de transcription du TGF- $\alpha$  dans les VHL<sup>-</sup>RCC, est exprimé dans des îlots multicellulaires pré-malins au niveau du néphron suite à la perte de fonction du pVHL<sup>156,158</sup>, donc il serait possible que le TGF- $\alpha$  soit également exprimé à ce stade pré-malin et qu'il persiste tout au long du développement des VHL<sup>-</sup>RCC.

À partir de 20 échantillons, nous avons démontré que le TGF- $\alpha$  est absent ou faiblement exprimé dans les tissus normaux vitaux. L'organe exprimant le plus haut niveau du TGF- $\alpha$  est le rein et son expression est environ 22 fois plus faible que celle de la lignée A498 (VHL<sup>-/-</sup>RCC). Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui ont démontré que le TGF- $\alpha$  est exprimé de façon faible ou modeste dans certains tissus normaux, tels que le cerveau<sup>185</sup>, les poumons<sup>186</sup>, les kératinocytes<sup>188-191</sup>, les macrophages activés<sup>193</sup>, le système digestif<sup>187</sup> et les reins<sup>162-165,192</sup>.

#### 4.4 Immunogénicité du TGF- $\alpha$

Nous avons démontré que le TGF- $\alpha$  est sur-exprimé dans les CCRCC et qu'il est absent ou faiblement exprimé dans les tissus normaux vitaux de l'organisme. Par contre, afin de valider que le TGF- $\alpha$  est un AT pour les CCRCC, il est primordial de démontrer son immunogénicité. À l'aide de stimulations *in vitro* avec des peptides dérivés du TGF- $\alpha$ , nous avons d'abord identifié des lymphocytes T parmi les TIIC spécifiques pour certains peptides du TGF- $\alpha$ , dont une lignée de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> capable de reconnaître le peptide 101-120 présenté par les molécules du CMH de classe II HLA-DR. Nous avons également identifié chez le tiers des patients étudiés, des lymphocytes T, parmi les TIIC, spécifiques pour certains peptides ou la protéine mature du TGF- $\alpha$ , suite à leur expansion non spécifique selon le protocole de REP. Plusieurs études ont identifié des lymphocytes T spécifiques pour divers AT parmi les TIIC infiltrant les tumeurs et plus particulièrement les mélanomes<sup>272</sup>. Pour ce qui est des RCC, des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques pour des cellules RCC ont été identifiés parmi les TIIC de certains patients<sup>247-249</sup>. Ici, nous avons identifié des lymphocytes T spécifiques pour un AT particulier, soit le TGF- $\alpha$ .

À l'aide de stimulations *in vitro* avec des peptides dérivés du TGF- $\alpha$ , nous avons également identifié des lymphocytes T périphériques spécifiques pour certains peptides ou la protéine mature du TGF- $\alpha$ . Nous avons même réussi à isoler un clone de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifique pour le peptide 121-140 du TGF- $\alpha$  présenté par les molécules du CMH de classe II HLA-DR $\beta$ 1\*0402 ou HLA-DR $\beta$ 1\*1305. En clonant ces deux HLA-DR dans des vecteurs d'expression, nous n'avons pas réussi à déterminer quel allèle présente le peptide

121-140 du TGF- $\alpha$  et plusieurs facteurs peuvent expliquer pourquoi. D'abord, il n'a pas été possible de confirmer la production des protéines HLA-DR $\beta$ 1\*0402 et HLA-DR $\beta$ 1\*1305 dans les cellules HEK-293T et CD40-B par immuno-bavardage de type Western ou cytométrie de flux dû à l'absence d'anticorps spécifiques disponibles sur le marché. Étant donné que les cellules transfectées ou nucléofectées (HEK-293T transfectés de façon stable avec HLA-DR $\beta$ 1\*0401, ou HLA-DR $\beta$ 1\*0101, et CD40-B) expriment le HLA-DR endogène, un anticorps spécifique pour toutes les molécules HLA-DR n'aurait pas confirmé la production des protéines HLA-DR $\beta$ 1\*0402 et HLA-DR $\beta$ 1\*1305. De plus, étant donné que seuls 3 allèles de la chaîne  $\alpha$  du HLA-DR ont été identifiés jusqu'à présent<sup>273</sup>, seule la chaîne  $\beta$  du HLA-DR a été clonée dans le vecteur d'expression. Cependant, il est possible que la chaîne  $\beta$ 1\*0402 ou  $\beta$ 1\*1305 du HLA-DR s'associe avec une chaîne  $\alpha$  différente de celle exprimée par les CD40-B allogéniques ou HEK-293T qui ont été transfectés ou nucléofectés avec les vecteurs exprimant le HLA-DR $\beta$ 1\*0402 ou HLA-DR $\beta$ 1\*1305. Finalement, seule la chaîne  $\beta$ 1 du HLA-DR a été clonée dans le vecteur d'expression puisque ce locus est présent sur tout les haplotypes, mais il est possible que le peptide 121-140 du TGF- $\alpha$  soit présenté par la chaîne HLA-DR $\beta$ 3 ou  $\beta$ 4 qui sont des locus présents sur les haplotypes DR13 et DR4 respectivement<sup>274</sup>.

En résumé, nous avons démontré pour la première fois l'immunogénicité du TGF- $\alpha$  parmi les TIIC et les PBMC de patients atteints de RCC. Dans le futur, il serait intéressant de vérifier si la fréquence de lymphocytes T spécifiques pour le TGF- $\alpha$  est plus élevée chez les patients atteints de RCC que chez des donneurs normaux,.

## 4.5 Conclusions

En conclusion, les RCC sont infiltrés par différentes populations de cellules immunitaires qui ont des phénotypes différents de ceux des PBMC. Cela démontre que les cellules immunitaires reçoivent des signaux envoyés par les tumeurs et qu'elles sont en mesure de migrer et d'infiltrer les tumeurs. Cependant, il est possible que le système immunitaire n'est pas assez puissant pour combattre la prolifération incontrôlée des tumeurs ou encore que la tumeur utilise divers mécanismes qui inhibent les fonctions du système immunitaire.

De plus, nous avons démontré que le TGF- $\alpha$  est un AT valide pour les CCRCC. L'utilisation du TGF- $\alpha$  dans l'immunothérapie des CCRCC serait avantageux puisque la perte de fonction du pVHL et la sur-expression subséquente du TGF- $\alpha$  sont essentielles à la survie des cellules VHL<sup>-/-</sup>RCC<sup>166</sup>. La résistance à une immunothérapie dirigée contre le TGF- $\alpha$  causée par la perte ou la diminution de son expression, est donc moins probable. De plus, l'expression du TGF- $\alpha$  ne corrèle pas avec le stade ou la taille des tumeurs, ce qui en fait un AT qui touche un grand nombre de patients.

## 4.6 Perspectives et potentiel d'exploitation

### 4.6.1 Effets immunosuppresseurs médiés par les tumeurs

Une meilleure caractérisation des TIIC qui infiltrent les RCC permet de mieux comprendre les interactions entre les tumeurs et le système immunitaire. Nous avons démontré que les RCC sont infiltrés par diverses cellules immunes, dont des lymphocytes T activés et mémoires, ainsi que des cellules NK. Avec un plus grand nombre d'échantillons de RCC, il serait possible d'établir des corrélations potentielles entre la composition et le phénotype des TIIC et la taille, le grade et le stade des RCC. De plus, il serait très intéressant d'étudier les mécanismes développés par les tumeurs qui leur permettent d'échapper au système immunitaire, tels que la diminution de l'expression des CMH de classe I et II, la sécrétion de cytokines qui inhibent les fonctions des lymphocytes T et

l'absence de signaux co-activateurs par les CPA. Ces études nous permettraient de développer des immunothérapies appropriées pour traiter les RCC.

#### 4.6.2 Immunothérapie

La grande majorité des immunothérapies utilisées à ce jour pour traiter les RCC stimulent le système immunitaire de façon non spécifique, tel que l'IL-2<sup>62,63</sup> et l'IFN- $\alpha$ <sup>67-69</sup>, ou stimulent le système immunitaire à reconnaître un AT inconnu, tel que les cellules dendritiques chargées avec du lysat tumoral<sup>84</sup>. Cependant, la découverte de plusieurs AT exprimés par les tumeurs humaines a favorisé le développement d'immunothérapies qui stimulent le système immunitaire à reconnaître des AT spécifiques<sup>275</sup>. Au cours de ma maîtrise, nous avons démontré que le TGF- $\alpha$  est un AT valide pour les RCC, donc il serait possible de l'exploiter lors de l'immunothérapie des RCC.

Dans le passé, des efforts ont été déployés pour développer des vaccins anti-cancéreux curatifs, basés sur des immunisations actives. Ces approches thérapeutiques sont capables de générer des lymphocytes T spécifiques pour des AT, mais la régression des tumeurs croissantes chez les patients traités avec les vaccins anti-cancéreux est sporadique et rare<sup>276</sup>. Un article paru en 2004 a fait l'analyse de 1306 vaccins anti-cancéreux administrés à 765 patients, dont près de la moitié qui ont été administrés au « Surgery Branch du NCI » entre 1995 et 2004<sup>277</sup>. Cet article a conclu que le taux de réponses cliniques objectives, c'est-à-dire une diminution de >50% de la taille des tumeurs, est de seulement 3.3%. Ce faible taux de réponses cliniques objectives ne signifie pas qu'il faut abandonner l'immunothérapie anti-tumorale, mais plutôt qu'il faut utiliser des approches alternatives.

Au cours des dernières années, une approche alternative d'immunothérapie anti-tumorale a été développée pour traiter les patients atteints du mélanome. Ce traitement consiste à isoler les TIL des patients, de les stimuler *in vitro* afin de générer des lymphocytes T spécifiques pour des AT, puis de les administrer aux patients qui ont subi une lympho-déplétion. Une étude parue en 2004 a rapporté que 18/35 patients atteints d'un mélanome métastatique ont eu une réponse clinique objective suite au transfert adoptif,

dont 4 patients qui ont eu une réponse complète<sup>272</sup>. Ces résultats encourageant laissent espérer qu'il serait possible d'appliquer ce traitement à d'autres types de cancer, comme par exemple le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques pour le TGF- $\alpha$  à des patients atteints de CCRCC. L'identification de nouveaux épitopes du TGF- $\alpha$ , notamment des épitopes de classe I reconnus par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, permettrait d'appliquer cette nouvelle approche d'immunothérapie anti-tumorale dans le traitement des CCRCC.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer pourquoi le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques a un taux de succès plus élevé que plusieurs vaccins anti-cancéreux et pourquoi il a tant de potentiel. Premièrement, les lymphocytes T spécifiques pour des AT générés *in vitro* peuvent être obtenus en grand nombre (plus de  $1 \times 10^{11}$ ) et peuvent être sélectionnés *in vitro* pour leur reconnaissance de grande avidité pour des AT<sup>278</sup>. De plus, les lymphocytes T spécifiques administrés ont la capacité de survivre et de proliférer chez les patients pendant plusieurs mois après le transfert adoptif<sup>279</sup>. Deuxièmement, les lymphocytes T spécifiques peuvent être activés *ex vivo* et ensuite administrés aux patients, de façon à ce que ces lymphocytes possèdent déjà les capacités pour sécréter des cytokines immunorégulatrices ou pour lyser les cellules tumorales. Finalement, les patients subissent une lympho-déplétion avant le transfert adoptif, afin d'éliminer les Treg et les lymphocytes T qui entre en compétition avec les cellules transférées pour des cytokines homéostatiques telles que l'IL-7 et l'IL-15<sup>280,281</sup>. Il y a eu une étude qui a envisagé le transfert adoptif de PBMC activées *ex vivo*, mais aucune réponse clinique objective n'a été observée chez les 9 patients traités<sup>282</sup>.

D'autres approches alternatives pourraient également contribuer à augmenter l'efficacité de l'immunothérapie anti-tumorale, basé sur le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques au TGF- $\alpha$ . D'abord, la majorité des vaccins anti-tumoraux développés à date se sont concentrés sur la stimulation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> CTL. Cependant, plusieurs études ont démontré que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> jouent un rôle important dans la réponse immunitaire anti-tumorale<sup>283-285</sup>. En effet, la sous-population T<sub>H</sub>1 des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est essentielle à la persistance, mais pas l'induction, des CTL<sup>286-288</sup>. Ceci est d'autant plus important dans les cas de maladies chroniques comme le cancer où une réponse immunitaire faible mais soutenue serait peut-être plus bénéfique qu'une réponse forte mais

de courte durée. De plus, la sécrétion de cytokines, comme l'IFN- $\gamma$ , par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> entraîne une augmentation de l'expression des CMH de classe I par les cellules tumorales, les rendant plus sensibles à la lyse médiée par les CTL. L'IFN- $\gamma$  sécrété par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> a également la capacité de stimuler la réponse immunitaire innée et d'inhiber l'angiogénèse locale. Par conséquent, les traitements futurs devraient viser à stimuler à la fois les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> spécifiques pour le TGF- $\alpha$ . Finalement, inhiber les mécanismes de tolérance périphérique pourrait augmenter l'efficacité des immunothérapies anti-tumorales. Cette approche consiste à éliminer les Treg, à inhiber la fonction de certaines molécules co-stimulatrices, telles que le « *cytotoxic T lymphocyte antigen 4* » (CTLA-4)<sup>289-291</sup> et le « *programmed cell death 1* » (PD1)<sup>292</sup> qui envoient des signaux négatifs aux lymphocytes T, ou à interférer avec l'action de certaines molécules immunosuppressives produites par les cellules tumorales, telles que le TGF- $\beta$ .

Au cours de mon projet de maîtrise, nous avons démontré que le TGF- $\alpha$  est un AT valide pour les CCRCC. L'identification de nouveaux épitopes du TGF- $\alpha$ , notamment des épitopes de classe I reconnus par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, permettrait d'appliquer les nouvelles approches d'immunothérapie anti-tumorale dans le traitement des CCRCC.

## **CHAPITRE 7: BIBLIOGRAPHIE**

1. **Société Canadienne du Cancer, Institut National du Cancer du Canada, Statistique Canada, Régistres du Cancer des Provinces et des Territoires, and Agence de Santé Publique du Canada** (2006). Statistiques canadiennes sur le cancer 2006 [www.cancer.ca](http://www.cancer.ca)
2. **Landis,S.H., Murray,T., Bolden,S., and Wingo,P.A.** (1999). Cancer statistics, 1999. *Ca-A Cancer Journal for Clinicians* 49, 8-31.
3. **Schrader,A.J., Varga,Z., Hegele,A., Pfoertner,S., Olbert,P., and Hofmann,R.** (2006). Second-line strategies for metastatic renal cell carcinoma: classics and novel approaches. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 132, 137-149.
4. **Yagoda,A., Abirached,B., and Petrylak,D.** (1995). Chemotherapy for Advanced Renal-Cell Carcinoma - 1983-1993. *Seminars in Oncology* 22, 42-60.
5. **Gleave,M.E., Elhilali,M., Fradet,Y., Davis,I., Venner,P., Saad,F., Klotz,L.H., Moore,M.J., Paton,V., and Bajamonde,A.** (1998). Interferon gamma-1b compared with placebo in metastatic renal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine* 338, 1265-1271.
6. **Snow,R.M. and Schellhammer,P.F.** (1982). Spontaneous Regression of Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *Urology* 20, 177-181.
7. **Flanigan,R.C., Salmon,S.E., Blumenstein,B.A., Bearman,S.I., Roy,V., McGrath,P.C., Caton,J.R., Munshi,N., and Crawford,E.D.** (2001). Nephrectomy followed by interferon alfa-2b compared with interferon alfa-2b alone for metastatic renal-cell cancer. *New England Journal of Medicine* 345, 1655-1659.
8. **Mickisch,G.H.J., Garin,A., van Poppel,H., de Prijck,L., and Sylvester,R.** (2001). Radical nephrectomy plus interferon-alfa-based immunotherapy compared with interferon alfa alone in metastatic renal-cell carcinoma: a randomised trial. *Lancet* 358, 966-970.
9. **Benjamini,E. and Sunshine,G.H.** (1996). *Immunology: a short course*. New York, Wiley-Liss
10. **Goldsby,R.A., Kindt,T.J., and Osborne,B.A.** (2001). *Immunologie Le cours de Janis Kuby*
11. **Rosenberg,S.A.** (1995). The Development of New Cancer Therapies Based on the Molecular Identification of Cancer Regression Antigens. *The cancer journal from scientific american* 1, 90-100.
12. **Janeway,C.A., Travers,P., Walport,M., and Shlomchik,M.** (2005). *Immunobiology*
13. **Lanier,L.L.** (2005). NK cell recognition. *Annual Review of Immunology* 23, 225-274.
14. **Lohmann,T., Leslie,R.D.G., and Londei,M.** (1996). T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes. *Journal of Autoimmunity* 9, 385-389.
15. **Semana,G., Gausling,R., Jackson,R.A., and Hafler,D.A.** (1999). T cell autoreactivity to proinsulin epitopes in diabetic patients and healthy subjects. *Journal of Autoimmunity* 12, 259-267.
16. **Bouneaud,C., Kourilsky,P., and Bousso,P.** (2000). Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: A large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* 13, 829-840.



17. **Derbinski,J., Schulte,A., Kyewski,B., and Klein,L.** (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nature Immunology*. 2, 1032-1039.
18. **Wucherpfennig,K.W. and Strominger,J.L.** (1995). Molecular Mimicry in T-Cell-Mediated Autoimmunity - Viral Peptides Activate Human T-Cell Clones Specific for Myelin Basic-Protein. *Cell* 80, 695-705.
19. **Kersh,G.J. and Allen,P.M.** (1996). Structural basis for T cell recognition of altered peptide ligands: A single T cell receptor can productively recognize a large continuum of related ligands. *The Journal of experimental medicine* 184, 1259-1268.
20. **Mason,D.** (1998). A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunology Today* 19, 395-404.
21. **Sakaguchi,S., Ono,M., Setoguchi,R., Yagi,H., Hori,S., Fehervari,Z., Shimizu,J., Takahashi,T., and Nomura,T.** (2006). Foxp3(+)CD25(+)CD4(+) natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological Reviews* 212, 8-27.
22. **Morgan,D.J., Kreuwel,H.T., Fleck,S., Levitsky,H.I., Pardoll,D.M., and Sherman,L.A.** (1998). Activation of low avidity CTL specific for a self epitope results in tumor rejection but not autoimmunity. *The journal of immunology* 160, 643-651.
23. **de Visser,K.E., Cordaro,T.A., Kioussis,D., Haanen,J.B.A.G., Schumacher,T.N.M., and Kruisbeek,A.M.** (2000). Tracing and characterization of the low-avidity self-specific T cell repertoire. *European journal of immunology* 30, 1458-1468.
24. **Hewitt,H.B., Blake,E.R., and Walder,E.S.** (1976). A critique of the evidence for active host defense against cancer based on personal studies of 27 murine tumors of spontaneous origin. *The British journal of cancer* 33, 241
25. **Van Pel,A. and Boon,T.** (1982). Protection against a nonimmunogenic mouse leukemia by an immunogenic variant obtained by mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 4718-4722.
26. **Romero,P., Cerottini,J.C., and Speiser,D.E.** (2004). Monitoring tumor antigen specific T-cell responses in cancer patients and phase I clinical trials of peptide-based vaccination. *Cancer immunology, immunotherapy* 53, 249-255.
27. **Gilboa,E.** (1999). The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity* 11, 263-270.
28. **Dermine,S., Gilham,D.E., Shaw,D.M., Davidson,E.J., Meziane,E.K., Armstrong,A., Hawkins,R.E., and Stern,P.L.** (2004). Vaccine and antibody-directed T cell tumour immunotherapy. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* 1704, 11-35.
29. **Yamanaka,K., Miyake,H., Hara,I., Gohji,K., Arakawa,S., and Kamidono,S.** (1998). Expression of MAGE genes in renal cell carcinoma. *International Journal of Molecular Medicine* 2, 57-60.
30. **Oehrich,N., Devitt,G., Linnebacher,M., Schwitalle,Y., Grosskinski,S., Stevanovic,S., and Zoller,M.** (2005). Generation of RAGE-1 and MAGE-9 peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte lines for transfer in patients with renal cell carcinoma. *International journal of cancer* 117, 256-264.
31. **Neumann,E., Engelsberg,A., Decker,J., Storkel,S., Jaeger,E., Huber,C., and Seliger,B.** (1998). Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and

- glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: Candidates for T-cell-based immunotherapies? *Cancer research* 58, 4090-4095.
32. **Shay,J.W. and Bacchetti,S.** (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer* 33, 787-791.
  33. **Vieweg,J. and Jackson,A.** (2004). Antigenic targets for renal cell carcinoma immunotherapy. *Expert Opinion on Biological Therapy* 4, 1791-1801.
  34. **Kosari,F., Parker,A.S., Kube,D.M., Lohse,C.M., Leibovich,B.C., Blute,M.L., Chevillie,J.C., and Vasmatzis,G.** (2005). Clear cell renal cell carcinoma: Gene expression analyses identify a potential signature for tumor aggressiveness. *Clinical Cancer Research* 11, 5128-5139.
  35. **Zelle-Rieser,C., Barsoum,A.L., Sallusto,F., Ramoner,R., Rohrer,J.W., Holtl,L., Bartsch,G., Coggin,J.H., and Thurnher,M.** (2001). Expression and immunogenicity of oncofetal antigen-immature laminin receptor in human renal cell carcinoma. *Journal of Urology* 165, 1705-1709.
  36. **Oosterwijk,E., Ruitter,D.J., Hoedemaeker,P.J., Pauwels,E.K.J., Jonas,U., Zwartendijk,J., and Warnaar,S.O.** (1986). Monoclonal-Antibody G-250 Recognizes A Determinant Present in Renal-Cell Carcinoma and Absent from Normal Kidney. *International journal of cancer*38, 489-494.
  37. **Oosterwijk,E., Debruyne,F.M.J., and Schalken,J.A.** (1995). The Use of Monoclonal-Antibody G250 in the Therapy of Renal-Cell Carcinoma. *Seminars in Oncology* 22, 34-41.
  38. **Grabmaier,K., Vissers,J.L.M., de Weijert,M.C.A., Oosterwijk-Wakka,J.C., Van Bokhoven,A., Brakenhoff,R.H., Noessner,E., Mulders,P.A., Merckx,G., Figdor,C.G., Adema,G.J., and Oosterwijk,E.** (2000). Molecular cloning and immunogenicity of renal cell carcinoma-associated antigen G250. *International journal of cancer*85, 865-870.
  39. **Span,P.N., Bussink,J., Manders,P., Beex,L.V.A.M., and Sweep,C.G.J.** (2003). Carbonic anhydrase-9 expression levels and prognosis in human breast cancer: association with treatment outcome. *The British journal of cancer* 89, 271-276.
  40. **Swinson,D.E.B., Jones,J.L., Richardson,D., Wykoff,C., Turley,H., Pastorek,J., Taub,N., Harris,A.L., and O'Byrne,K.J.** (2003). Carbonic anhydrase IX expression, a novel surrogate marker of tumor hypoxia, is associated with a poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology* 21, 473-482.
  41. **Ivanov,S., Liao,S.Y., Ivanova,A., Danilkovitch-Miagkova,A., Tarasova,N., Weirich,G., Merrill,M.J., Proescholdt,M.A., Oldfield,E.H., Lee,J., Zavada,J., Waheed,A., Sly,W., Lerman,M.I., and Stanbridge,E.J.** (2001). Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *American Journal of Pathology* 158, 905-919.
  42. **Koukourakis,M.I., Giatromanolaki,A., Sivridis,E., Simopoulos,K., Pastorek,J., Wykoff,C.C., Gatter,K.C., and Harris,A.L.** (2001). Hypoxia-regulated carbonic anhydrase-9 (CA9) relates to poor vascularization and resistance of squamous cell head and neck cancer to chemoradiotherapy. *Clinical Cancer Research* 7, 3399-3403.
  43. **Seliger,B., Rongcun,Y., Atkins,D., Hammers,S., Huber,C., Storkel,S., and Kiessling,R.** (2000). HER-2/neu is expressed in human renal cell carcinoma at heterogeneous levels independently of tumor grading and staging and can be recognized by HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *International journal of cancer*87, 349-359.

44. **Langner,C., Ratschek,M., Rehak,P., Schips,L., and Zigeuner,R.** (2004). Expression of MUC1 (EMA) and E-cadherin in renal cell carcinoma: a systematic immunohistochemical analysis of 188 cases. *Modern Pathology* 17, 180-188.
45. **Rae,F.K., Stephenson,S.A., Nicol,D.L., and Clements,J.A.** (2000). Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display. *International journal of cancer*88, 726-732.
46. **Hedberg,Y., Davoodi,E., Roos,G., Ljungberg,B., and Landberg,G.** (1999). Cyclin-D1 expression in human renal-cell carcinoma. *International journal of cancer*84, 268-272.
47. **Zarnegar,R. and Michalopoulos,G.K.** (1995). The Many Faces of Hepatocyte Growth-Factor - from Hepatopoiesis to Hematopoiesis. *Journal of Cell Biology* 129, 1177-1180.
48. **Naldini,L., Vigna,E., Narsimhan,R.P., Gaudino,G., Zarnegar,R., Michalopoulos,G.K., and Comoglio,P.M.** (1991). Hepatocyte Growth-Factor (Hgf) Stimulates the Tyrosine Kinase-Activity of the Receptor Encoded by the Protooncogene C-Met. *Oncogene* 6, 501-504.
49. **Montesano,R., Soriano,J.V., Malinda,K.M., Ponce,M.L., Bafico,A., Kleinman,H.K., Bottaro,D.P., and Aaronson,S.A.** (1998). Differential effects of hepatocyte growth factor isoforms on epithelial and endothelial tubulogenesis. *Cell Growth & Differentiation* 9, 355-365.
50. **Schmidt,C., Blatt,F., Goedecke,S., Brinkmann,V., Zschiesche,W., Sharpe,M., Gherardi,E., and Birchmeier,C.** (1995). Scatter Factor/Hepatocyte Growth-Factor Is Essential for Liver Development. *Nature* 373, 699-702.
51. **Fischer,J., Palmedo,G., von Knobloch,R., Bugert,P., Prayer-Galetti,T., Pagano,F., and Kovacs,G.** (1998). Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours. *Oncogene* 17, 733-739.
52. **Kim,R., Emi,M., and Tanabe,K.** (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121, 1-14.
53. **Seliger,B., Cabrera,T., Garrido,F., and Ferrone,S.** (2002). HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin.Cancer Biol.* 12, 3-13.
54. **Urosevic,M. and Dummer,R.** (2003). HLA-G and IL-10 expression in human cancer--different stories with the same message. *Semin.Cancer Biol.* 13, 337-342.
55. **Beck,C., Schreiber,H., and Rowley,D.** (2001). Role of TGF-beta in immune-evasion of cancer. *Microscopy research and technique* 52, 387-395.
56. **Smyth,M.J., Godfrey,D.I., and Trapani,J.A.** (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature Immunology.* 2, 293-299.
57. **Coley WB** (1914). The treatment of malignant inoperable tumors with the mixed toxins of *Erysipelas* and *Bacillus Prodigiosus*. Brussels: Weissenbruch
58. **Rosenberg,S.A., Lotze,M., Yang,J., Aebersold,P., Linehan,W.M., Seipp,C., and White,D.** (1989). Experience with the Use of High-Dose Interleukin-2 in the Treatment of 652 Cancer Patients. *Annals of surgery* 210, 474-485.
59. **Lotze,M.T., Chang,A.E., Seipp,C.A., Simpson,C., Vetto,J.T., and Rosenberg,S.A.** (1986). High dose recombinant interleukin-2 in the treatment of patients with disseminated cancer: Responses, treatment related morbidity and histologic findings. *Journal of the American Medical Association* 256, 3117-3124.

60. **Yang, J.C., Sherry, R.M., Steinberg, S.M., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Hwu, P., Seipp, C.A., Rogers-Freezer, L., Morton, K.E., White, D.E., Liewehr, D.J., Merino, M.J., and Rosenberg, S.A.** (2003). Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer. *Journal of clinical oncology* 21, 3127-3132.
61. **McDermott, D.F., Regan, M.M., Clark, J.I., Flaherty, L.E., Weiss, G.R., Logan, T.F., Kirkwood, J.M., Gordon, M.S., Sosman, J.A., Ernstoff, M.S., Tretter, C.P.G., Urba, W.J., Smith, J.W., Margolin, K.A., Mier, J.W., Gollob, J.A., Dutcher, J.P., and Atkins, M.B.** (2005). Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal of clinical oncology* 23, 133-141.
62. **Fisher, R.I., Rosenberg, S.A., and Fyfe, G.** (2000). Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Journal from Scientific American* 6, S55-S57
63. **Dillman, R.O., Church, C., Barth, N.M., Oldham, R.K., and Wiemann, M.C.** (1997). Long-term survival after continuous infusion interleukin-2. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 12, 243-248.
64. **Isaacs A and Lindenman J** (1957). Virus interference. The interferons. *Proceedings of the Royal Society of London* 147, 258-267.
65. **Quesada, J.R., Rios, A., Swanson, D., Trown, P., and Gutterman, J.U.** (1985). Antitumor-Activity of Recombinant-Derived Interferon-Alpha in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *Journal of clinical oncology* 3, 1522-1528.
66. **Small, E.J., Weiss, G.R., Malik, U.K., Walther, P.J., Johnson, D., Wilding, G., Kuzel, T., Bejamonde, A., and Paton, V.** (1998). The treatment of metastatic renal cell carcinoma patients with recombinant human gamma interferon. *Cancer Journal* 4, 162-167.
67. **Minasian, L.M., Motzer, R.J., Gluck, L., Mazumdar, M., Vlamis, V., and Krown, S.E.** (1993). Interferon Alfa-2A in Advanced Renal-Cell Carcinoma - Treatment Results and Survival in 159 Patients with Long-Term Follow-Up. *Journal of clinical oncology* 11, 1368-1375.
68. **Steineck, G., Strander, H., Carbin, B.E., Borgstrom, E., Wallin, L., Achtnich, U., Arvidsson, A., Soderlund, V., Naslund, I., Esposti, P.L., and Norell, S.E.** (1990). Recombinant Leukocyte Interferon Alpha-2A and Medroxyprogesterone in Advanced Renal-Cell Carcinoma - A Randomized Trial. *Acta Oncologica* 29, 155-162.
69. **Kriegmair, M., Oberneder, R., and Hofstetter, A.** (1995). Interferon-Alfa and Vinblastine Versus Medroxyprogesterone Acetate in the Treatment of Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *Urology* 45, 758-762.
70. **Negrier, S., Escudier, B., Lasset, C., Douillard, J.Y., Savary, J., Chevreau, C., Ravaud, A., Mercatello, A., Peny, J., Mousseau, M., Philip, T., and Tursz, T.** (1998). Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine* 338, 1272-1278.
71. **Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Leitman, S., Chang, A.E., Ettinghausen, S.E., Matory, Y.L., Skibber, J.M., Shiloni, E., Vetto, J., Seipp, C.A., Simpson, C., and Reichert, C.M.** (1985). Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *New England Journal of Medicine* 313, 1485-1492.
72. **Weiss, G.R., Margolin, K.A., Aronson, F.R., Sznol, M., Atkins, M.B., Dutcher, J.P., Gaynor, E.R., Boldt, D.H., Doroshow, J.H., Bar, M.H., and .** (1992). A randomized phase II trial of

continuous infusion interleukin-2 or bolus injection interleukin-2 plus lymphokine-activated killer cells for advanced renal cell carcinoma. *Journal of clinical oncology* 10, 275-281.

73. **Parkinson,D.R., Fisher,R.I., Rayner,A.A., Paietta,E., Margolin,K.A., Weiss,G.R., Mier,J.W., Sznol,M., Gaynor,E.R., Bar,M.H., and .** (1990). Therapy of renal cell carcinoma with interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells: phase II experience with a hybrid bolus and continuous infusion interleukin-2 regimen. *Journal of clinical oncology* 8, 1630-1636.
74. **Rosenberg,S.A., Lotze,M.T., Yang,J.C., Topalian,S.L., Chang,A.E., Schwartzentruber,D.J., Aebersold,P., Leitman,S., Linehan,W.M., Seipp,C.A., White,D.E., and Steinberg,S.M.** (1993). Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 85, 622-632.
75. **Law,T.M., Motzer,R.J., Mazumdar,M., Sell,K.W., Walther,P.J., O'Connell,M., Khan,A., Vlamis,V., Vogelzang,N.J., and Bajorin,D.F.** (1995). Phase III randomized trial of interleukin-2 with or without lymphokine-activated killer cells in the treatment of patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer* 76, 824-832.
76. **Dillman,R.O.** (2005). Lymphocyte therapy of renal cell carcinoma. *Expert Review of Anticancer Therapy* 5, 1041-1051.
77. **Rosenberg,S.A., Spiess,P., and Lafreniere,R.** (1986). A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 233, 1318-1321.
78. **Bregni,M., Doderio,A., Peccatori,J., Pescarollo,A., Bernardi,M., Sassi,I., Voena,C., Zaniboni,A., Bordignon,C., and Corradini,P.** (2002). Nonmyeloablative conditioning followed by hematopoietic cell allografting and donor lymphocyte infusions for patients with metastatic renal and breast cancer. *Blood* 99, 4234-4236.
79. **Artz,A.S., Van,B.K., Zimmerman,T., Gajewski,T.F., Rini,B.I., Hu,H.S., Stadler,W.M., and Vogelzang,N.J.** (2005). Long-term follow-up of nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation for renal cell carcinoma: The University of Chicago Experience. *Bone Marrow Transplant.* 35, 253-260.
80. **Blaise,D., Bay,J.O., Faucher,C., Michallet,M., Boiron,J.M., Choufi,B., Cahn,J.Y., Gratecos,N., Sotto,J.J., Francois,S., Fleury,J., Mohty,M., Chabannon,C., Bilger,K., Gravis,G., Viret,F., Braud,A.C., Bardou,V.J., Maraninchi,D., and Viens,P.** (2004). Reduced-intensity preparative regimen and allogeneic stem cell transplantation for advanced solid tumors. *Blood* 103, 435-441.
81. **Galligioni,E., Quaia,M., Merlo,A., Carbone,A., Spada,A., Favaro,D., Santarosa,M., Sacco,C., Talamini,R., Francini,M., Crivellari,D., DiDonna,D., Mazza,G., Viggiano,G., Galassi,P., Panizzo,R., Carmignani,G., and Fiaccavento,G.** (1996). Adjuvant immunotherapy treatment of renal carcinoma patients with autologous tumor cells and Bacillus Calmette-Guerin - Five-year results of a prospective randomized study. *Cancer* 77, 2560-2566.
82. **Jocham,D., Richter,A., Hoffmann,L., Iwig,K., Fahlenkamp,D., Zakrzewski,G., Schmitt,E., Dannenberg,T., Lehmacher,W., von Wietersheim,J., and Doehn,C.** (2004). Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial. *Lancet* 363, 594-599.
83. **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 research* 63, 2127-2133.

84. **Holti,L., Zelle-Rieser,C., Gander,H., Papesh,C., Ramoner,R., Bartsch,G., Rogatsch,H., Barsoum,A.L., Coggin,J.H., and Thurnher,M.** (2002). Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clinical Cancer Research* 8, 3369-3376.
85. **Oosterwijk-Wakka,J.C., Tiemessen,D.M., Bleumer,I., de Vries,I.J.M., Jongmans,W., Adema,G.J., Debruyne,F.M.J., de Mulder,P.H., Oosterwijk,E., and Mulders,P.F.A.** (2002). Vaccination of patients with metastatic renal cell carcinoma with autologous dendritic cells pulsed with autologous tumor antigens in combination with interleukin-2: A phase 1 study. *Journal of Immunotherapy* 25, 500-508.
86. **Avigan,D., Vasir,B., Gong,J.L., Borges,V., Wu,Z.K., Uhl,L., Atkins,M., Mier,J., McDermott,D., Smith,T., Giallambardo,N., Stone,C., Schadt,K., Dolgoff,J., Tetreault,J.C., Villarroel,M., and Kufe,D.** (2004). Fusion cell vaccination of patients with metastatic breast and renal cancer induces immunological and clinical responses. *Clinical Cancer Research* 10, 4699-4708.
87. **Marten,A., Renoth,S., Heinicke,T., Albers,P., Pauli,A., Mey,U., Caspari,R., Flieger,D., Hanfland,P., Von Ruecker,A., Eis-Hubinger,A.M., Muller,S., Schwaner,I., Lohmann,U., Heylmann,G., Sauerbruch,T., and Schmidt-Wolf,I.G.H.** (2003). Allogeneic dendritic cells fused with tumor cells: Preclinical results and outcome of a clinical phase I/II trial in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Human Gene Therapy* 14, 483-494.
88. **Tamura,Y., Peng,P., Liu,K., Daou,M., and Srivastava,P.K.** (1997). Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science* 278, 117-120.
89. **Cohen,L., de Moor,C., Parker,P.A., and Amato,R.J.** (2002). Quality of life in patients with metastatic renal cell carcinoma participating in a phase I trial of an autologous tumor-derived vaccine. *Urologic Oncology* 7, 119-124.
90. **Ahmadzadeh,M. and Rosenberg,S.T.** (2006). IL-2 administration increases CD4(+)CD25(hi) Foxp3(+) regulatory T cells in cancer patients. *Blood* 107, 2409-2414.
91. **Dannull,J., Su,Z., Rizzieri,D., Yang,B.K., Coleman,D., Yancey,D., Zhang,A.J., 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. *Journal of Clinical Investigation* 115, 3623-3633.
92. **Yang,J.C., Haworth,L., Sherry,R.M., Hwu,P., Schwartzentruber,D.J., Topalian,S.L., Steinberg,S.M., Chen,H.X., and Rosenberg,S.A.** (2003). A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *New England Journal of Medicine* 349, 427-434.
93. **Rowinsky,E.K., Schwartz,G.H., Gollob,J.A., Thompson,J.A., Vogelzang,N.J., Figlin,R., Bukowski,R., Haas,N., Lockbaum,P., Li,Y.P., Arends,R., Foon,K.A., Schwab,G., and Dutcher,J.** (2004). Safety, pharmacokinetics, and activity of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in patients with metastatic renal cell cancer. *Journal of clinical oncology* 22, 3003-3015.
94. **Bleumer,I., Knuth,A., Oosterwijk,E., Hofmann,R., Varga,Z., Lamers,C., Kruit,W., Melchior,S., Mala,C., Ullrich,S., De Mulder,P., Mulders,P.F.A., and Becks,J.** (2004). A phase II trial of chimeric monoclonal antibody G250 for advanced renal cell carcinoma patients. *The British journal of cancer* 90, 985-990.

95. **Balch,C.M., Riley,L.B., Bae,Y.J., Salmeron,M.A., Platsoucas,C.D., Voneschenbach,A., and Itoh,K.** (1990). Patterns of Human Tumor-Infiltrating Lymphocytes in 120 Human Cancers. *Archives of Surgery* 125, 200-205.
96. **Mitropoulos,D., Kooi,S., Rodriguezvillanueva,J., and Platsoucas,C.D.** (1994). Characterization of Fresh (Uncultured) Tumor-Infiltrating Lymphocytes (Til) and Til-Derived T-Cell Lines from Patients with Renal-Cell Carcinoma. *Clinical and Experimental Immunology* 97, 321-327.
97. **Gaudin,C., Dietrich,P.Y., Robache,S., Guillard,M., Escudier,B., Lacombe,M.J.T., Kumar,A., Triebel,F., and Caignard,A.** (1995). In-Vivo Local Expansion of Clonal T-Cell Subpopulations in Renal-Cell Carcinoma. *Cancer research* 55, 685-690.
98. **VanderHove,L.E., VanGool,S.W., VanPoppel,H., Baert,L., Coorevits,L., VanDamme,B., and Ceuppens,J.L.** (1997). Phenotype, cytokine production and cytolytic capacity of fresh (uncultured) tumour-infiltrating T lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Clinical and Experimental Immunology* 109, 501-509.
99. **Angevin,E., Kremer,F., Gaudin,C., Hercend,T., and Triebel,F.** (1997). Analysis of T-cell immune response in renal cell carcinoma: Polarization to type 1-like differentiation pattern, clonal T-cell expansion and tumor-specific cytotoxicity. *International journal of cancer* 72, 431-440.
100. **Cozar,J., Canton,J., Tallada,M., Concha,A., Cabrera,T., Garrido,F., and Osuna,F.R.C.** (2005). Analysis of NK cells and chemokine receptors in tumor infiltrating CD4 T lymphocytes in human renal carcinomas. *Cancer immunology, immunotherapy* 54, 858-866.
101. **Kondo,T., Nakazawa,H., Ito,F., Hashimoto,Y., Osaka,Y., Futatsuyama,K., Toma,H., and Tanabe,K.** (2006). Favorable prognosis of renal cell carcinoma with increased expression of chemokines associated with a Th1-type immune response. *Cancer Science* 97, 780-786.
102. **Guerra,N., Michel,F., Gati,A., Gaudin,C., Mishal,Z., Escudier,B., Acuto,O., Chouaib,S., and Caignard,A.** (2002). Engagement of the inhibitory receptor CD158a interrupts TCR signaling, preventing dynamic membrane reorganization in CTL/tumor cell interaction. *Blood* 100, 2874-2881.
103. **Gati,A., Guerra,N., Gaudin,C., Da Rocha,S., Escudier,B., Lecluse,Y., Bettaieb,A., Chouaib,S., and Caignard,A.** (2003). CD158 receptor controls cytotoxic T-lymphocyte susceptibility to tumor-mediated activation-induced cell death by interfering with fas signaling. *Cancer research* 63, 7475-7482.
104. **Schleypen,J.S., Von Geldern,M., Weiss,E.H., Kotzias,N., Rohrmann,K., Schendel,D.J., Falk,C.S., and Pohla,H.** (2003). Renal cell carcinoma-infiltrating natural killer cells express differential repertoires of activating and inhibitory receptors and are inhibited by specific HLA class I allotypes. *International journal of cancer* 106, 905-912.
105. **Schleypen,J.S., Baur,N., Kammerer,R., Nelson,P.J., Rohrmann,K., Grone,E.F., Hohenfellner,M., Haferkamp,A., Pohla,H., Schendel,D.J., Falk,C.S., and Noessner,E.** (2006). Cytotoxic markers and frequency predict functional capacity of natural killer cells infiltrating renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research* 12, 718-725.
106. **Shuin,T., Yamasaki,I., Tamura,K., Okuda,H., Furihata,M., and Ashida,S.** (2006). Von Hippel-Lindau disease: Molecular pathological basis, clinical criteria, genetic testing, clinical features of tumors and treatment. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 36, 337-343.
107. **Neumann,H.P.H. and Wiestler,O.D.** (1991). Clustering of Features of Vonhippel-Lindau Syndrome - Evidence for A Complex Genetic-Locus. *Lancet* 337, 1052-1054.

108. **Maher,E.R., Yates,J.R.W., Harries,R., Benjamin,C., Harris,R., Moore,A.T., and Fergusonsmith,M.A.** (1990). Clinical-Features and Natural-History of Vonhippel-Lindau Disease. *Quarterly Journal of Medicine* 77, 1151-1163.
109. **Maher,E.R., Iselius,L., Yates,J.R.W., Littler,M., Benjamin,C., Harris,R., Sampson,J., Williams,A., Fergusonsmith,M.A., and Morton,N.** (1991). Vonhippel-Lindau Disease - A Genetic-Study. *Journal of Medical Genetics* 28, 443-447.
110. **Richards,F.M., Webster,A.R., McMahon,R., Woodward,E.R., Rose,S., and Maher,E.R.** (1998). Molecular genetic analysis of von Hippel-Lindau disease. *Journal of Internal Medicine* 243, 527-533.
111. **Linehan,W.M., Lerman,M.I., and Zbar,B.** (1995). Identification of the Vonhippel-Lindau (Vhl) Gene - Its Role in Renal-Cancer. *Jama-Journal of the American Medical Association* 273, 564-570.
112. **Kaelin,W.G.** (2002). Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nature Reviews Cancer* 2, 673-682.
113. **Lonser,R.R., Glenn,G.M., Walther,M., Chew,E.Y., Libutti,S.K., Linehan,W.M., and Oldfield,E.H.** (2003). von Hippel-Lindau disease. *Lancet* 2059-2067.
114. **Zbar,B., Kishida,T., Chen,F., Schmidt,L., Maher,E.R., Richards,F.M., Crossey,P.A., Webster,A.R., Affara,N.A., Fergusonsmith,M.A., Brauch,H., Glavac,D., Neumann,H.P.H., Tisherman,S., Mulvihill,J.J., Gross,D.J., Shuin,T., Whaley,J., Seizinger,B., Kley,N., Olschwang,S., Boisson,C., Richard,S., Lips,C.H.M., Linehan,W.M., and Lerman,M.** (1996). Germline mutations in the Von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in families from North America, Europe, and Japan. *Human Mutation* 8, 348-357.
115. **Glavac,D., Neumann,H.P.H., Wittke,C., Jaenig,H., Masek,O., Streicher,T., Pausch,F., Engelhardt,D., Plate,K.H., Hofler,H., Chen,F., Zbar,B., and Brauch,H.** (1996). Mutations in the VHL tumor suppressor gene and associated lesions in families with von Hippel-Lindau disease from central Europe. *Human Genetics* 98, 271-280.
116. **Chen,F., Kishida,T., Yao,M., Hustad,T., Glavac,D., Dean,M., Gnarra,J.R., Orcutt,M.L., Duh,F.M., Glenn,G., Green,J., Hsia,Y.E., Lamiell,J., Li,H., Wei,M.H., Schmidt,L., Tory,K., Kuzmin,I., Stackhouse,T., Latif,F., Linehan,W.M., Lerman,M., and Zbar,B.** (1995). Germline Mutations in the Vonhippel-Lindau Disease Tumor-Suppressor Gene - Correlations with Phenotype. *Human Mutation* 5, 66-75.
117. **Crossey,P.A., Richards,F.M., Foster,K., Green,J.S., Prowse,A., Latif,F., Lerman,M.I., Zbar,B., Affara,N.A., Fergusonsmith,M.A., and Maher,E.R.** (1994). Identification of Intragenic Mutations in the Von Hippel-Lindau Disease Tumor-Suppressor Gene and Correlation with Disease Phenotype. *Human Molecular Genetics* 3, 1303-1308.
118. **Neumann,H.P.H. and Bender,B.U.** (1998). Genotype-phenotype correlations in von Hippel-Lindau disease. *Journal of Internal Medicine* 243, 541-545.
119. **Maher,E.R., Webster,A.R., Richards,F.M., Green,J.S., Crossey,P.A., Payne,S.J., and Moore,A.T.** (1996). Phenotypic expression in von Hippel-Lindau disease: Correlations with germline VHL gene mutations. *Journal of Medical Genetics* 33, 328-332.
120. **Seagroves,T. and Johnson,R.S.** (2002). Two HIFs may be better than one. *Cancer Cell* 1, 211-213.
121. **Kovacs,G., Akhtar,M., Beckwith,B.J., Bugert,P., Cooper,C.S., Delahunt,B., Eble,J.N., Fleming,S., Ljungberg,B., Medeiros,L.J., Moch,H., Reuter,V.E., Ritz,E., Roos,G.,**



- Schmidt,D., Srigley,J.R., Storkel,S., VandenBerg,E., and Zbar,B. (1997). The Heidelberg classification of renal cell tumours. *Journal of Pathology* 183, 131-133.
122. Lisztwan,J., Imbert,G., Wirbelauer,C., Gstaiger,M., and Krek,W. (1999). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes & Development* 13, 1822-1833.
  123. Iwai,K., Yamanaka,K., Kamura,T., Minato,N., Conaway,R.C., Canaway,J.W., Klausner,R.D., and Pause,A. (1999). Identification of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 12436-12441.
  124. Kamura,T., Koepp,D.M., Conrad,M.N., Skowyra,D., Moreland,R.J., Iliopoulos,O., Lane,W.S., Kaelin,W.G., Elledge,S.J., Conaway,R.C., Harper,J.W., and Conway,J.W. (1999). Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* 284, 657-661.
  125. Kibel,A., Iliopoulos,O., DeCaprio,J.A., and Kaelin,W.G. (1995). Binding of the Vonhippel-Lindau Tumor-Suppressor Protein to Elongin-B and Elongin-C. *Science* 269, 1444-1446.
  126. Iliopoulos,O., Ohh,M., and Kaelin,W.G. (1998). pVHL(19) is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 11661-11666.
  127. Duan,D.R., Humphrey,J.S., Chen,D.Y.T., Weng,Y.K., Sukegawa,J., Lee,S., Gnarr,J.R., Linehan,W.M., and Klausner,R.D. (1995). Characterization of the Vhl Tumor-Suppressor Gene-Product - Localization, Complex-Formation, and the Effect of Natural Inactivating Mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 6459-6463.
  128. Ohh,M., Park,C.W., Ivan,N., Hoffman,M.A., Kim,T.Y., Huang,L.E., Pavletich,N., Chau,V., and Kaelin,W.G. (2000). Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nature Cell Biology* 2, 423-427.
  129. Cockman,M.E., Masson,N., Mole,D.R., Jaakkola,P., Chang,G.W., Clifford,S.C., Maher,E.R., Pugh,C.W., Ratcliffe,P.J., and Maxwell,P.H. (2000). Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Journal of Biological Chemistry* 275, 25733-25741.
  130. Tanimoto,K., Makino,Y., Pereira,T., and Poellinger,L. (2000). Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Embo Journal* 19, 4298-4309.
  131. Kamura,T., Sato,S., Iwai,K., Czyzyk-Krzeska,M., Conaway,R.C., and Conaway,J.W. (2000). Activation of HIF1 alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10430-10435.
  132. Maxwell,P.H., Wiesener,M.S., Chang,G.W., Clifford,S.C., Vaux,E.C., Cockman,M.E., Wykoff,C.C., Pugh,C.W., Maher,E.R., and Ratcliffe,P.J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271-275.
  133. Ivan,M., Kondo,K., Yang,H.F., Kim,W., Valiando,J., Ohh,M., Salic,A., Asara,J.M., Lane,W.S., and Kaelin,W.G. (2001). HIF alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O-2 sensing. *Science* 292, 464-468.

134. **Bruick,R.K. and McKnight,S.L.** (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294, 1337-1340.
135. **Epstein,A.C.R., Gleadle,J.M., McNeill,L.A., Hewitson,K.S., O'Rourke,J., Mole,D.R., Mukherji,M., Metzen,E., Wilson,M.I., Dhanda,A., Tian,Y.M., Masson,N., Hamilton,D.L., Jaakkola,P., Barstead,R., Hodgkin,J., Maxwell,P.H., Pugh,C.W., Schofield,C.J., and Ratcliffe,P.J.** (2001). C-elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107, 43-54.
136. **Jaakkola,P., Mole,D.R., Tian,Y.M., Wilson,M.I., Gielbert,J., Gaskell,S.J., von Kriegsheim,A., Hebestreit,H.F., Mukherji,M., Schofield,C.J., Maxwell,P.H., Pugh,C.W., and Ratcliffe,P.J.** (2001). Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O-2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472.
137. **Masson,N., Willam,C., Maxwell,P.H., Pugh,C.W., and Ratcliffe,P.J.** (2001). Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *Embo Journal* 20, 5197-5206.
138. **Yu,F., White,S.B., Zhao,Q., and Lee,F.S.** (2001). HIF-1 alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 9630-9635.
139. **Semenza,G.L.** (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 3, 721-732.
140. **Bonicalzi,M.E., Groulx,I., de Paulsen,N., and Lee,S.** (2001). Role of exon 2-encoded beta-domain of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Journal of Biological Chemistry* 276, 1407-1416.
141. **Krieg,M., Haas,R., Brauch,H., Acker,T., Flamme,I., and Plate,K.H.** (2000). Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1 alpha and HIF-2 alpha under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene* 19, 5435-5443.
142. **Clifford,S.C., Cockman,M.E., Smallwood,A.C., Mole,D.R., Woodward,E.R., Maxwell,P.H., Ratcliffe,P.J., and Maher,E.R.** (2001). Contrasting effects on HIF-1 alpha regulation by disease-causing pVHL mutations correlate with patterns of tumourigenesis in von Hippel-Lindau disease. *Human Molecular Genetics* 10, 1029-1038.
143. **Wiesener,M.S., Munchenhagen,P.M., Berger,I., Morgan,N.V., Roigas,J., Schwiertz,A., Jurgensen,J.S., Gruber,G., Maxwell,P.H., Loning,S.A., Frei,U., Maher,E.R., Grone,H.J., and Eckardt,K.U.** (2001). Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in clear cell renal carcinomas. *Cancer research* 61, 5215-5222.
144. **Hoffman,M.A., Ohh,M., Yang,H.F., Klco,J.M., Ivan,M., and Kaelin,W.G.** (2001). von Hippel-Lindau protein mutants linked to type 2C VHL disease preserve the ability to downregulate HIF. *Human Molecular Genetics* 10, 1019-1027.
145. **Talks,K.L., Turley,H., Gatter,K.C., Maxwell,P.H., Pugh,C.W., Ratcliffe,P.J., and Harris,A.L.** (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 alpha and HIF-2 alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *American Journal of Pathology* 157, 411-421.
146. **Zhong,H., De Marzo,A.M., Laughner,E., Lim,M., Hilton,D.A., Zagzag,D., Buechler,P., Isaacs,W.B., Semenza,G.L., and Simons,J.W.** (1999). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer research* 59, 5830-5835.

147. **Karumanchi,S.A., Merchan,J., and Sukhatme,V.P.** (2002). Renal cancer: molecular mechanisms and newer therapeutic options. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* *11*, 37-42.
148. **Brusselmans,K., Bono,F., Maxwell,P., Dor,Y., Dewerchin,M., Collen,D., Herbert,J.M., and Carmeliet,P.** (2001). Hypoxia-inducible factor-2 alpha (HIF-2 alpha) is involved in the apoptotic response to hypoglycemia but not to hypoxia. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 39192-39196.
149. **Semenza GL** (1999). .Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annual review of cell and developmental biology* *15*, 551-578.
150. **Sowter,H.M., Raval,R., Moore,J., Ratcliffe,P.J., and Harris,A.L.** (2003). Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif)-1 alpha versus Hif-2 alpha in regulation of the transcriptional response to hypoxia. *Cancer research* *63*, 6130-6134.
151. **Hu,C.J., Wang,L.Y., Chodosh,L.A., Keith,B., and Simon,M.C.** (2003). Differential roles of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) and HIF-2 alpha in hypoxic gene regulation. *Molecular and cellular biology* *23*, 9361-9374.
152. **Iyer,N.V., Kotch,L.E., Agani,F., Leung,S.W., Laughner,E., Wenger,R.H., Gassmann,M., Gearhart,J.D., Lawler,A.M., Yu,A.Y., and Semenza,G.L.** (1998). Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes & Development* *12*, 149-162.
153. **Park,S.K., Dadak,A.M., Haase,V.H., Fontana,L., Giaccia,A.J., and Johnson,R.S.** (2003). Hypoxia-induced gene expression occurs solely through the action of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha): Role of cytoplasmic trapping of HIF-2 alpha. *Molecular and cellular biology* *23*, 4959-4971.
154. **Ryan,H.E., Lo,J., and Johnson,R.S.** (1998). HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo Journal* *17*, 3005-3015.
155. **Kondo,K., Klco,J., Nakamura,E., Lechpammer,M., and Kaelin,W.G.** (2002). Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell* *1*, 237-246.
156. **Maranchie,J.K., Vasselli,J.R., Riss,J., Bonifacino,J.S., Linehan,W.M., and Klausner,R.D.** (2002). The contribution of VHL substrate binding and HIF1-alpha to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. *Cancer Cell* *1*, 247-255.
157. **Raval,R.R., Lau,K.W., Tran,M.G.B., Sowter,H.M., Mandriota,S.J., Li,J.L., Pugh,C.W., Maxwell,P.H., Harris,A.L., and Ratcliffe,P.J.** (2005). Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Molecular and cellular biology* *25*, 5675-5686.
158. **Mandriota,S.J., Turner,K.J., Davies,D.R., Murray,P.G., Morgan,N.V., Sowter,H.M., Wykoff,C.C., Maher,E.R., Harris,A.L., Ratcliffe,P.J., and Maxwell,P.H.** (2002). HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: Evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron. *Cancer Cell* *1*, 459-468.
159. **Knebelmann,B., Ananth,S., Cohen,H.T., and Sukhatme,V.P.** (1998). Transforming growth factor or is a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Cancer research* *58*, 226-231.
160. **Lee,D.C., Fenton,S.E., Berkowitz,E.A., and Hissong,M.A.** (1995). Transforming growth factor  $\alpha$ : expression, regulation and biological activities. *Pharmacological reviews* *47*, 51-85.

161. **Humes,H.D., Beals,T.F., Cieslinski,D.A., Sanchez,I.O., and Page,T.P.** (1991). Effects of Transforming Growth-Factor-Beta, Transforming Growth Factor-Alpha, and Other Growth-Factors on Renal Proximal Tubule Cells. *Laboratory Investigation* 64, 538-545.
162. **Gomella,L.G., Sargent,E.R., Wade,T.P., Anglard,P., Linehan,W.M., and Kasid,A.** (1989). Expression of Transforming Growth Factor-Alpha in Normal Human Adult Kidney and Enhanced Expression of Transforming Growth Factor-Alpha and Factor-Beta-1 in Renal-Cell Carcinoma. *Cancer research* 49, 6972-6975.
163. **Petrides,P.E., Bock,S., Bovens,J., Hofmann,R., and Jakse,G.** (1990). Modulation of Pro-Epidermal Growth-Factor, Pro-Transforming Growth Factor-Alpha and Epidermal Growth-Factor Receptor Gene-Expression in Human Renal Carcinomas. *Cancer research* 50, 3934-3939.
164. **Mydlo,J.H., Michaeli,J., Cordoncardo,C., Goldenberg,A.S., Heston,W.D.W., and Fair,W.R.** (1989). Expression of Transforming Growth Factor-Alpha and Epidermal Growth-Factor Receptor Messenger-Rna in Neoplastic and Nonneoplastic Human-Kidney Tissue. *Cancer research* 49, 3407-3411.
165. **Lager,D.J., Slagel,D.D., and Palechek,P.L.** (1994). The Expression of Epidermal Growth-Factor Receptor and Transforming Growth-Factor-Alpha in Renal-Cell Carcinoma. *Modern Pathology* 7, 544-548.
166. **de Paulsen,N., Brychzy,A., Fournier,M.C., Klausner,R.D., Gnarra,J.R., Pause,A., and Lee,S.** (2001). Role of transforming growth factor-alpha in von Hippel--Lindau (VHL)(-/-) clear cell renal carcinoma cell proliferation: a possible mechanism coupling VHL tumor suppressor inactivation and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1387-1392.
167. **Gunaratnam,L., Morley,M., Franovic,A., de Paulsen,N., Mekhail,K., Parolin,D.A.E., Nakamura,E., Lorimer,I.A.J., and Lee,S.** (2003). Hypoxia inducible factor activates the transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor receptor growth stimulatory pathway in VHL-/- renal cell carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 278, 44966-44974.
168. **Smith,K., Gunaratnam,L., Morley,M., Franovic,A., Mekhail,K., and Lee,S.** (2005). Silencing of epidermal growth factor receptor suppresses hypoxia-inducible factor-2-driven VHL-/- renal cancer. *Cancer research* 65, 5221-5230.
169. **Blasband,A.J., Rogers,K.T., Chen,X.R., Azizkhan,J.C., and Lee,D.C.** (1990). Characterization of the rat transforming growth factor alpha gene and identification of promoter sequences. *Molecular and cellular biology* 10, 2111-2121.
170. **Derynck,R., Roberts,A.B., Winkler,M.E., Chen,E.Y., and Goeddel,D.V.** (1984). Human Transforming Growth Factor-Alpha - Precursor Structure and Expression in Escherichia-Coli. *Cell* 38, 287-297.
171. **Brachmann,R., Lindquist,P.B., Nagashima,M., Kohr,W., Lipari,T., Napier,M., and Derynck,R.** (1989). Transmembrane Tgf-Alpha Precursors Activate Egf Tgf-Alpha Receptors. *Cell* 56, 691-700.
172. **Wong,S.T., Winchell,L.F., Mccune,B.K., Earp,H.S., Teixido,J., Massague,J., Herman,B., and Lee,D.C.** (1989). The Tgf-Alpha Precursor Expressed on the Cell-Surface Binds to the Egf Receptor on Adjacent Cells, Leading to Signal Transduction. *Cell* 56, 495-506.

173. **Sandgren,E.P., Luetteke,N.C., Palmiter,R.D., Brinster,R.L., and Lee,D.C.** (1990). Overexpression of Tgf-Alpha in Transgenic Mice - Induction of Epithelial Hyperplasia, Pancreatic Metaplasia, and Carcinoma of the Breast. *Cell* 61, 1121-1135.
174. **Jhappan,C., Stahle,C., Harkins,R.N., Fausto,N., Smith,G.H., and Merlino,G.T.** (1990). Tgf-Alpha Overexpression in Transgenic Mice Induces Liver Neoplasia and Abnormal-Development of the Mammary-Gland and Pancreas. *Cell* 61, 1137-1146.
175. **Bade,E.G. and Feindler,S.** (1988). Liver Epithelial-Cell Migration Induced by Epidermal Growth-Factor Or Transforming Growth Factor-Alpha Is Associated with Changes in the Gene-Expression of Secreted Proteins. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 24, 149-154.
176. **Barrandon,Y. and Green,H.** (1987). Cell-Migration Is Essential for Sustained Growth of Keratinocyte Colonies - the Roles of Transforming Growth Factor-Alpha and Epidermal Growth-Factor. *Cell* 50, 1131-1137.
177. **Serrero,G.** (1987). Egf Inhibits the Differentiation of Adipocyte Precursors in Primary Cultures. *Biochemical and biophysical research communications* 146, 194-202.
178. **Luetteke,N.C., Lee,D.C., Palmiter,R.D., Brinster,R.L., and Sandgren,E.P.** (1993). Regulation of Fat and Muscle Development by Transforming Growth Factor-Alpha in Transgenic Mice and in Cultured-Cells. *Cell Growth & Differentiation* 4, 203-213.
179. **Davidson,N.E., Prestigiacomo,L.J., and Hahm,H.A.** (1993). Induction of Jun Gene Family Members by Transforming Growth Factor-Alpha But Not 17-Beta-Estradiol in Human Breast-Cancer Cells. *Cancer research* 53, 291-297.
180. **Schreiber,A.B., Winkler,M.E., and Derynck,R.** (1986). Transforming Growth Factor-Alpha - A More Potent Angiogenic Mediator Than Epidermal Growth-Factor. *Science* 232, 1250-1253.
181. **Schultz,G.S., Chegini,N., Grant,M., Khaw,P., and MacKay,S.** (1992). Effects of growth factors on corneal wound healing. *Acta ophthalmologica. Supplement* 70, 60-66.
182. **Schultz,G.S., White,M., Mitchell,R., Brown,G., Lynch,J., Twardzik,D.R., and Todaro,G.J.** (1987). Epithelial Wound-Healing Enhanced by Transforming Growth Factor-Alpha and Vaccinia Growth-Factor. *Science* 235, 350-352.
183. **Ibbotson,K.J., Twardzik,D.R., Dsouza,S.M., Hargreaves,W.R., Todaro,G.J., and Mundy,G.R.** (1985). Stimulation of Bone-Resorption In vitro by Synthetic Transforming Growth Factor-Alpha. *Science* 228, 1007-1009.
184. **Liscia,D.S., Merlo,G., Ciardiello,F., Kim,N., Smith,G.H., Callahan,R., and Salomon,D.S.** (1990). Transforming Growth Factor-Alpha Messenger-Rna Localization in the Developing Adult-Rat and Human Mammary-Gland by Insitu Hybridization. *Developmental Biology* 140, 123-131.
185. **Kudlow,J.E., Leung,A.W.C., Kobrin,M.S., Paterson,A.J., and Asa,S.L.** (1989). Transforming Growth Factor-Alpha in the Mammalian Brain - Immunohistochemical Detection in Neurons and Characterization of Its Messenger-Rna. *Journal of Biological Chemistry* 264, 3880-3883.
186. **Liu,C., Woo,A., and Tsao,M.S.** (1990). Expression of Transforming Growth Factor-Alpha in Primary Human Colon and Lung Carcinomas. *The British journal of cancer* 62, 425-429.

187. **Thomas,D.M., Nasim,M.M., Gullick,W.J., and Alison,M.R.** (1992). Immunoreactivity of Transforming Growth Factor-Alpha in the Normal Adult Gastrointestinal-Tract. *Gut* 33, 628-631.
188. **Coffey,R.J., Derynck,R., Wilcox,J.N., Bringman,T.S., Goustin,A.S., Moses,H.L., and Pittelkow,M.R.** (1987). Production and Autoinduction of Transforming Growth Factor-Alpha in Human Keratinocytes. *Nature* 328, 817-820.
189. **Gottlieb,A.B., Chang,C.K., Posnett,D.N., Fanelli,B., and Tam,J.P.** (1988). Detection of Transforming Growth Factor-Alpha in Normal, Malignant, and Hyperproliferative Human Keratinocytes. *The Journal of experimental medicine* 167, 670-675.
190. **Elder,J.T., Fisher,G.J., Lindquist,P.B., Bennett,G.L., Pittelkow,M.R., Coffey,R.J., Ellingsworth,L., Derynck,R., and Voorhees,J.J.** (1989). Overexpression of Transforming Growth Factor-Alpha in Psoriatic Epidermis. *Science* 243, 811-814.
191. **Turbitt,M.L., Akhurst,R.J., White,S.I., and Mackie,R.M.** (1990). Localization of Elevated Transforming Growth Factor-Alpha in Psoriatic Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* 95, 229-232.
192. **Hise,M.K., Jacobs,S.C., Papadimitriou,J.C., and Drachenberg,C.I.** (1996). Transforming growth factor-alpha expression in human renal cell carcinoma: TGF-alpha expression in renal cell carcinoma. *Urology* 47, 29-33.
193. **Madtes,D.K., Raines,E.W., Sakariassen,K.S., Assoian,R.K., Sporn,M.B., Bell,G.I., and Ross,R.** (1988). Induction of Transforming Growth Factor-Alpha in Activated Human Alveolar Macrophages. *Cell* 53, 285-293.
194. **Miettinen,P.J.** (1993). Transforming Growth Factor-Alpha and Epidermal Growth-Factor Expression in Human Fetal Gastrointestinal-Tract. *Pediatric Research* 33, 481-486.
195. **Uhlman,D.L., Nguyen,P., Manivel,J.C., Zhang,G., Hagen,K., Fraley,E., Aeppli,D., and Niehans,G.A.** (1995). Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha expression in papillary and nonpapillary renal cell carcinoma: Correlation with metastatic behavior and prognosis. *Clinical Cancer Research* 1, 913-920.
196. **Morishige,K.I., Kurachi,H., Amemiya,K., Fujita,Y., Yamamoto,T., Miyake,A., and Tanizawa,O.** (1991). Evidence for the Involvement of Transforming Growth Factor-Alpha and Epidermal Growth-Factor Receptor Autocrine Growth-Mechanism in Primary Human Ovarian Cancers Invitro. *Cancer research* 51, 5322-5328.
197. **Saxena,A. and Ali,I.U.** (1992). Increased Expression of Genes from Growth-Factor Signaling Pathways in Glioblastoma Cell-Lines. *Oncogene* 7, 243-247.
198. **Barton,C.M., Hall,P.A., Hughes,C.M., Gullick,W.J., and Lemoine,N.R.** (1991). Transforming Growth Factor-Alpha and Epidermal Growth-Factor in Human Pancreatic-Cancer. *Journal of Pathology* 163, 111-116.
199. **Finzi,E., Ho,T., Anhalt,G., Hawkins,W., Harkins,R., and Horn,T.** (1992). Localization of Transforming Growth Factor-Alpha in Human Appendageal Tumors. *American Journal of Pathology* 141, 643-653.
200. **Bates,S.E., Davidson,N.E., Valverius,E.M., Freter,C.E., Dickson,R.B., Tam,J.P., Kudlow,J.E., Lippman,M.E., and Salomon,D.S.** (1988). Expression of Transforming Growth Factor-Alpha and Its Messenger Ribonucleic-Acid in Human-Breast Cancer - Its Regulation by Estrogen and Its Possible Functional-Significance. *Molecular Endocrinology* 2, 543-555.

201. **Driman,D.K., Kobrin,M.S., Kudlow,J.E., and Asa,S.L.** (1992). Transforming Growth Factor-Alpha in Normal and Neoplastic Human Endocrine Tissues. *Human Pathology* 23, 1360-1365.
202. **Tateishi,M., Ishida,T., Mitsudomi,T., Kaneko,S., and Sugimachi,K.** (1990). Immunohistochemical Evidence of Autocrine Growth-Factors in Adenocarcinoma of the Human Lung. *Cancer research* 50, 7077-7080.
203. **Liu,C. and Tsao,M.S.** (1993). Invitro and Invivo Expressions of Transforming Growth Factor-Alpha and Tyrosine Kinase Receptors in Human Non-Small-Cell Lung Carcinomas. *American Journal of Pathology* 142, 1155-1162.
204. **Tanaka,S., Imanishi,K., Yoshihara,M., Haruma,K., Sumii,K., Kajiyama,G., and Akamatsu,S.** (1991). Immunoreactive Transforming Growth Factor-Alpha Is Commonly Present in Colorectal Neoplasia. *American Journal of Pathology* 139, 123-129.
205. **Kim,M.K., Warren,T.C., and Kimball,E.S.** (1985). Purification and Characterization of A Low-Molecular Weight Transforming Growth-Factor from the Urine of Melanoma Patients. *Journal of Biological Chemistry* 260, 9237-9243.
206. **Stromberg,K., Hudgins,W.R., and Orth,D.N.** (1987). Urinary Tgfs1 in Neoplasia - Immunoreactive Tgf-Alpha in the Urine of Patients with Disseminated Breast-Carcinoma. *Biochemical and biophysical research communications* 144, 1059-1068.
207. **Sherwin,S.A., Twardzik,D.R., Bohn,W.H., Cockley,K.D., and Todaro,G.J.** (1983). High-Molecular-Weight Transforming Growth-Factor Activity in the Urine of Patients with Disseminated Cancer. *Cancer research* 43, 403-407.
208. **Yeh,Y.C., Tsai,J.F., Chuang,L.Y., Yeh,H.W., Tsai,J.H., Florine,D.L., and Tam,J.P.** (1987). Elevation of Transforming Growth Factor-Alpha and Its Relationship to the Epidermal Growth-Factor and Alpha-Fetoprotein Levels in Patients with Hepatocellular-Carcinoma. *Cancer research* 47, 896-901.
209. **Atlas,I., Mendelsohn,J., Baselga,J., Fair,W.R., Masui,H., and Kumar,R.** (1992). Growth-Regulation of Human Renal-Carcinoma Cells - Role of Transforming Growth Factor-Alpha. *Cancer research* 52, 3335-3339.
210. **Smith,J.J., Derynck,R., and Korc,M.** (1987). Production of Transforming Growth Factor-Alpha in Human Pancreatic-Cancer Cells - Evidence for A Superagonist Autocrine Cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 7567-7570.
211. **Ohmura,E., Okada,M., Onoda,N., Kamiya,Y., Murakami,H., Tsushima,T., and Shizume,K.** (1990). Insulin-Like Growth Factor-I and Transforming Growth Factor-Alpha As Autocrine Growth-Factors in Human Pancreatic-Cancer Cell-Growth. *Cancer research* 50, 103-107.
212. **Hofer,D.R., Sherwood,E.R., Bromberg,W.D., Mendelsohn,J., Lee,C., and Kozlowski,J.M.** (1991). Autonomous Growth of Androgen-Independent Human Prostatic-Carcinoma Cells - Role of Transforming Growth Factor-Alpha-1. *Cancer research* 51, 2780-2785.
213. **Karnes,W.E., Walsh,J.H., Wu,S.V., Kim,R.S., Martin,M.G., Wong,H.C., Mendelsohn,J., Park,J.G., and Cuttitta,F.** (1992). Autonomous Proliferation of Colon Cancer-Cells That Coexpress Transforming Growth Factor-Alpha and Its Receptor - Variable Effects of Receptor-Blocking Antibody. *Gastroenterology* 102, 474-485.

214. **Reiss,M., Stash,E.B., Vellucci,V.F., and Zhou,Z.L.** (1991). Activation of the Autocrine Transforming Growth Factor-Alpha Pathway in Human Squamous Carcinoma-Cells. *Cancer research* *51*, 6254-6262.
215. **Luetteke,N.C., Qiu,T.H., Peiffer,R.L., Oliver,P., Smithies,O., and Lee,D.C.** (1993). Tgf-Alpha Deficiency Results in Hair Follicle and Eye Abnormalities in Targeted and Waved-1 Mice. *Cell* *73*, 263-278.
216. **Mann,G.B., Fowler,K.J., Gabriel,A., Nice,E.C., Williams,R.L., and Dunn,A.R.** (1993). Mice with A Null Mutation of the Tgf-Alpha Gene Have Abnormal Skin Architecture, Wavy Hair, and Curly Whiskers and Often Develop Corneal Inflammation. *Cell* *73*, 249-261.
217. **Rosenthal,A., Lindquist,P.B., Bringman,T.S., Goeddel,D.V., and Derynck,R.** (1986). Expression in Rat Fibroblasts of A Human Transforming Growth Factor-Alpha Cdna Results in Transformation. *Cell* *46*, 301-309.
218. **Finzi,E., Fleming,T., and Pierce,J.H.** (1990). Retroviral Expression of Transforming Growth Factor-Alpha Does Not Transform Fibroblasts Or Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* *95*, 382-387.
219. **Finzi,E., Fleming,T., Segatto,O., Pennington,C.Y., Bringman,T.S., Derynck,R., and Aaronson,S.A.** (1987). The Human Transforming Growth-Factor Type-Alpha Coding Sequence Is Not A Direct-Acting Oncogene When Overexpressed in Nih 3T3 Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *84*, 3733-3737.
220. **Harris,R.C., Chung,E., and Coffey,R.J.** (2003). EGF receptor ligands. *Experimental Cell Research* *284*, 2-13.
221. **Lee,D.C., Sunnarborg,S.W., Hinkle,C.L., Myers,T.J., Stevenson,M., Russell,W.E., Castner,B.J., Gerhart,M.J., Paxton,R.J., Black,R.A., Chang,A., and Jackson,L.F.** (2003). TACE/ADAM17 processing of EGFR ligands indicates a role as a physiological convertase. *Tissue Remodeling* *995*, 22-38.
222. **Bosenberg,M.W., Pandiella,A., and Massague,J.** (1992). The cytoplasmic carboxy-terminal amino acid specifies cleavage of membrane TGF alpha into soluble growth factor. *Cell* *71*, 1157-1165.
223. **Pandiella,A. and Massague,J.** (1991). Multiple Signals Activate Cleavage of the Membrane Transforming Growth Factor-Alpha Precursor. *Journal of Biological Chemistry* *266*, 5769-5773.
224. **Pandiella,A. and Massague,J.** (1991). Cleavage of the Membrane Precursor for Transforming Growth Factor-Alpha Is A Regulated Process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *88*, 1726-1730.
225. **Massague,J. and Pandiella,A.** (1993). Membrane-Anchored Growth-Factors. *Annual Review of Biochemistry* *62*, 515-541.
226. **Hajnal,A., Whitfield,C.W., and Kim,S.K.** (1997). Inhibition of *Caenorhabditis elegans* vulval induction by gap-1 and by let-23 receptor tyrosine kinase. *Genes & Development* *11*, 2715-2728.
227. **Baselga,J., Mendelsohn,J., Kim,Y.M., and Pandiella,A.** (1996). Autocrine regulation of membrane transforming growth factor-alpha cleavage. *Journal of Biological Chemistry* *271*, 3279-3284.



228. **Derynck,R., Goeddel,D.V., Ullrich,A., Gutterman,J.U., Williams,R.D., Bringman,T.S., and Berger,W.H.** (1987). Synthesis of Messenger-Rnas for Transforming Growth Factor-Alpha and Factor-Beta and the Epidermal Growth-Factor Receptor by Human-Tumors. *Cancer research* 47, 707-712.
229. **Yang,H.S., Jiang,D.H., Li,W.H., Liang,J.R., Gentry,L.E., and Brattain,M.G.** (2000). Defective cleavage of membrane bound TGF alpha leads to enhanced activation of the EGF receptor in malignant cells. *Oncogene* 19, 1901-1914.
230. **American Joint Committee on Cancer (AJCC)** (2006). Cancer staging manual, sixth edition, [www.cancerstaging.org](http://www.cancerstaging.org)
231. **Groulx,I. and Lee,S.** (2002). Oxygen-dependent ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor requires nuclear-cytoplasmic trafficking of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Molecular and cellular biology* 22, 5319-5336.
232. **Loligan,J.E., Kruisbeek,A.M., Margulies,D.H., Shevach,E.M., and Warren,G.** (2004). Generation of Epstein-Barr Virus (EBV)-Immortalized B Cell Lines. *Current Protocols in Immunology* 7.22.1-7.22.3
233. **Dudley,M.E., Nishimura,M.I., Holt,A.K., and Rosenberg,S.A.** (1999). Antitumor immunization with a minimal peptide epitope (G9-209-2M) leads to a functionally heterogeneous CTL response. *Journal of immunotherapy* 22, 288-298.
234. **Pfaffl,M.W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29,
235. **Pfaffl,M.W., Horgan,G.W., and Dempfle,L.** (2002). Relative expression software tool (REST (c)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30,
236. **Forster,R., Schubel,A., Breitfeld,D., Kremmer,E., Renner-Muller,I., Wolf,E., and Lipp,M.** (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99, 23-33.
237. **Warnock,R.A., Campbell,J.J., Dorf,M.E., Matsuzawa,A., McEvoy,L.M., and Butcher,E.C.** (2000). The role of chemokines in the micro environmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules. *The Journal of experimental medicine* 191, 77-88.
238. **Stein,J.V., Rot,A., Luo,Y., Narasimhaswamy,M., Nakano,H., Gunn,M.D., Matsuzawa,A., Quackenbush,E.J., Dorf,M.E., and von Andrian,U.H.** (2000). The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (TCA-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6Ckine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling T lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules. *The Journal of experimental medicine* 191, 61-75.
239. **John E.Loligan, Ada M.Kruisbeek, David H.Margulies, Ethan M.Shevach, and G.Warren** (2004). Immunologic studies in humans. *Current Protocols in Immunology* 7.9.6
240. **Rivoltini,L., Kawakami,Y., Sakaguchi,K., Southwood,S., Sette,A., Robbins,P.F., Marincola,F.M., Salgaller,M.L., Yannelli,J.R., and Appella,E.** (1995). Induction of tumor-reactive CTL from peripheral blood and tumor- infiltrating lymphocytes of melanoma patients by in vitro stimulation with an immunodominant peptide of the human melanoma antigen MART-1. *The journal of immunology* 154, 2257-2265.

241. **Topalian,S., Muul,L., Solomon,D., and Rosenberg,S.A.** (1987). Expansion of human tumor infiltrating lymphocytes for use in immunotherapy trials. *The journal of immunology Methods* *102*, 127-141.
242. **Itoh,K., Platsoucas,D.C., and Balch,C.M.** (1988). Autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas: activation by interleukin 2 and autologous tumor cells and involvement of the T cell receptor. *The Journal of experimental medicine* *168*, 1419-1441.
243. **Muul,L., Spiess,P., Director,E., and Rosenberg,S.A.** (1987). Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma. *The journal of immunology* *138*, 989-995.
244. **Topalian,S., Solomon,D., and Rosenberg,S.A.** (1989). Tumor-specific cytotoxicity by lymphocytes infiltrating human melanomas. *The journal of immunology* *142*, 3714-3725.
245. **Topalian,S.L., Rivoltini,L., Mancini,M., Markus,N.R., Robbins,P.F., Kawakami,Y., and Rosenberg,S.A.** (1994). Human CD4+ T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *91*, 9461-9465.
246. **Topalian,S.L., Gonzales,M.I., Parkhurst,M., Li,Y.F., Southwood,S., Sette,A., Rosenberg,S.A., and Robbins,P.F.** (1996). Melanoma-specific CD4+ T cells recognize nonmutated HLA-DR-restricted tyrosinase epitopes. *Journal of Experimental Medicine* *183*, 1965-1971.
247. **Schendel,D.J., Gansbacher,B., Oberneder,R., Kriegmair,M., Hofstetter,A., Riethmuller,G., and Segurado,O.G.** (1993). Tumor-Specific Lysis of Human Renal-Cell Carcinomas by Tumor-Infiltrating Lymphocytes .1. Hla-A2-Restricted Recognition of Autologous and Allogeneic-Tumor Lines. *The journal of immunology* *151*, 4209-4220.
248. **Choudhary,A., Davodeau,F., Moreau,A., Peyrat,M.A., Bonneville,M., and Jotereau,F.** (1995). Selective Lysis of Autologous Tumor-Cells by Recurrent Gamma-Delta Tumor-Infiltrating Lymphocytes from Renal-Carcinoma. *The journal of immunology* *154*, 3932-3940.
249. **Brandle,D., Bresseur,F., Weynants,P., Boon,T., and VandenEynde,B.J.** (1996). A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. *The Journal of experimental medicine* *183*, 2501-2508.
250. **Zippelius,A., Bioley,G., Le Gal,F.A., Rufer,N., Brandes,M., Batard,P., De Smedt,M., Plum,J., Speiser,D.E., Cerottini,J.C., Dietrich,P.Y., Romero,P., and Pittet,M.J.** (2004). Human thymus exports naive CD8 T cells that can home to nonlymphoid tissues. *The journal of immunology* *172*, 2773-2777.
251. **Chen,G., Shankar,P., Lange,C., Valdez,H., Skolnik,P.R., Wu,L.J., Manjunath,N., and Lieberman,J.** (2001). CD8 T cells specific for human immunodeficiency virus, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus lack molecules for homing to lymphoid sites of infection. *Blood* *98*, 156-164.
252. **Caruso,A., Licenziati,S., Corulli,M., Canaris,A.D., DeFrancesco,M.A., Fiorentini,S., Peroni,L., Fallacara,F., Dima,F., Balsari,A., and Turano,A.** (1997). Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry* *27*, 71-76.
253. **Giscombe,R., Wang,X.B., Kakoulidou,M., and Lefvert,A.K.** (2006). Characterization of the expanded T-cell populations in patients with Wegener's granulomatosis. *Journal of Internal Medicine* *260*, 224-230.

254. **Wood,M.L., Gottschalk,R., and Monaco,A.P.** (1988). Effect of Blood-Transfusion on Il-2 Production. *Transplantation* 45, 930-935.
255. **Ding,L. and Shevach,E.M.** (1992). Il-10 Inhibits Mitogen-Induced T-Cell Proliferation by Selectively Inhibiting Macrophage Costimulatory Function. *The journal of immunology* 148, 3133-3139.
256. **Chitkomckown,C.G., Ruef,B.J., Riceficht,A.C., and Brown,W.C.** (1995). Interleukin-10 Down-Regulates Proliferation and Expression of Interleukin-2 Receptor P55 Chain and Interferon-Gamma, But Not Interleukin-2 Or Interleukin-4, by Parasite-Specific Helper T-Cell Clones Obtained from Cattle Chronically Infected with Babesia-Bovis Or Fasciola-Hepatica. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 15, 915-922.
257. **Maeurer,M.J., Martin,D.M., Castelli,C., Elder,E., Leder,G., Storkus,W.J., and Lotze,M.T.** (1995). Host Immune-Response in Renal-Cell Cancer - Interleukin-4 (Il-4) and Il-10 Messenger-Rna Are Frequently Detected in Freshly Collected Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *Cancer immunology, immunotherapy*41, 111-121.
258. **Wang,Q., Redovan,C., Tubbs,R., Olencki,T., Klein,E., Kudoh,S., Finke,J., and Bukowski,R.M.** (1995). Selective Cytokine Gene-Expression in Renal-Cell Carcinoma Tumor-Cells and Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *International journal of cancer*61, 780-785.
259. **Hori,S., Nomura,T., and Sakaguchi,S.** (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.
260. **Fontenot,J.D., Gavin,M.A., and Rudensky,A.Y.** (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells. *Nature Immunology* 4, 330-336.
261. **Khattari,R., Cox,T., Yasayko,S.A., and Ramsdell,F.** (2003). An essential role for Scurfin in CD4(+)/CD25(+) T regulatory cells. *Nature Immunology* 4, 337-342.
262. **Parel,Y. and Chizzolini,C.** (2004). CD4+CD8+double positive (DP) T cells in health and disease. *Autoimmunity Reviews* 3, 215-220.
263. **Colombatti,A., Doliana,R., Schiappacassi,M., Argentini,C., Tonutti,E., Feruglio,C., and Sala,P.** (1998). Age-related persistent clonal expansions of CD28(-) cells: Phenotypic and molecular TCR analysis reveals both CD4(+) and CD4(+) CD8(+) cells with identical CDR3 sequences. *Clinical Immunology and Immunopathology* 89, 61-70.
264. **Porcelli,S., Yockey,C.E., Brenner,M.B., and Balk,S.P.** (1993). Analysis of T-Cell Antigen Receptor (Tcr) Expression by Human Peripheral-Blood Cd4-8-Alpha/Beta T-Cells Demonstrates Preferential Use of Several V-Beta Genes and An Invariant Tcr Alpha-Chain. *The Journal of experimental medicine* 178, 1-16.
265. **Dellabona,P., Padovan,E., Casorati,G., Brockhaus,M., and Lanzavecchia,A.** (1994). An Invariant V-Alpha-24-J-Alpha-Q/V-Beta-11 T-Cell Receptor Is Expressed in All Individuals by Clonally Expanded Cd4-8- T-Cells. *The Journal of experimental medicine* 180, 1171-1176.
266. **Viey,E., Fromont,G., Escudier,B., Morel,Y., Da Rocha,S., Chouaib,S., and Caignard,A.** (2005). Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma. *The journal of immunology* 174, 1338-1347.
267. **Cooper,M.A., Fehniger,T.A., and Caligiuri,M.A.** (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology* 22, 633-640.

268. **Loza,M.J. and Perussia,B.** (2004). The IL-12 signature: NK cell terminal CD56(+high) stage and effector functions. *The journal of immunology* *172*, 88-96.
269. **Gati,A., Da Rocha,S., Guerra,N., Escudier,B., Moretta,A., Chouaib,S., Angevin,E., and Caignard,A.** (2004). Analysis of the natural killer mediated immune response in metastatic renal cell carcinoma patients. *International journal of cancer* *109*, 393-401.
270. **Della Chiesa M, Sivori S, Castriconi R, Marcenaro E, and Moretta A** (2005). Pathogen-induced private conversations between natural killer and dendritic cells. *Trends in Microbiology* *13*, 128-136.
271. **Khong,H.T. and Restifo,N.P.** (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nature Immunology*. 999-1005.
272. **Rosenberg,S.A. and Dudley,M.E.** (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.
273. **Janeway,C.A., Travers,P., Walport,M., and Shlomchik,M.** (2005). *Immunobiology*
274. **John E.Loligan, Ada M.Kruisbeek, David H.Margulies, Ethan M.Shevach, and G.Warren** (2004). Nomenclature and serology of HLA class I and class II alleles. *Current Protocols in Immunology* A.1S.1-A.1S.8
275. **Rosenberg,S.A.** (2001). Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 380-384.
276. **Rosenberg,S.A., Yang,J.C., Schwartzentruber,D.J., Hwu,P., Marincola,F.M., Topalian,S.L., Restifo,N.P., Dudley,M.E., Schwarz,S.L., Spiess,P.J., Wunderlich,J.R., Parkhurst,M.R., Kawakami,Y., Seipp,C.A., Einhorn,J.H., and White,D.E.** (1998). Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nature medicine* *4*, 321-327.
277. **Rosenberg,S.A., Yang,J.C., and Restifo,N.P.** (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nature Medicine* *10*, 909-915.
278. **Dudley,M.E., Wunderlich,J., Nishimura,M.I., Yu,D., Yang,J.C., Topalian,S.L., Schwartzentruber,D.J., Hwu,P., Marincola,F.M., Sherry,R., Leitman,S.F., and Rosenberg,S.A.** (2001). Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Journal of Immunotherapy* *24*, 363-373.
279. **Zhou,J.H., Dudley,M.E., Rosenberg,S.A., and Robbins,P.F.** (2005). Persistence of multiple tumor-specific T-Cell clones is associated with complete tumor regression in a melanoma patient receiving adoptive cell transfer therapy. *Journal of Immunotherapy* *28*, 53-62.
280. **Gattinoni,L., Finkelstein,S.E., Klebanoff,C.A., Antony,P.A., Palmer,D.C., Spiess,P.J., Hwang,L.N., Yu,Z.Y., Wrzesinski,C., Heimann,D.M., Surh,C.D., Rosenberg,S.A., and Restifo,N.P.** (2005). Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8(+) T cells. *The Journal of experimental medicine* *202*, 907-912.
281. **Klebanoff,C.A., Khong,H.T., Antony,P.A., Palmer,D.C., and Restifo,N.P.** (2005). Sinks, suppressors and antigen presenters: how lymphodepletion enhances T cell-mediated tumor immunotherapy. *Trends in Immunology* *26*, 111-117.

282. **Powell,D.J., Dudley,M.E., Hogan,K.A., Wunderlich,J.R., and Rosenberg,S.A.** (2006). Adoptive transfer of vaccine-induced peripheral blood mononuclear cells to patients with metastatic melanoma following lymphodepletion. *The journal of immunology* *177*, 6527-6539.
283. **Pardoll,D.M. and Topalian,S.L.** (1998). The role of CD4(+) T cell responses in antitumor immunity. *Current Opinion in Immunology* *10*, 588-594.
284. **Toes,R.E.M., Ossendorp,F., Offringa,R., and Melief,C.J.M.** (1999). CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *The Journal of experimental medicine* *189*, 753-756.
285. **Wang,R.F.** (2001). The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity. *Trends in immunology* 269-276.
286. **Janssen,E.M., Lemmens,E.E., Wolfe,T., Christen,U., von Herrath,M.G., and Schoenberger,S.P.** (2003). CD4(+) T cells are required for secondary expansion and memory in CD8(+) T lymphocytes. *Nature* *421*, 852-856.
287. **Sun,J.C. and Bevan,M.J.** (2003). Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* *300*, 339-342.
288. **Shedlock,D.J. and Shen,H.** (2003). Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* *300*, 337-339.
289. **Alegre,M.L., Frauwirth,K.A., and Thompson,C.B.** (2001). T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nature Reviews Immunology* *1*, 220-228.
290. **Salomon,B. and Bluestone,J.A.** (2001). Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annual Review of Immunology* *19*, 225-252.
291. **Chambers,C.A., Kuhns,M.S., Egen,J.G., and Allison,J.P.** (2001). CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: Mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annual Review of Immunology* *19*, 565-594.
292. **Carreno,B.M. and Collins,M.** (2002). The B7 family of ligands and its receptors: New pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annual Review of Immunology* *20*, 29-53.

