

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2009

Thèse n°

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences Biologiques et Médicales

Option : Biologie-Santé

Présentée et soutenue publiquement

Le 18 décembre 2009

Par Christel Devaud

Né(e) le 13 novembre 1983 à Toulouse

Etude *in vivo* du potentiel anti-tumoral des lymphocytes T $\gamma\delta$ V δ 2 négatifs humains dans un modèle murin

Membres du Jury

Pr Théo BALTZ, Directeur de Recherche, CNRS,.....Président
Dr Jean-Jacques FOURNIE, Directeur de Recherche, INSERMRapporteur
Pr Franck PAGES, PU-PH, Université Paris Descartes.....Rapporteur
Pr Michel COGNE, PU-PH, Université de LimogesExaminateur
Dr Myriam CAPONE, Chargé de Recherche, CNRSDirectrice de thèse

A ma famille

A mes parents

A mes frères

A Thomas

A Cheche, l'ami, le pote, le cousin...

La science est une chose merveilleuse...tant qu'il ne faut pas en vivre
Albert Einstein. 1879-1955

Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur Théo Baltz pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

J'exprime également mes sincères remerciements envers le Docteur Jean Jacques Fournié et le Professeur Franck Pagès pour avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Je remercie le Professeur Michel Cogné pour avoir accepté d'être membre du jury mais aussi pour son soutien précieux et celui de ces collaborateurs au moment des pénuries de souris à Bordeaux.

Je remercie le Docteur Myriam Capone, ma directrice de thèse, pour avoir cru en cette petite étudiante motivée le jour où elle s'est présentée pour son stage de MASTER 2 il y a 4 ans. Merci à toi pour m'avoir accordé ta confiance, pour avoir encadré mon travail. Merci d'avoir toujours fait ton maximum pour me valoriser. Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ta patience. Je n'oublierai pas ton franc parlé et ta droiture admirable qui resteront pour moi les traits de ta personnalité les plus marquants.

Je remercie également le Docteur Julie Déchanet-Merville pour m'avoir intégré au sein de son équipe. Merci Julie pour l'aide compétente que tu m'as apportée. Je tiens à t'exprimer ma reconnaissance pour tes encouragements et ton soutien, pour nos discussions et tes nombreux conseils. Merci d'avoir su apporter un œil critique sur mon travail qui m'a aidé à franchir les obstacles.

Je tiens à exprimer ma gratitude au Professeur Jean-François Moreau. Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire. Merci pour toutes ces discussions, pour m'avoir fait profiter de vos connaissances dans de nombreux domaines scientifiques, pour vos conseils avisés sur ma thèse, sur mon post doc, pour m'avoir toujours soutenue. Merci pour votre humour, votre bonne humeur et votre grande capacité d'écoute. Votre aide m'a toujours été, vous le savez, très précieuse.

♦ Je remercie toutes les personnes qui ont apporté leur aide pour le déroulement de mon projet de thèse :

Un grand merci tous les membres des animaleries de Bordeaux 2 pour leur aide, Pierre, Benoit et les autres. Merci aussi à Raphaël à l'animalerie de Bordeaux 1 pour sa gentillesse et son assistance lors des problèmes de contaminations des souris.

Merci à Franck Couillaud pour ses conseils et son aide qui ont permis d'initier le projet d'imagerie *in vivo* qui me tenait à cœur.

Merci à toutes celles et ceux qui à un moment donné, ont pris un peu de leur temps pour répondre à mes questions, pour m'apporter leur aide.

♦ Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à tous les membres de l'UMR 5164 qui ont, chacun, imprégnés ma thèse à leur manière. Parce qu'une thèse prend aussi toute sa richesse et son sens dans l'entraide...

Aux anciens :

Un merci à ma Gege, ma gestionnaire préférée, merci pour ton soutien et ton aide, pour ces moments de psychanalyse durant lesquels j'étais assise sur un tabouret à côté de ton bureau.

A Franck, merci tes conseils et ta disponibilité

A Marina, pour ta gentillesse et ta patience avec les souris !

Aux étudiants qui m'ont marqué lors de leur passage : Jérémy, Julien, Pierre, Séverine M, Christelle, Gwendaline, Karine, merci pour votre bonne humeur.

Aux actuels :

A la « July » *team*:

A Lionel pour tes conseils et ta devise de ne jamais baisser les bras!

A Vincent pour ton aide et ta patience (sans limite...!)

Mais aussi aux autres: Sonia, Omar, Thomas, Xavier...pour votre assistance et votre gentillesse.

A la « leguember » *team*:

A Patrick L pour ta grande compréhension de la gente féminine

A Sophie pour ta gentillesse et ta disponibilité et tous les autres Mini P, Walid, Benjamin, Anna...

A Charlotte, pour nos discussions, pour ton aide précieuse à plusieurs reprises. Je te suis très reconnaissante pour ton soutien pour le concours de l'Ecole doctorale.

A Jean-Luc, Patrick B pour vos suggestions scientifiques qui m'ont plusieurs fois permis d'avancer.

A Aurélie pour nos moments musicaux et chocolats quand tout le monde était en vacances.

A Christophe, Isabelle, Norbert, Florence, Aurélie pour leur gentillesse

Un clin d'œil à la *team* « rez de chaussé »: Xavier, Amélie, Arnaud, Vincent Praloran, Véronique, Hélène, François...

Enfin j'exprime ma sincère gratitude à ceux qui, de collègues sont devenus bien plus à mes yeux...

Un merci à mon bien-aimé expatrié Dada, pour tout ce que nous avons partagé quand tu étais au laboratoire, pour nos fous-rires, nos joies, nos larmes, merci pour nos moments de craquages, merci pour ton soutien, merci par ta sensibilité et tes compliments quotidiens et merci pour tous les moments de bonheurs passés hors du labo. Les journées furent bien tristes après ton départ où Christel s'est retrouvée sans « son Dada »...mais tu as toujours la même place pour moi...

Un immense merci à ma Séverine...comment te l'écrire avec des mots. Merci du fond du cœur d'avoir toujours été là, merci de m'avoir épongé, conseillé, pondéré, soutenu, réconforté, merci d'avoir été à mon écoute et m'avoir laissé poser ma tête sur ton épaule dans les moments difficiles. Tu as été mon pilier au labo et bien au-delà tu le sais... Merci de m'avoir supporté et canalisé dans mes moments les plus forts de rebellions, quand l'ouragan envahissait le box 4 du P2 !!! Merci pour tous ces moments partagés, pour m'avoir confié *mimichat*. Merci Séverine pour ton amitié sans faille...

Un merci à ma Giulia, pour nos discussions et nos sessions tardives à vider nos sacs. Merci d'avoir toujours su trouver les mots justes avec moi. Merci pour ton admirable personnalité. Merci pour ta douceur et ta patience sur lesquelles j'essaye encore de prendre exemple. Merci pour ton attachant accent italien et tes si charmantes fautes de français qui rayonnaient dans mes journées. Si j'avais plus de place j'écrirai un *Crepi l'avarizia* ! Et c'est certain qu'envers toi...je ne serais pas avare de compliments.

♦ **Je tiens à adresser ma profonde gratitude à tout mon entourage, qui me permet d'avancer tous les jours.** Parce qu'il y a une vie à côté d'une thèse...

A mes relectrices favorites : Carole et Emilie. Merci beaucoup les filles pour votre soutien et pour avoir eu le courage de vous retrousser les manches et de vous plonger dans mes fautes d'orthographe.

Aux amies fidèles rencontrées sur les bancs de la fac : A Anne-Marie, merci pour tous ses moments partagés ensemble et qui m'ont tant manqués ces derniers mois. Je me rattrape bientôt c'est promis ! Merci pour cette amitié qui m'est très chère. A Habiba et ta force de caractère. A Camille mon expatrié bruxelloise.

A ceux avec qui ma « fabuleuse histoire Université » est née : A mes chouchous avec qui je partage tant Delphine et Yannou et tous les autres...

Aux compatriotes thésards; à Marion la californienne

Aux naïfs de la merveilleuse vie du laboratoire, qui m'ont tous permis d'avancer à leur façon :

Aux boxeurs, pour tous ces moments exutoires qui m'ont permis de tenir: Sosso et David, JM, Philippe, Rekha et tous ceux qui ont échangés bien plus que des coups de gants avec moi.

A ma 2^{ème} famille avec qui j'ai tant partagé : A toi, Ronan, « cheche », à ta mémoire, j'aurai tant aimé que tu sois toujours parmi nous et qu'on partage ce moment avec tous les autres. Mes pensées vont vers toi quand une nouvelle page va se tourner. A tous les autres, Vio, Alex, Gougou, Gaëlle, Marine, Clopof, Faf, Luciole, Pactos, Steven, Yannick, Pierre parce que sans vous tous, j'aurais sans doute baissé les bras quand la douleur prenait le dessus, parce que votre soutien et votre amitié sont et resteront un moteur essentiel pour moi. Marine, poussin, nos petites pauses café, pendant ma rédaction, m'auront plus d'une fois redonnées le sourire!

A Thomas, parce que mon bien être ne serait pas possible sans toi...Merci pour ton soutien, ta patience, ton réconfort, durant cette thèse et bien avant. Tu as goûté, malgré toi, aux joies de la rédaction et je n'ai pas pris le temps de t'exprimer toute ma gratitude, pendant l'écriture du manuscrit. Mais tu sais que si j'avais dû te remercier à la hauteur de ce que tu m'as apporté...je n'aurais pas eu assez de temps pour me plaindre !

A toute ma famille...parce que « les mots manquent aux émotions »

A mes grands parents qui ont toujours cru en moi.

A Olivier et Cédric, mes frères, mes champions, merci d'avoir toujours été là, de m'avoir remontée dans les moments difficiles et de m'avoir supporté au quotidien.

Enfin, d'une thèse à une autre ...à mes parents, qui les premiers ont posé mon berceau sur les bancs d'un amphi. Merci à vous pour votre force qui m'a toujours fait avancer. Merci à vous pour vos sacrifices, votre écoute, votre sagesse...votre soutien sans faille vous fait sans aucun doute « passer » une deuxième thèse avec moi et je vous en serais toujours reconnaissante.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS.....	11
INTRODUCTION.....	16
A.LE CANCER.....	16
1.Généralités	16
1.1. Nature de la maladie.....	16
1.2. Les caractéristiques (<i>Hallmarks</i>) des cellules tumorales	16
1.3. Progression tumorale.....	17
a. <i>Etapas de la progression tumorale</i>	17
b. <i>Modèles de progression tumorale</i>	18
■ Le modèle de progression linéaire (figure 3a).....	18
■ Le modèle de progression parallèle (figure 3b).....	18
c. <i>Mécanismes de la progression tumorale</i>	19
d. <i>Spécificité des sites envahis</i>	20
1.4. Cancer du côlon.....	20
a. <i>Généralités</i>	20
b. <i>Origine des tumeurs coliques</i>	21
■ Origine génétique.....	21
■ Cellules souches tumorales coliques (CSC)	21
c. <i>Progression des tumeurs coliques</i>	21
2.Immunité et cancers	22
2.1. Immunosurveillance des cancers.....	22
a. <i>Preuves d'une immunosurveillance anti-tumorale chez la souris</i>	22
■ Développement de tumeurs spontanées chez des souris immunodéficientes	23
■ Induction de tumeurs par des carcinogènes chez des souris immunodéficientes	23
b. <i>Données chez l'homme montrant une immunosurveillance anti-tumorale</i>	24
2.2. <i>Immunoediting</i> des tumeurs	25
a. <i>Elimination tumorale</i>	25
b. <i>Phase d'équilibre entre les tumeurs et le système immunitaire</i>	27
■ Observations cliniques	27
■ Modelage par le système immunitaire	27
c. <i>Echappement tumoral</i>	28
■ Absence de signaux de danger pour le système immunitaire	28
■ Suppression de la réponse immunitaire dérivant des tumeurs et de leur microenvironnement.....	28
3.Les thérapies du cancer	29
3.1. Thérapies conventionnelles	29
3.2. Immunothérapies.....	30
a. <i>Immunothérapies via le système immunitaire inné</i>	30
b. <i>Immunothérapie à base d'anticorps (Ac) monoclonaux</i>	30
c. <i>Transfert adoptif de lymphocytes T</i>	31
d. <i>Thérapie du cancer colorectal</i>	32
B. LYMPHOCYTES T GAMMA DELTA ($\gamma\delta$) HUMAINS	33
1.Les Populations de Lymphocytes T $\gamma\delta$	33
1.1. Le Récepteur des cellules T $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$).....	33

a.	<i>Organisation génétique</i>	33
b.	<i>Structure des chaînes</i>	35
c.	<i>Variabilité</i>	35
1.2.	Répartition dans l'organisme	36
a.	<i>Généralités</i>	36
b.	<i>Les lymphocytes T Vγ9Vδ2</i>	36
■	Dans la circulation sanguine	36
■	Dans les organes lymphoïdes secondaires	36
■	Dans le thymus postnatal	36
■	Dans le foie	37
c.	<i>Les lymphocytes T Vδ2^{neg}</i>	37
■	Dans l'épithélium intestinal	37
■	Au niveau de la peau.....	37
■	Dans le thymus postnatal	37
■	Dans la rate	37
2.	Fonctions des lymphocytes T $\gamma\delta$	38
2.1	La reconnaissance de ligands spécifiques	38
a.	<i>Généralités</i>	38
b.	<i>Ligands des lymphocytes T Vγ9Vδ2 (figure 9)</i>	39
■	Les phosphoantigènes	39
■	Le complexe Apolipoprotéine A1 (ApoA1) / Adénosine triphosphate Synthase (AS)	39
■	Les Heat Shock Protein (HSP).....	40
■	Superantigène.....	40
c.	<i>Ligands des lymphocytes T Vδ2^{neg}</i>	40
■	MICA/MICB.....	40
■	Molécules CD1	41
■	Autres ligands	41
2.2.	Rôle des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans diverses pathologies.....	41
a.	<i>Rôle des lymphocytes T Vγ9Vδ2</i>	42
b.	<i>Rôle des lymphocytes T Vδ2^{neg}</i>	42
■	Implication dans les maladies auto-immunes et inflammatoires	42
v	Arthrite.....	42
v	Maladies inflammatoires de l'intestin	43
v	Sclérodémie ou sclérose systémique	43
■	Dans les infections	43
v	Infections virales.....	43
v	Infections bactériennes et parasitaires	44
■	Dans la réparation tissulaire.....	44
2.3.	Fonctions effectrices des lymphocytes T $\gamma\delta$	44
a.	<i>Sécrétion de cytokines (figure 9)</i>	44
b.	<i>Activité cytotoxique</i>	45
c.	<i>Rôle initiateur et régulateur dans la réponse immunitaire par des interactions avec d'autres acteurs du système immunitaire</i>	46
3.	Migration des lymphocytes T $\gamma\delta$	46
3.1.	Généralités.....	46
a.	<i>Le phénomène de migration des lymphocytes</i>	46
b.	<i>Le système chimiokines / récepteurs à chimiokines</i>	47
■	Chimiokines	48
■	Récepteurs à chimiokines	48

3.2.	Les lymphocytes T $\gamma\delta$ et le système chimiokines/récepteurs à chimiokines	49
a.	<i>Expression de différents récepteurs (figure 9)</i>	49
■	Les sous-populations T V γ 9V δ 2.....	50
■	Les sous-populations V δ 2 ^{neg}	50
■	Modulation de l'expression des récepteurs.....	51
■	Cas du CCR7 (fixe ELC et SLC).....	51
b.	<i>Sécrétion de chimiokines par les lymphocytes T $\gamma\delta$</i>	52
3.3.	Les chimiokines et leurs récepteurs impliqués dans les cancers.....	52
a.	<i>Les chimiokines et leurs récepteurs impliqués dans la tumorigénèse</i>	53
■	Lors de la croissance tumorale.....	53
■	Lors de l'angiogénèse	53
b.	<i>Les chimiokines et leurs récepteurs impliqués dans les métastases</i>	53
c.	<i>Infiltration des tumeurs par des cellules du système immunitaire</i>	54
d.	<i>Localisation des lymphocytes T $\gamma\delta$ sur un site tumoral</i>	55
■	Les lymphocytes T V γ 9V δ 2	55
■	Les lymphocytes T V δ 2 ^{neg}	55
C. IMPLICATION DES LYMPHOCYTES T GAMMA DELTA DANS LES CANCERS		56
.....		56
1. Données impliquant les lymphocytes T $\gamma\delta$ dans la surveillance anti-tumorale		56
1.1	Données chez la souris	56
a.	<i>Modèle murin/murin démontrant l'importance des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans la surveillance et la réponse anti-tumorale</i>	56
■	Les travaux de Girardi M et son équipe.....	56
■	Autres travaux dans le modèle murin/murin impliquant les lymphocytes T $\gamma\delta$ dans la surveillance anti-tumorale	57
b.	<i>Modèles chimériques de transfert adoptif de cellules humaines dans des souris immunodéficientes : xénogreffe</i>	57
■	Cas des hémopathies malignes	57
■	Cas des tumeurs solides	58
1.2.	Données chez l'homme	58
a.	<i>Infiltrations tumorales par des lymphocytes T $\gamma\delta$</i>	58
■	Infiltration de tumeurs rénales :	59
■	Infiltration d'autres tumeurs solides	59
b.	<i>Expansion périphérique des lymphocytes T $\gamma\delta$</i>	59
c.	<i>Corrélation positive entre l'expansion de lymphocytes T $\gamma\delta$ et le cancer</i>	60
■	Dans la survie des patients.....	60
■	Dans la survenue des cancers.....	60
2. Fonctions des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans les cancers		60
2.1	Cytotoxicité des lymphocytes T $\gamma\delta$ vis-à-vis de cellules tumorales <i>in vitro</i>	61
a.	<i>Les lymphocytes T Vγ9Vδ2</i>	61
■	Cytotoxiques vis-à-vis de cellules tumorales d'origine hématopoïétique	61
■	Cytotoxiques vis-à-vis de cellules tumorales épithéliales	61
b.	<i>Les lymphocytes T Vδ2^{neg}</i>	61
■	Cytotoxiques vis-à-vis de cellules tumorales épithéliales	62
■	Cytotoxiques vis-à-vis de cellules tumorales d'origine hématopoïétique	62
2.2.	Reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T $\gamma\delta$	62
a.	<i>Reconnaissance via le TCR $\gamma\delta$ (figure 14)</i>	62
■	TCR et ses ligands tumoraux pour les lymphocytes T V δ 2 ⁺	63
■	TCR et ses ligands tumoraux pour les lymphocytes T V δ 2 ^{neg}	63

b. Reconnaissance via NKG2D (figure 14).....	64
■ NKG2D exprimé sur les lymphocytes T V γ 9V δ 2	64
■ NKG2D exprimé sur les lymphocytes T V δ 2 ^{neg}	65
2.3. Rôle immunosuppresseur des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans les tumeurs.....	65
2.4 Spécificité tumorale.....	66
3. Immunothérapies anti-cancer basées sur les lymphocytes T $\gamma\delta$	66
3.1 Molécules utilisées pour stimuler les lymphocytes T $\gamma\delta$ dans les immunothérapies	67
a. Utilisation des phosphoantigènes synthétiques.....	67
b. Utilisation des amino-bisphosphonates (N-BP).....	68
c. Nécessité de l'IL2.....	69
3.2. Protocoles d'immunothérapies anti-cancer utilisant la stimulation <i>ex vivo</i> et le transfert adoptif de cellules T $\gamma\delta$	70
a. Utilisation des phosphoantigènes synthétiques pour les stimulations <i>ex vivo</i>	70
b. Utilisation des amino-bisphosphonates (N-BP) pour les stimulations <i>ex vivo</i>	70
3.3. Protocoles d'immunothérapies anti-cancer utilisant des activations <i>in vivo</i> de cellules T $\gamma\delta$	70
a. Utilisation des phosphoantigènes synthétiques pour les stimulations <i>in vivo</i>	71
b. Utilisation des NBP pour les stimulations <i>in vivo</i>	71
3.4. Limites des immunothérapies utilisant des lymphocytes T $\gamma\delta$	71
3.5. Optimisation des thérapies anti-cancer à lymphocytes T $\gamma\delta$	72
a. L'ajout de cytokines	72
b. La combinaison des transferts adoptifs de lymphocytes T $\gamma\delta$ avec des traitements par N-BP	72
c. La combinaison avec de la chimiothérapie.....	73
d. La combinaison avec des Ac monoclonaux.....	73
Contexte de travail	74
I.1^{ère} partie du projet : ETUDE DE LA REACTIVITE ANTITUMORALE DE LYMPHOCYTES T $\gamma\delta$, SPECIFIQUE DE CELLULES INFECTEES PAR LE CMV, DANS UN MODELE MURIN DE XENOGREFFE	77
1.Objectifs de l'étude.....	77
2.Méthodologies	78
Article 1:.....	82
Conclusions de l'article 1	83
II.2^{ème} partie du projet : ETUDE DU POTENTIEL ANTI-METASTATIQUE DE LYMPHOCYTES T $\gamma\delta$ HUMAINS DANS UN MODELE ORTHOTOPIQUE DE CARCINOME COLIQUE	87
1.Objectifs de l'étude.....	87
2.Méthodologies	88
Article 2:.....	92
Conclusion et Discussion de l'article 2	115
CONCLUSION GENERALE	122
ANNEXES.....	162

ABREVIATIONS

Aa :	Acide aminé
Ac :	Anticorps
ADCC :	Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
Ag :	Antigène
AICD :	Activation de mort cellulaire induite
APC :	Cellules Présentatrices d'Antigène
Apo A1 :	Apolipoprotéine A1
AS :	Adénosine triphosphate synthase
BCA-1 :	B-Cell-attracting chemokine-1
BLI:	Bioluminescence
BRAK :	Breast and kidney expressed chemokine
BrHPP :	Bromohydrine pyrophosphate
C :	Constant
CCD :	Charge-coupled device
CC-IC :	Cellules initiatrices de cancer coliques
CD :	Cluster of Differentiation
CDR :	Complementary-Determining Region
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV :	Cytomégalovirus
CSC :	Cellules souches du cancer
CT :	Centre tumoral
CTAC :	Cutaneous T-cell attracting chemokine
CTGF :	Facteur de croissance du tissu conjonctif
Cys :	Cystéine
D :	Diversité
DARC :	Duffy antigen chemokine receptor
DC :	Cellules Dendritiques
DC-CK1 :	DC-chemokine
DETC :	Cellules T Dendritique Epidermique
DMAPP :	Diméthylallylpyrophosphate
DMBA :	7,12-di-méthylbenz [a]-anthracène
EBV :	Epstein-Bar-Virus
EGF:	Epidermal growth factor
ELC :	EB/1 ligand chemokine
ENA-78 :	Epithelial-neutrophile activating peptide-78
FGF :	Facteur de croissance des fibroblastes
FPPS :	Farnesyl pyrophosphate synthétase
GCP-2 :	Granulocyte chemotactic protein-2
GM-CSF :	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GRO :	Growth-related oncogen
GVH :	Graft-versus-host
HCC-1 :	Human CC chemokine-1
HCV :	Virus de l'Hépatite C
HER :	Human Epidermal Receptor
HHV :	Virus Herpès Humain
HMB-PP :	4-hydroxy-3-méthyl-but-2-ényl pyrophosphate
HMGB1:	High Mobility Group Box 1
HSV :	Herpes simplex virus
IDO :	Indoléamine 2,3-dioxygénase

IEL :	Lymphocytes Intra Epithéiaux
Ig :	Immunoglobuline
IL :	Interleukine
IFN :	Interféron
i.p :	Intrapéritonéal
IP10 :	Inductible protein 10
IPP :	IsoPentenyl Pyrophosphate
I-TAC :	Interferon inductible T cell α chemoattractant
i.v :	Intraveineux
J :	Jonction
LARC :	Liver and activation-regulated chemokine
LI :	Infiltration lymphatique
LL :	Leucémie lymphoblastique
LN :	Lymph Node
Luc :	Luciférase
MAP :	Mitogen-activated protein
MCA :	Méthylcholantrène
MCP :	Monocyte chemoattractant protein
MDC :	Monocyte-derived chemokine
MEC :	Mucosae-associated epithelial chemokine
MI :	Marge invasive
MIC :	MHC class I Chain related protein
Mig :	Monokine induced by IFN- γ
MIP :	Macrophage inflammatory protein
NAP-2 :	Neutrophil-activating peptide-2
N-BP :	Amino-bisphosphonates
ND :	Not determined
NK :	Natural Killer
ORF :	Open reading frame
PBL:	Peripheral blood lymphocytes
PBMC :	Peripheral blood mononuclear cell
PDGF :	Platelet derived growth factor
PHA :	Phytohémaglutinine
PI:	Invasion périneurale
PI3K :	Phosphatidylinositol 3-kinase
PMA :	Phorbol Myristate Acetate
PTX :	Toxine pertussique
RAG :	Recombinaison activating gene
Reg :	Régulateur
s.c :	sous-cutané
SCID :	Severe Combined Immunodeficiency
SDF-1 :	Stroma cell-derived factor-1
SEA :	Staphylococcal Enterotoxin A.
SLC :	Secondary Lymphoid Tissue Chemokine
SOI:	Surgical orthotopic implantation
TAM :	Macrophage associé aux tumeurs
TARC :	Thymus and activation-regulated chemokine
TPA :	12-O-tétradecanoyl-phorbol-13-acétate
TCR :	T Cell Receptor
TECK :	Thymus-expressed chemokine
TEMRA :	Cellule T effecteur-mémoire récemment-activée
TGF β :	Tumor necrosis factor

TILs :	Lymphocytes infiltrant les tumeurs
TLR:	Toll like récepteur
TNF :	Tumor Necrosis Factor
Tr :	T regulatory
TRAIL :	TNF related apoptosis inducing ligand
TRAMP :	Transgénique pour l'adénocarcinome de prostate murin
ROI:	Région d'intérêt
ULBP :	UL16 bindin protein
V :	Variable
VE :	Embolie vasculaire
VIH :	Virus de l'Immunodéficience Humaine

RESUME

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ seraient des effecteurs essentiels dans la réponse immunitaire aux stress induits notamment par les infections et la tumorigénèse. Plusieurs arguments dont leur localisation intra-épithéliale mais aussi leurs capacités effectrices multiples et rapides les caractérisent comme des acteurs primordiaux dans l'immunité anti-tumorale. Mon projet de thèse consistait à examiner le potentiel anti-tumoral des lymphocytes T $\gamma\delta$ humains, V δ 2 négatifs (^{neg}), dans un contexte *in vivo*, grâce à l'utilisation d'un modèle murin.

Des études antérieures menées au laboratoire démontraient une expansion de lymphocytes T V δ 2^{neg} dans la circulation sanguine de transplantés rénaux développant une infection à cytomégalovirus (CMV). Des clones T V δ 2^{neg}, isolés de ces patients, présentaient une forte réactivité *in vitro* contre des cellules infectées par le CMV mais aussi contre des cellules tumorales notamment d'origine colique (comme la lignée HT29). Un ligand commun induit par l'infection à CMV et la transformation tumorale, reconnu par les clones T V δ 2^{neg} serait à l'origine de cette double réactivité. La première partie de mon projet s'est concentrée sur l'étude du potentiel anti-tumoral de ces clones T V δ 2^{neg} *in vivo*, qui comprenait leur capacité à atteindre des cellules tumorales d'origines coliques (HT29) et à les lyser. Dans un modèle de xénogreffe dans des souris immunodéficientes, nous avons démontré que les clones TV δ 2^{neg}, injectés dans le péritoine (i.p) pouvaient retarder la croissance de tumeurs solides HT29 sous-cutanées. D'après nos résultats, cette inhibition du développement tumoral proviendrait d'une action précoce et spécifique des cellules T V δ 2^{neg} et impliquerait le récepteur à chimiokines CCR3. Nos données suggèrent donc que des lymphocytes T V δ 2^{neg}, réactifs contre le CMV, pourraient migrer *in vivo* jusqu'au site d'injection des cellules tumorales et inhiber la croissance de la tumeur probablement grâce à leur activité cytolytique.

La deuxième partie de mon projet de thèse proposait d'approfondir l'étude du rôle des lymphocytes T V δ 2^{neg} contre les tumeurs coliques. Ainsi nous avons testé, *in vivo*, l'implication de lymphocytes T V δ 1⁺ humains, une population représentative des épithéliums intestinaux, dans le cancer métastatique colorectal (CMC). Nous avons développé un modèle d'implantation orthotopique de cellules tumorales HT29 dans des souris immunodéficientes, qui mime le développement du CMC chez l'homme. Des tumeurs primaires intra-caecales et des métastases pulmonaires et hépatiques se développent chez les souris. De plus, nous avons pu suivre leurs croissances grâce à l'introduction de la luciférase dans les cellules HT29 et à une technique d'imagerie *in vivo* en bioluminescence. Nos résultats montrent qu'un traitement continu des souris par des injections de lignée T V δ 1⁺ en i.p inhibe le développement des tumeurs primaires et retarde l'apparition des métastases à distance. Ces données soutiennent l'implication des lymphocytes T V δ 2^{neg} dans le contrôle des CMC. De façon intéressante, elles mettent en avant une implication anti-métastatique des cellules T V δ 2^{neg}.

L'ensemble de nos travaux souligne le rôle des cellules T V δ 2^{neg} dans la réponse immunitaire contre les cancers colorectaux et étaye leur potentiel d'action lors de la progression des tumeurs vers des métastases, ouvrant ainsi des perspectives pour l'utilisation de ces cellules dans les thérapies des CMC.

Introduction

INTRODUCTION

A. LE CANCER

1. Généralités

1.1. Nature de la maladie

Le cancer est une des causes majeures de décès dans le monde à l'origine de 7,4 millions de décès en 2004, soit 13% de la mortalité mondiale (chiffre OMS, révisé en février 2009).

Cette maladie complexe, affecte tous les tissus de l'organisme. Elle se développe suite à l'accumulation de plusieurs altérations de l'ADN (Bishop 1991) sous l'effet de divers facteurs (génétiques héréditaires, chimiques, physiques, biologiques et alimentaires) qui provoquent la transformation des cellules (tumorigénèse) et la progression de la maladie. Actuellement, environ 350 gènes sont répertoriés comme pouvant être impliqués dans un cancer humain (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census/>). Aujourd'hui, il est connu qu'en plus des altérations diverses au niveau de ces gènes (délétion, translocation...) peuvent s'ajouter, dans le processus de transformation cellulaire, des variations supplémentaires épigénétiques (comme des méthylations de l'ADN...) (Yoo and Jones 2006).

On peut noter qu'il semblerait qu'au sein d'une tumeur, certaines cellules, possèdent des propriétés des cellules souches (de renouvellement et de différenciation). Elles pourraient initier un développement tumoral (Kelly, Dakic et al. 2007) et maintenir continuellement la tumorigénèse. En effet, en 1994, l'équipe de Dick J mettait en évidence, au sein des myélomes dans un modèle murin, l'existence des cellules initiatrices de cancers (Lapidot, Sirard et al. 1994). Plus tard lors d'observations de différentes sortes de tumeurs solides chez des patients, ces cellules souches de cancer (CSC) ont été mises en évidence au sein de carcinomes de sein (Al-Hajj, Wicha et al. 2003) et de tumeurs cérébrales (Singh, Hawkins et al. 2004). Il semblerait que les tumeurs solides soient constituées de proportions variables de ces CSC en fonction des patients (Quintana, Shackleton et al. 2008).

1.2. Les caractéristiques (*Hallmarks*) des cellules tumorales

Avec du recul sur toutes les observations de cancers faites chez l'homme et dans des modèles animaux, il est possible de comparer le processus de développement tumoral au processus Darwinien de l'évolution. Durant celui-ci, une succession de changements génétiques, provoque l'acquisition d'un certain nombre de caractères propres à définir l'état « malin », pouvant conférer ou non un avantage pour la croissance. Ces caractères vont amener à la conversion progressive de cellules humaines normales en cellules cancéreuses (Foulds 1954; Nowell 1976).

En 2000, Hanahan D. et Weinberg R.A. ont proposé une caractérisation de la cellule cancéreuse selon 6 altérations principales essentielles à la physiologie d'une cellule normale qui dirigent la croissance tumorale (Hanahan and Weinberg 2000). Ces caractéristiques de la cellule cancéreuse sont résumées sur la figure 1.

Sont autonomes pour les signaux de croissance

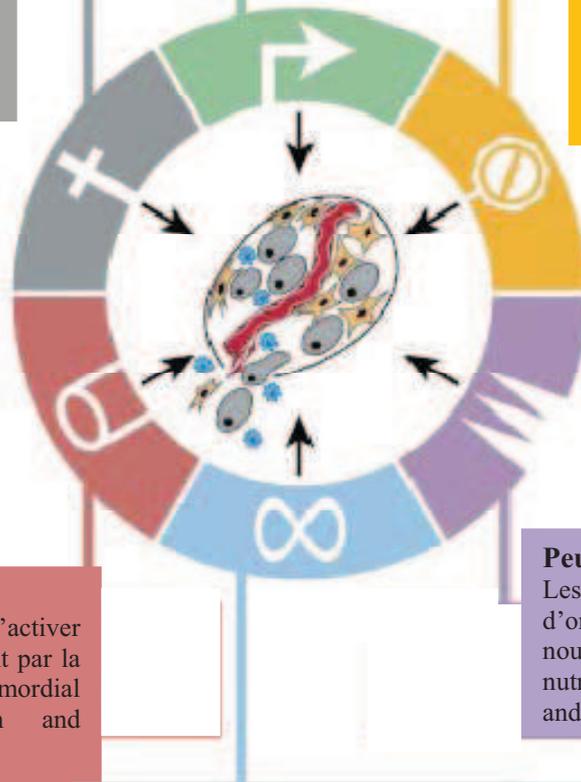
Les cellules tumorales ne dépendent pas de signaux extérieurs pour proliférer. Elles peuvent stimuler de manière autocrine leur croissance en relarguant des facteurs comme PDGF ou TGF β et en exprimant des récepteurs adaptés (Daughaday and Deuel 1991).

S'évadent de l'apoptose

Les cellules tumorales sont reconnues capables de résister aux mécanismes d'apoptose (ex : par l'intermédiaire des protéines membre de la famille Bcl-2) (Strasser, Harris et al. 1990; McDonnell and Korsmeyer 1991).

Sont insensibles aux signaux d'arrêt de croissance

Les cellules cancéreuses ont la capacité de perturber certaines voies, (comme la voie des protéines du rétinoblastome (pRb)), qui régulent les signaux anti-prolifératifs (Fyfan and Reiss 1993), en agissant notamment sur leurs récepteurs au TGF β (Markowitz, Wang et al. 1995).



Soutiennent l'angiogénèse

Les tumeurs seraient capables d'activer leur propre angiogénèse notamment par la production du VEGF (facteur primordial pour l'angiogénèse) (Hanahan and Folkman 1996).

Peuvent envahir les tissus et métastaser

Les cellules tumorales peuvent envahir leur tissu d'origine, puis s'en échapper pour aller coloniser un nouveau site dans l'organisme, où initialement les nutriments et l'espace ne sont pas limités (Christofori and Semb 1999).

Ont un potentiel répliatif illimité

Les cellules tumorales semblent être immortalisées et pouvoir se répliquer en continu (Wyllie, Kerr et al. 1980) notamment en up-régulant l'expression de l'enzyme télomérase qui leur permet de maintenir la taille de leur chromosomes (Bryan and Cech 1999).

Figure 1 : Les caractéristiques des cellules tumorales. Inspiré de (Hanahan and Weinberg 2000).

1.3. Progression tumorale

a. Etapes de la progression tumorale

La progression d'une tumeur a été décrite comme un processus à étapes multiples dans lequel des cellules malignes se propagent à partir d'un site primaire et envahissent finalement des organes à distance (Gupta and Massague 2006). Une classification simple des étapes de la progression tumorale (figure 2) permet de rationaliser ce processus complexe dont les différents événements biologiques, génétiques ou épigénétiques ont été jusqu'à aujourd'hui largement décrits (Chambers, Groom et al. 2002).

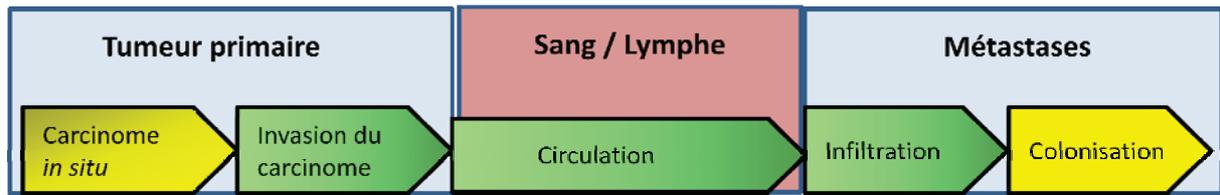


Figure 2 : Etapes basiques de la progression d'une tumeur primaire vers des métastases

b. Modèles de progression tumorale

Deux modèles, représentés dans la figure 3, ont été décrits pour représenter la progression d'une tumeur primaire vers des métastases : le modèle de progression linéaire et le modèle de progression parallèle.

■ Le modèle de progression linéaire (figure 3a)

Dans ce modèle décrit par Leslie Fould et ses collaborateurs, les cellules tumorales au sein d'une tumeur primaire, accumulent des altérations génétiques et épigénétiques jusqu'à avoir acquis tous les caractères tumoraux nécessaires à la manifestation du cancer, état appelé *complètement malin* (Klein 2008). C'est donc à un stade tardif que des cellules métastatiques auraient la capacité de se détacher (Klein 1998) des tumeurs primaires pour engendrer des métastases macroscopiques (Weinberg 2008). Ces métastases continueraient à s'échapper du site primaire jusqu'à ce que la tumeur primaire ait atteint une masse limite considérée comme létale d'environ 1kg (10^{12} à 10^{13} cellules). Une fois adaptées au site secondaire qu'elles ont colonisées, de nouvelles métastases pourraient alors s'échapper et aller coloniser de nouveaux sites (Weinberg 2008).

■ Le modèle de progression parallèle (figure 3b)

Ce modèle, datant des années 1950, propose que les métastases pourraient être initiées très précocement, bien avant que la tumeur primaire n'ait finie sa transformation ou que les premiers symptômes cliniques de cette tumeur n'apparaissent (Friberg and Mattson 1997). Ce modèle ne place pas les métastases à un stade tardif de la progression tumorale comme le modèle précédent mais à un stade précoce, durant lequel les métastases évolueraient en parallèle de la tumeur primaire. Des études récentes, notamment une étude du caryotype des cellules métastatiques osseuses chez des patientes souffrant de cancer du sein, supportent l'idée que la dissémination de métastases pourrait être un événement précoce du cancer (Schardt, Meyer et al. 2005). Parallèlement à l'évolution et à l'apparition clinique de la tumeur primaire, les cellules métastatiques issues de celle-ci pourraient entrer en dormance et persister pendant des années dans des endroits différents du site de la tumeur primaire (Aguirre-Ghiso 2007).

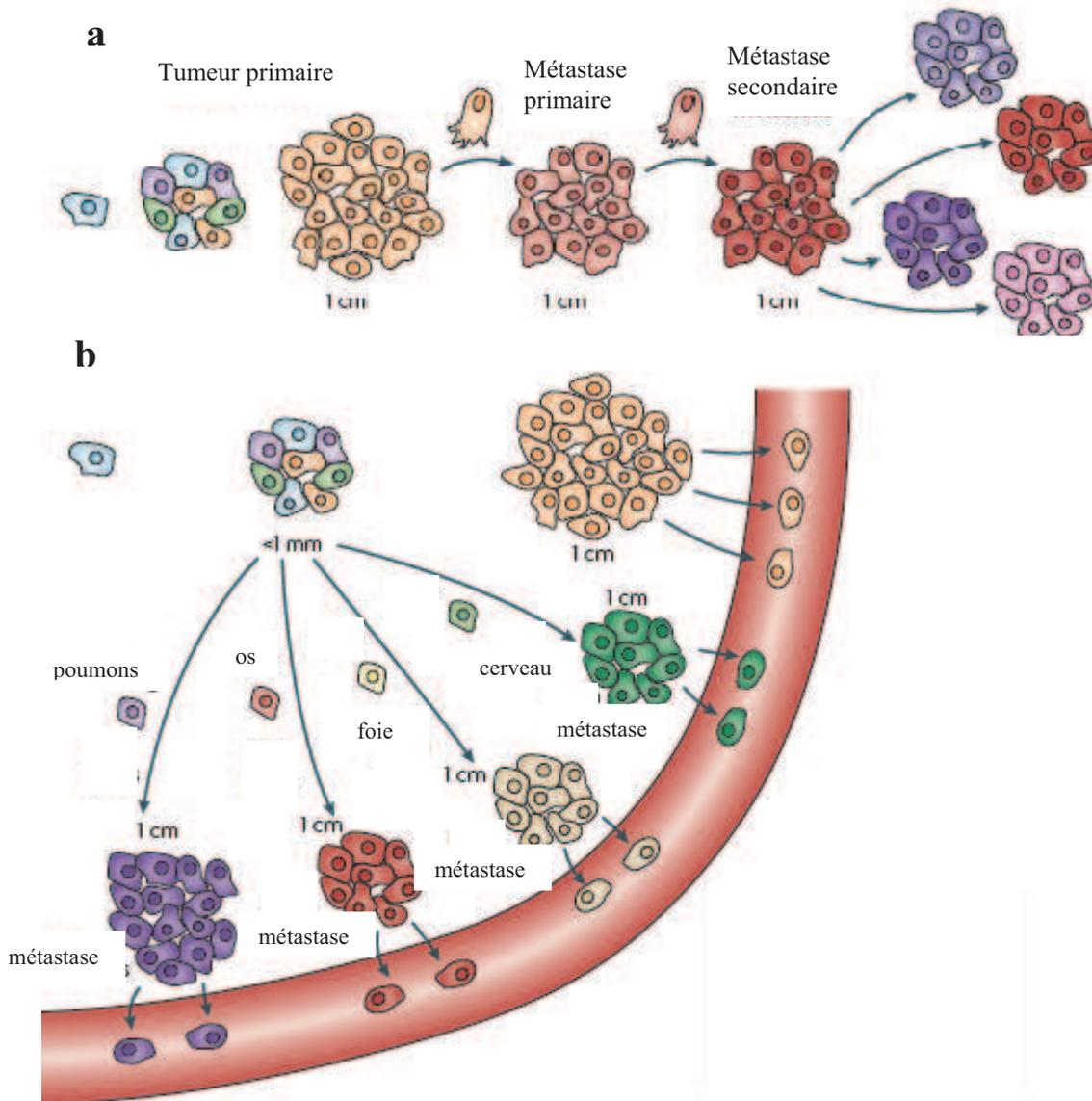


Figure 3 : Représentation des modèles de propagation tumorale. a) le modèle de propagation linéaire : au sein de la tumeur primaire, au stade du diagnostic précoce, des cellules métastatiques pourraient être sélectionnées et initier une dissémination. Les cellules deviendraient de plus en plus malignes au sein de la tumeur primaire et des métastases s'échapperaient jusqu'à la mort du patient. b) le modèle de progression parallèle : la dissémination tumorale pourrait débuter alors que la tumeur primaire fait une taille très réduite (1 à 4mm) et les métastases pourraient envahir différents organes et se développer en parallèle de la tumeur primaire. D'après (Klein 2009).

c. Mécanismes de la progression tumorale

Depuis longtemps, on pensait que la dissémination des cellules tumorales était une étape finale suivant les processus d'altérations génétiques. Weinberg Robert A, qui fut un pionnier dans la compréhension des mécanismes du cancer, proposa des lésions génétiques supplémentaires sur les cellules tumorales primaires leur conféreraient la capacité de métastaser (Weinberg 2008).

Il semblerait qu'un programme complexe, intrinsèque aux cellules tumorales, puisse déterminer leur capacité à devenir invasives. Ce programme, notamment appelé programme de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Tarin, Thompson et al. 2005), pourrait

permettre l'activation de certains facteurs de transcription entraînant l'expression de plusieurs gènes nécessaires à la manifestation de l'état métastatique. Les cellules tumorales pourraient alors exprimer certaines protéases permettant de dégrader la matrice extracellulaire (Turpeenniemi-Hujanen, Thorgeirsson et al. 1985; Matrisian, Bowden et al. 1986), diminuer l'expression de certaines molécules d'adhésion et/ou de cohésion (E-cadhérines, cytokératine) ou en surexprimer d'autres (N-cadhérines, fibronectine) (Thompson, Newgreen et al. 2005). Ces caractéristiques feraient acquérir aux cellules tumorales des capacités nouvelles de mobilité et d'invasion de tissus. Des récepteurs de *homing*, qui peuvent être spécifiques de différents organes, vont être exprimés lors de l'activation de ce programme TEM et favoriser la colonisation des organes par les cellules tumorales (Gunthert, Hofmann et al. 1991; Weber and Ashkar 2000).

On peut noter que durant cette étape de colonisation, la majorité des métastases naissantes, subissant une pression de sélection importante va être éliminées (Scheel, Onder et al. 2007).

d. Spécificité des sites envahis

La colonisation de plusieurs sites de l'organisme par les cellules tumorales qui cause le plus souvent (dans 90% des cas) le décès des patients, par les désorganisations locales qu'elles occasionnent (Sporn 1996).

Une des principales caractéristiques du processus métastatique, serait la capacité de tumeurs particulières à coloniser des organes spécifiques (Fidler 2003). Cette capacité serait liée à des gènes particuliers permettant le développement des métastases dans différents organes (Minn, Gupta et al. 2005). Certaines tumeurs primaires métastasent vers un nombre de sites très restreint. Par exemple les métastases originaires de cancers de prostate qui sont largement confinées aux niveaux des os (Edlund, Sung et al. 2004) alors que des tumeurs d'origine mammaire peuvent métastaser vers une grande variété d'organes (incluant les os, le foie, les poumons et le cerveau) (Hess, Varadhachary et al. 2006).

Ainsi la genèse d'un cancer que nous venons de décrire, provient de la transformation des cellules normales. Le stress cellulaire conduisant à la transformation maligne va déclencher des « signaux » reconnus par le système immunitaire. Dans ma thèse, nous nous sommes intéressés à des acteurs du système immunitaire particulièrement efficaces pour déceler les cellules émettant des « signaux de stress cellulaire » : les lymphocytes T $\gamma\delta$. Nous avons étudié le potentiel anti-tumoral de ces cellules dans un modèle de cancer colique chez la souris.

1.4. Cancer du côlon

a. Généralités

Récemment, l'*American Society of Cancer* estime l'incidence du cancer du côlon, chez les deux sexes, au troisième rang des cancers mondiaux (Jemal, Siegel et al. 2008). Généralement initié par des polypes pré-cancéreux au niveau des muqueuses colorectales, ce cancer est souvent associé à des facteurs de risque tel que l'âge, l'hérédité (Razmus, Jackson et al. 2008), la présence d'une maladie inflammatoire de l'intestin (Breynaert, Vermeire et al. 2008; Ahmadi, Polyak et al. 2009) mais aussi le type d'alimentation (Pischon, Nothlings et al. 2008; Renehan, Roberts et al. 2008).

Généralement il est associé au cancer rectal et nommé de ce fait cancer colorectal. Cependant certaines études auraient tendance à les séparer en deux cancers distincts (Kapiteijn, Liefers et al. 2001; Frattini, Balestra et al. 2004; Wei, Giovannucci et al. 2004).

b. Origine des tumeurs coliques

■ Origine génétique

L'évolution d'une muqueuse intestinale normale vers un tissu tumoral pourrait être conditionnée par l'accumulation de mutations (Fearon and Vogelstein 1990) retrouvées au niveau de gènes tels que le *adenomatous polyposis coli (APC)* (Kinzler and Vogelstein 1996), le gène *K-ras* (Vogelstein, Fearon et al. 1988), le gène *p53* (Baker, Fearon et al. 1989) ou encore le gène *deleted in colorectal carcinoma (DCC)*. Plus récemment des mécanismes épigénétiques (comme des méthylations) ont été démontrés comme importants dans la carcinogénèse colorectale (Jubb, Bell et al. 2001).

On peut noter qu'il existe des transmissions familiales de ces gènes qui engendrent une extrême sensibilité au cancer du colon chez l'homme (5 à 15% des cas) dans lesquelles on retrouve deux syndromes dominants, la FAP (polypose adénomateuse familiale) et le HNPCC (cancer colorectal héréditaire non polypeux ou syndrome de Lynch) qui sont transmis selon un mode autosomal dominant (Burt 1996). La FAP proviendrait d'une mutation du gène *APC* et le HNPCC serait due à des mutations des gènes de réparation de l'ADN (Potter, Slattery et al. 1993).

■ Cellules souches tumorales coliques (CSC)

Les cellules CSC, dont nous avons parlé précédemment, pourraient être impliquées dans l'initiation d'une tumeur colique. En effet, sur un modèle de souris immunodéficientes, O'Brien C et son équipe montrent que seules certaines cellules, nommées cellules initiatrices de cancer coliques (CC-IC), provenant d'échantillons tumoraux de patients et exprimant un marqueur des cellules souches : CD133 (Yin, Miraglia et al. 1997), pourraient initier le développement de tumeurs après des xéno greffes. De plus, des cellules CD133⁺ provenant de ces xéno greffes peuvent initier le développement de nouvelles tumeurs une fois transférées dans de nouvelles souris receveuses, indiquant le potentiel régénérateur de ces CC-IC (O'Brien, Pollett et al. 2007). De même, une autre équipe a montré que 2,5% des cellules étaient CD133⁺ dans des tumeurs coliques humaines et que des injections sous-cutanées de ces cellules CD133⁺ mais pas des cellules CD133⁻ chez des souris immunodéficientes peuvent initier la formation de tumeurs solides (Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007).

c. Progression des tumeurs coliques

Les tumeurs colorectales progresseraient lentement vers un stade invasif au niveau des muqueuses intestinales mais rapidement de ce stade vers une phase métastatique (figure 4).

Le foie serait le site privilégié des métastases, qui s'y nicheraient *via* la circulation lymphatique (Lalor, Lai et al. 2006), notamment dans 80% des patients avec un cancer colorectal récurrent (Hess, Varadhachary et al. 2006). De plus, les cellules tumorales d'origine colique peuvent passer dans la circulation sanguine, à partir du colon ou du foie, et atteindre les poumons, second site le plus fréquent de métastases.

Certains éléments permettraient aux cellules métastatiques d'origine colique d'atteindre leurs organes cibles. Par exemple, des récepteurs à cytokines chimioattractantes comme CXCR3 et CXCR5 seraient importants pour la migration des cellules tumorales d'origine colique vers les ganglions lymphatiques (Kawada, Hosogi et al. 2007) (Meijer, Zeelenberg et al. 2006) ou encore CXCR4 serait requis pour la croissance des micrométastases d'origine colique au niveau du foie (Zeelenberg, Ruuls-Van Stalle et al. 2003). D'autres éléments permettraient l'implantation des cellules métastatiques au niveau

des sites spécifiques. Par exemple, les molécules d'adhésions exprimées par les cellules tumorales coliques, leur permettraient de développer des interactions avec les endothéliums hépatiques ou pulmonaires, qui les maintiendraient dans ces organes (Schluter, Gassmann et al. 2006).

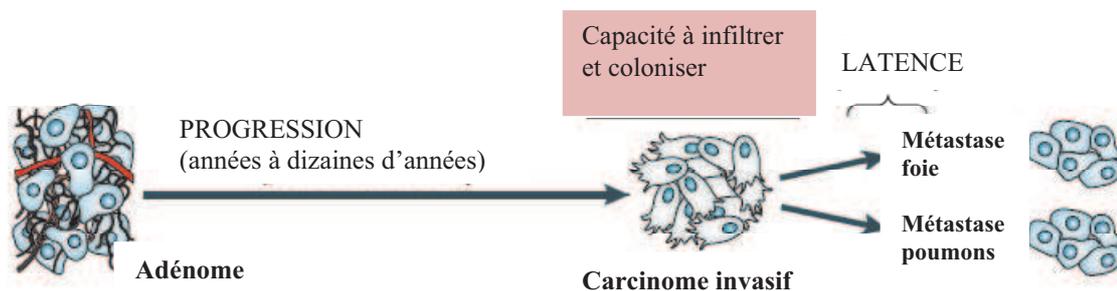


Figure 4 : Dissémination des cellules tumorales de cancer colique. D'après (Nguyen, Bos et al. 2009)

2. Immunité et cancers

Un grand nombre de preuves accumulées dans les modèles murins ainsi que des données cliniques provenant de patients confèrent un rôle protecteur au système immunitaire vis-à-vis des cancers. Il serait capable d'éliminer des cellules tumorales. Ces dix dernières années, un nombre croissant de données propose que cette élimination tumorale par le système immunitaire ne représente qu'une seule dimension de la relation complexe entre l'immunité et les cancers. En effet, les fonctions du système immunitaire dans les cancers seraient protectrices lors de l'immunosurveillance mais pourrait aussi être favorables à la croissance tumorale.

2.1. Immunosurveillance des cancers

Burnet M. et Thomas L. furent les premiers à proposer un *concept d'immunosurveillance des cancers* (Burnet 1967). A l'époque, ils spéculaient que les cellules immunitaires, en particulier les lymphocytes, agissaient comme des sentinelles en éliminant continuellement les cellules transformées (Burnet 1970). Cette théorie fut par la suite très controversée mais des preuves, accumulées à la fois dans des modèles murins et chez l'homme, la confortent aujourd'hui.

a. Preuves d'une immunosurveillance anti-tumorale chez la souris

Les premières études validant cette théorie démontraient un développement tumoral optimal chez des souris dépourvues de système immunitaire adaptatif (Kaplan 1971; Stutman 1975). En effet de nombreuses expériences de thymectomies néonatales chez des souris ont démontré une incidence accrue de tumeurs induites (Grant and Miller 1965) ou spontanées (Burstein and Law 1971) par rapport à des souris immunocompétentes.

Les modèles murins ont permis de démontrer l'implication dans le processus d'élimination tumorale d'un certain nombre de cellules ; comme les cellules *Natural Killer* (NK), les lymphocytes T alpha beta ($\alpha\beta$) et gamma delta ($\gamma\delta$), les cellules T NK (NKT, exprimant des marqueurs NK (Godfrey, Hammond et al. 2000)), ainsi que de plusieurs molécules effectrices ; comme la perforine ou le *Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-*

Inducing Ligand (TRAIL) et cytokines incluant l'interféron γ (IFN γ), les IFN de type I et l'IL12 (Swann and Smyth 2007).

■ Développement de tumeurs spontanées chez des souris immunodéficientes

L'approche la plus simple pour tester le rôle du système immunitaire dans le contrôle du développement tumoral consiste en l'élimination de composants du système immunitaire murin et au suivi du développement de tumeurs spontanées chez ces animaux. Par exemple, l'implication des lymphocytes dans l'immunosurveillance antitumorale a été montrée dans des souris *Rag2*^{-/-}, qui sont dépourvues de lymphocytes T et B (Shinkai, Rathbun et al. 1992). Ces souris maintenues sous antibiotiques dans un environnement stérile, développent spontanément plus d'adénocarcinomes au niveau des intestins (non induit par *Helicobacter*) que des souris normales (Shankaran, Ikeda et al. 2001). De même, l'équipe de Smyth MJ a beaucoup travaillé sur des modèles murins dépourvus de perforine (*ppf*^{-/-}). Cette molécule, essentielle à la cytotoxicité des lymphocytes T CD8⁺, T $\gamma\delta$ mais aussi des cellules NK, leur permet de faire entrer un inducteur de l'apoptose et des caspases : les granzymes, à travers des pores dans la membrane de la cellule cible (Russell and Ley 2002). Ces souris *ppf*^{-/-} présentent une incidence importante de lymphomes B en vieillissant (Smyth, Thia et al. 2000). De plus, ils ont montré que ces lymphomes développés spontanément étaient rejetés par les cellules T CD8⁺ après une transplantation chez des souris immunocompétentes (Smyth, Thia et al. 2000). Enfin, plusieurs études de développement de tumeurs spontanées portent sur des souris déficientes pour des cytokines ou leurs récepteurs (Enzler, Gillessen et al. 2003; Airoidi, Di Carlo et al. 2005). Par exemple, dans une expérience utilisant des souris C57Black/6 déficientes pour l'IFN γ , la moitié des animaux ont développé spontanément des lymphomes T disséminés (Street, Trapani et al. 2002) démontrant ainsi l'importance de l'IFN γ dans la réponse anti-tumorale.

■ Induction de tumeurs par des carcinogènes chez des souris immunodéficientes

L'induction de tumeurs dans des souris immunodéficientes peut certainement être considérée comme la façon la plus pertinente d'étudier l'immunosurveillance dans un contexte *in vivo* de tumorigénèse. Le plus souvent, les tumeurs sont induites chimiquement. Par exemple pour l'étude des cancers cutanés, ce sont soit des fibrosarcomes peu différenciés induits chez les souris par l'application du carcinogène méthylcholanthrène (MCA), soit des papillomes au niveau de la peau induits par l'utilisation d'une combinaison de 7,12-diméthylbenz [a]-anthracène (DMBA) et de 12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate (TPA). Nous reviendrons sur les modèles traités par DMBA et TPA dans la dernière partie de l'introduction (C. lymphocytes T $\gamma\delta$ et cancer).

Une incidence accrue de carcinomes, induits par le MCA, a été démontrée chez des souris immunodéficientes *Rag2*^{-/-} (Shankaran, Ikeda et al. 2001), des souris SCID (Engel, Svane et al. 1997) ou encore des souris *Nude* (Svane, Engel et al. 1996), dépourvues d'une partie ou la totalité de leur système immunitaire adaptatif. D'autres preuves impliquent le système immunitaire inné dans la suppression des tumeurs formées par induction au MCA, notamment lors de l'utilisation de souris déplétées en cellules NK qui montrent une incidence accrue de carcinomes (Smyth, Thia et al. 2000). Pour mieux cerner la façon dont le système immunitaire peut empêcher la croissance de ces tumeurs induites, des souris déficientes pour des molécules effectrices ou de voies de signalisation ont été utilisées. Ainsi, le rôle prédominant de l'IFN γ dans la réponse antitumorale fut mis en avant grâce à des souris

déficientes pour le récepteur à l'IFN γ qui présentent une incidence tumorale augmentée sous l'effet du MCA par rapport à des souris normales (Kaplan, Shankaran et al. 1998).

Enfin, on peut citer en exemple les tumeurs induites par des irradiations aux UV chez des souris immunodéficientes. Des souris dépourvues de cellules T développent plus rapidement des carcinomes de peau sous l'effet d'UV comparées à des souris normales (Norbury and Kripke 1978).

b. Données chez l'homme montrant une immunosurveillance anti-tumorale

Chez l'homme, les preuves d'une surveillance des tumeurs par le système immunitaire sont apportées par des observations cliniques. Beaucoup de données suggèrent aujourd'hui que des personnes possédant un système immunitaire déficient sont plus sensibles à l'apparition de cancers (Penn and Starzl 1970; Gatti and Good 1971; Boshoff and Weiss 2002). Il peut s'agir de patients immunosupprimés par des traitements, suite à une transplantation par exemple, qui présentent un risque particulièrement élevé (augmenté de 3 à 100 fois) de développer un cancer (un lymphome dans la plupart des cas) (Sheil 1986; Buell, Gross et al. 2005). De même des patients souffrant d'une immunosuppression acquise lors d'une infection virale, comme lors d'une infection au virus d'immunodéficience humaine (VIH), ont une incidence accrue de cancers (Penn 1988).

Des preuves convaincantes ont également été apportées par les études démontrant des corrélations positives entre la présence de lymphocytes (TILs) ou de cellules NK infiltrant une tumeur et la survie des patients notamment dans le cas des mélanomes (Clark, Elder et al. 1989; Clemente, Mihm et al. 1996) mais aussi de beaucoup d'autres tumeurs solides dont des tumeurs ovariennes (Sato, Olson et al. 2005) et coliques (Nacopoulou, Azaris et al. 1981) (Naito, Saito et al. 1998; Diederichsen, Hjelmberg et al. 2003). On peut également souligner les résultats des travaux de Pagès F et son équipe qui suggèrent fortement l'importance du système immunitaire dans le contrôle du cancer, notamment d'origine colique. Ils ont effectué des analyses de plusieurs paramètres immunologiques au sein de tumeurs colorectales provenant de larges cohortes de patients. Ils furent les premiers à démontrer que le système immunitaire adaptatif peut prévenir les premiers signes d'apparition de l'invasion métastatique que constituent les emboles intra-tumoraux. En effet, ils ont détectés au sein de tumeurs colorectales non invasives, caractérisées VELIPI (Embolie Vasculaire (VE), Infiltration Lymphatique (LI) et Invasion Périneurale (PI)) des marqueurs d'une réponse cytotoxique anti-tumorale comme l'expression de Granzyme B/Granulysine et de plusieurs marqueurs d'activation, de différenciation, de migration et mémoire des cellules T (Pages, Berger et al. 2005). De plus, ils ont démontré que l'orientation fonctionnelle, la densité et la localisation au sein de la tumeur de l'infiltrat immunitaire étaient des déterminants du pronostic de survie et de récurrence du patient. Ainsi, ils proposent que l'analyse *in situ* de l'infiltrat immunitaire d'une tumeur puisse être utilisée en tant qu'outil de pronostic chez les patients. Une forte densité de cellules T cytotoxiques au centre et en périphérie de la tumeur (centre tumoral (CT) et marge invasive (IM)) peut être corrélée avec le pronostic de survie (Galon, Costes et al. 2006).

Enfin, dans certains cas rares, il a été observé des régressions spontanées de tumeurs associées à un infiltrat de cellules immunitaires au sein par exemple de carcinomes de peau infiltrés par des lymphocytes T CD4⁺ (Halliday, Patel et al. 1995) ou encore de lymphomes (Iihara, Yamaguchi et al. 2004) et de tumeurs pulmonaires (Kerr, Johnson et al. 1998).

2.2. Immunoediting des tumeurs

Les données actuelles confortent la notion que le système immunitaire pourrait non seulement empêcher la formation et la croissance des tumeurs mais aussi qu'il pourrait la promouvoir en sélectionnant des variants tumoraux à faible immunogénicité permettant aux tumeurs de lui échapper. De l'ensemble de ces données est née une théorie d'*Immunoediting* des tumeurs qui fait intervenir 3 phases appelées les 3 « Es » du cancer (figure 5): Elimination, Equilibre et Echappement (Smyth, Dunn et al. 2006).

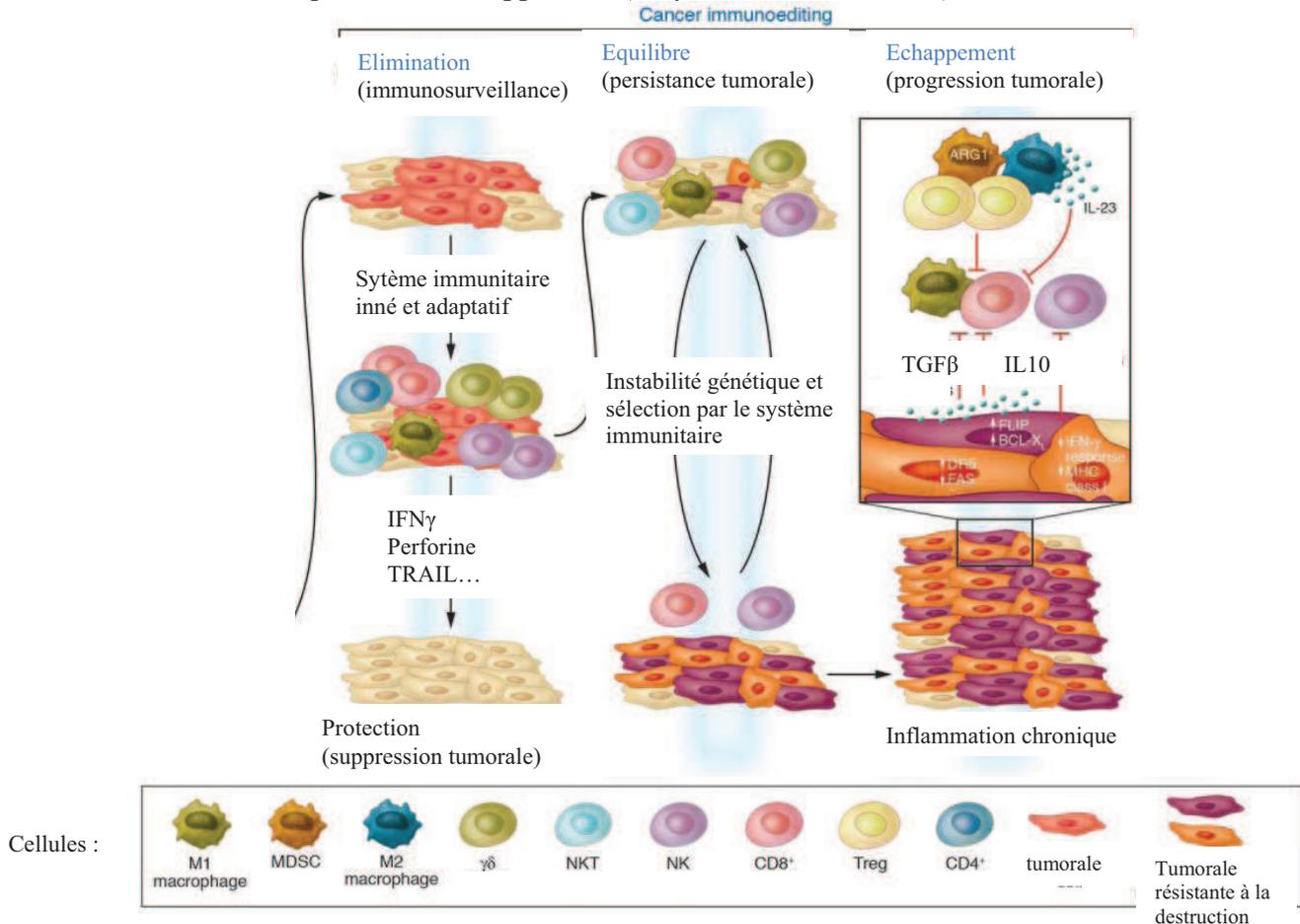


Figure 5: Les 3 phases d'immunoediting des cancers. D'après (Swann and Smyth 2007). Avec DR5= Death Receptor.

a. Elimination tumorale

On peut résumer ce processus d'élimination qui fait intervenir les éléments du système immunitaire inné et adaptatif, en 4 étapes (figure 6).

1) (figure 6a) Une tumeur primaire ayant atteint une certaine taille, se vascularise (Hanahan and Folkman 1996) et devient invasive dans le tissu environnant causant des lésions de celui-ci, qui induisent la production de facteurs inflammatoires. Un recrutement de plusieurs cellules du système immunitaire inné, comme les cellules NK, les lymphocytes T NK et T $\gamma\delta$ (Girardi, Oppenheim et al. 2001), se produit. Ces cellules peuvent reconnaître des molécules induites par le stress en surface des cellules tumorales, être stimulées et produire de l'IFN γ (Smyth, Godfrey et al. 2001).

2) (figure 6b) Cet IFN γ produit peut induire directement la mort des cellules tumorales par des mécanismes antiprolifératifs (Bromberg, Horvath et al. 1996) et pro-apoptotiques (Kumar,

Commane et al. 1997). De plus, il induit la production de chimiokines comme IP10 (Luster and Ravetch 1987), TAC (Cole, Strick et al. 1998) ou Mig (Liao, Rabin et al. 1995) par les cellules tumorales elles-mêmes ou par le tissu environnant ou stroma tumoral. On peut noter que certaines de ces chimiokines, dont l'IP10 (Sgadari, Angiolillo et al. 1996), ont un potentiel anti-angiogénique et en bloquant la formation de nouveaux vaisseaux vont provoquer la mort des cellules tumorales (Coughlin, Salhany et al. 1998). Les débris tumoraux formés vont ensuite être endocytés par les cellules dendritiques (DC) locales qui vont maturer, se mobiliser et être drainées vers les ganglions lymphatiques. De plus, les chimiokines produites durant cette « escalade » de signaux pro-inflammatoires, vont aboutir au recrutement de plus de cellules NK ainsi que de macrophages sécréteurs d'IL12 sur le site tumoral.

3) (figure 6c) Ces cellules NK et macrophages infiltrant la tumeur vont éliminer les cellules tumorales par des mécanismes impliquant l'apoptose induite par TRAIL (Takeda, Smyth et al. 2002) ainsi que la perforine et les intermédiaires oxygène et azote nitreux (NO) (Bancroft, Schreiber et al. 1991) (Ikeda, Old et al. 2002). En parallèle, au niveau des ganglions lymphatiques, les DCs activent des lymphocytes T $CD4^+$ *helper* spécifiques des tumeurs et producteurs d' $IFN\gamma$ (cellules T_H1) qui vont faciliter l'activation des cellules T $CD8^+$ cytotoxiques (Pardoll 2002; Piccioli, Sbrana et al. 2002) notamment en induisant une cross-présentation des peptides antigéniques tumoraux par le CMH I des DCs (Huang, Golumbek et al. 1994).

4) (figure 6d) Enfin, les cellules T $CD8^+$ et $CD4^+$ spécifiques des tumeurs sont recrutées au niveau du site tumoral et vont contribuer à la destruction des cellules tumorales présentant un antigène, dont l'immunogénicité a été augmentée par l'exposition à l' $IFN\gamma$.

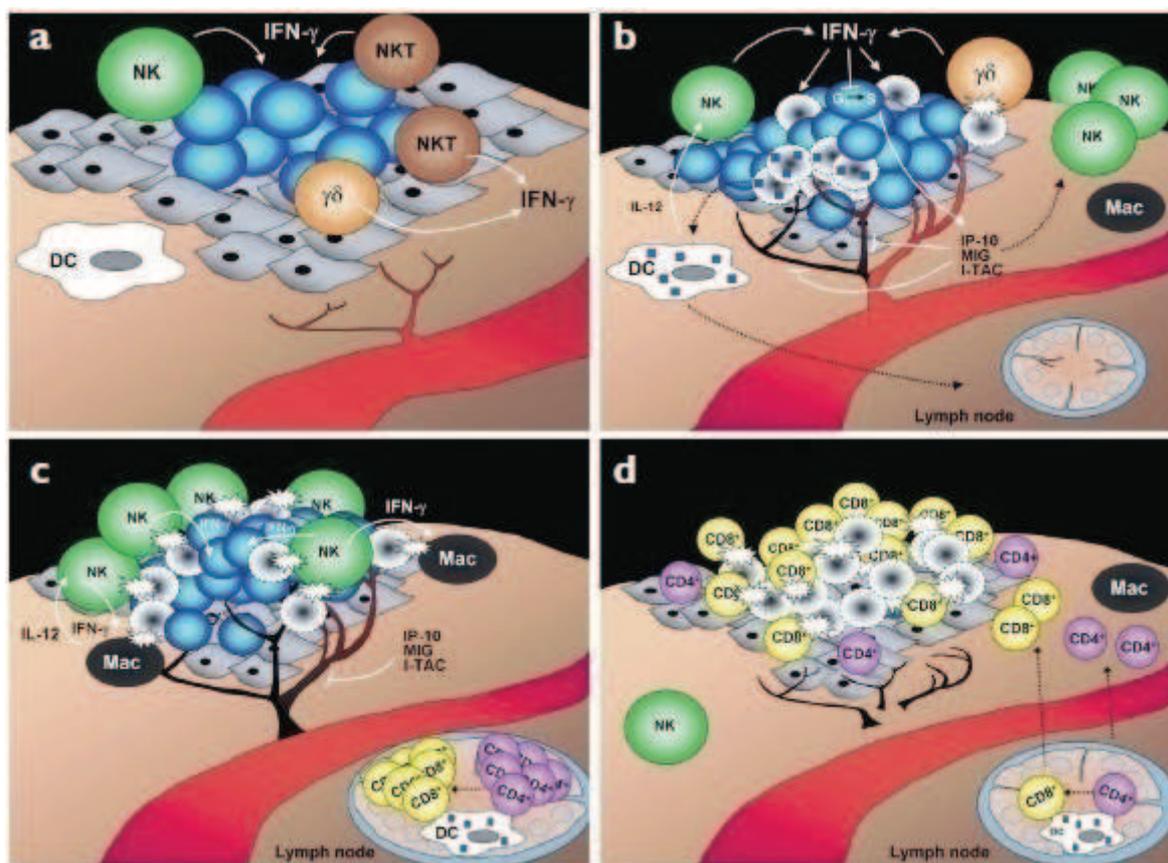


Figure 6: Les différentes étapes de l'élimination tumorale. D'après (Dunn, Bruce et al. 2002) Avec Lymph node=ganglion lymphatique, Mac= Macrophage.

Bien évidemment, si ce processus aboutit à l'élimination totale de la tumeur ; le processus d'*editing* s'arrête et ne progresse pas vers les autres phases.

b. Phase d'équilibre entre les tumeurs et le système immunitaire

Suite à ce que nous venons de décrire, on pourrait se demander, pourquoi si l'immunosurveillance des cancers et l'élimination tumorale existent chez des individus immunocompétents, ceux-ci développent quand même des cancers?

■ Observations cliniques

Des preuves indirectes, basées sur des observations cliniques, chez des patients, proposent qu'il existerait une phase d'équilibre entre le système immunitaire et les tumeurs. Il apparaît que chez certains patients, des tumeurs pourraient rester « en dormance » pendant plusieurs années (parfois même plus de 10 ans) avant qu'une rémission du cancer ne soit observée (Callaway and Briggs 1989; Demicheli, Abbattista et al. 1996). Par exemple, l'apparition de tumeurs récurrentes a été observée dans différents sites métastatiques chez des patientes, en rémission d'un cancer du sein, jusqu'à 20 à 25 ans après leurs mammectomies pour leurs tumeurs primaires (Karrison, Ferguson et al. 1999). De plus, il a été relevé plusieurs cas de transmission de tumeurs à partir d'organes de donneurs sains mais avec un passé cancéreux (Kauffman, McBride et al. 2000). Dans ce cas, il est possible que la tumeur ait été contrôlée par l'immunité des donneurs et que son transfert dans un contexte immunosupprimé, sans pression du système immunitaire, ait permis sa croissance.

■ Modelage par le système immunitaire

Cet équilibre entre le système immunitaire de l'hôte et les « variants » tumoraux (cellules tumorales), ayant résistés à la phase d'élimination décrite précédemment, serait dynamique. En effet, le système immunitaire pourrait exercer une pression de sélection forte sur les cellules tumorales et sélectionner les variants tumoraux aptes à survivre dans un contexte immunologique intact. Une sélection naturelle darwinienne va éliminer un nombre considérable de variants tumoraux alors que d'autres variants génétiquement instables, vont muter rapidement et résister (Lengauer, Kinzler et al. 1998). Ainsi, la survie d'une tumeur au sein d'un organisme immunocompétent dépendrait de sa capacité à résister aux actions du système immunitaire visant à l'éliminer. Elle se débarrasserait de ces cellules tumorales fortement immunogéniques pour privilégier des cellules ayant développées des mécanismes d'échappement au système immunitaire (voir chapitre suivant), en étant par exemple moins immunogéniques (Uyttenhove, Van Snick et al. 1980; Urban, Holland et al. 1982).

Peu d'études comparent l'immunogénicité de tumeurs générées en présence ou en absence de système immunitaire compétent. Cependant, une étude remarquable de Schreiber RD et son équipe rapporte que 40% des tumeurs formées dans des souris *Rag2^{-/-}*, en absence de système immunitaire adaptatif, sont rejetées une fois transplantées dans des souris immunocompétentes. Ces tumeurs grossissent progressivement chez de nouvelles souris *Rag2^{-/-}* ou des souris déplétées en cellules T CD4⁺ et CD8⁺ alors que des tumeurs formées dans des souris immunocompétentes ne sont pas rejetées une fois re-transplantées dans des souris immunocompétentes ou *Rag2^{-/-}* (Shankaran, Ikeda et al. 2001). Ces observations furent cruciales dans la mise en évidence d'un « modelage » des tumeurs par le système immunitaire puisqu'elles montrent que des tumeurs générées dans un contexte immunodéficient sont moins immunogènes que des tumeurs générées au sein d'un système immunitaire fonctionnel. Ces données, ajoutées à d'autres expériences de transplantation secondaires de tumeurs générées dans des souris immunodéficientes ou immunocompétentes dans des souris normales

(Svane, Engel et al. 1996; Smyth, Thia et al. 2000), semblent indiquer que la tumeur serait le produit de l'environnement immunologique dans lequel elle se développe.

Pour finir, il est probable que cette phase d'équilibre soit la plus longue des trois et puisse durer plusieurs années.

c. Echappement tumoral

Cette phase d'échappement de la tumeur au système immunitaire reste la mieux caractérisée des trois puisque c'est celle où les tumeurs deviendraient cliniquement visibles et pourraient aboutir à la mort de l'hôte. Au cours de la dernière phase de l'*immunoediting*, des variants tumoraux sont devenus insensibles au système immunitaire par différents mécanismes et vont proliférer de manière incontrôlée.

■ Absence de signaux de danger pour le système immunitaire

Selon un modèle proposé par Matzinger P, il est possible que le système immunitaire soit incapable d'influencer la progression tumorale, car les tumeurs ne lui apparaissent pas comme étant « dangereuses ». Celles-ci auraient initiées leur croissance en mimant des cellules saines, sans envoyer de signaux de stress aux cellules présentatrices d'antigènes (APC) (Fuchs and Matzinger 1996). Les APC présenteraient alors des antigènes de manière constitutive en absence de signaux de co-stimulations entraînant ainsi une tolérance par le système immunitaire (Kurts, Heath et al. 1996). En effet, les cellules T, rencontrant les antigènes tumoraux en absence des signaux appropriés de co-stimulation, entreraient en anergie voire en apoptose perdant ainsi leur potentiel à répondre aux tumeurs (Gallucci, Lolkema et al. 1999) (Ridge, Fuchs et al. 1996). Plusieurs études renforcent cette idée que les tumeurs elles-mêmes sont capables d'induire une tolérance périphérique (Schell, Knowles et al. 2000; Willimsky and Blankenstein 2005).

■ Suppression de la réponse immunitaire dérivant des tumeurs et de leur microenvironnement

Il se peut également que le système immunitaire ait pu retarder la progression tumorale (durant la phase d'équilibre) mais ait été « surpassé » par la tumeur qui reprend alors sa progression.

L'environnement local ou des facteurs provenant de la tumeur peuvent empêcher l'efficacité de la réponse effectrice. Cette importance de l'environnement local tumoral est très bien illustrée avec les études chez la souris dans lesquelles des tumeurs sont implantées sur un site et grossissent de manière incontrôlée alors que des tumeurs prélevées sur ce site et réimplantées à distance dans les mêmes souris sont contrôlées par le système immunitaire et rejetées (Kurt, Park et al. 2000) (Blohm, Roth et al. 2002). On peut citer quelques éléments pouvant expliquer cette inhibition de la réponse effectrice. Par exemple, certaines cellules T, infiltrant le microenvironnement tumoral local ont été décrites comme étant régulatrices ou suppressives. Parmi elles, se trouvent les cellules NKT qui pourraient empêcher la régression de tumeurs dans un modèle murin d'une manière dépendante de l'IL13 (Terabe, Matsui et al. 2000). On peut aussi citer les lymphocytes T Reg CD4⁺CD25⁺ (Terabe and Berzofsky 2004) ou encore les cellules T $\gamma\delta$ CD8⁺ $\alpha\alpha$ (Hanninen and Harrison 2000) dont la déplétion a été montrée comme favorisant la cytotoxicité des lymphocytes T CD8⁺ et des NK et le rejet de tumeurs dans des modèles murins (Onizuka, Tawara et al. 1999; Seo, Tokura et al. 1999). D'autre part, la tumeur peut directement échapper au système immunitaire en exprimant des molécules inhibitrices des cellules T comme par exemple B7-H1 (Dong, Strome et al. 2002) ou HLA-G (Tripathi and Agrawal 2006) ou encore en diminuant l'expression des molécules

du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à sa surface (Campoli, Chang et al. 2002). La tumeur peut aussi par exemple relarguer des cytokines immunosuppressives comme le transforming growth factor β (TGF β) ou l'Interleukine 10 (IL10) (Elgert, Alleva et al. 1998). Elle peut aussi, produire des molécules MIC solubles qui provoqueraient une down-régulation de la molécule stimulatrice NKG2D en surface des NK ou de divers lymphocytes T comme les lymphocytes T $\gamma\delta$ (Groh, Wu et al. 2002).

Suite à ce que nous venons de décrire sur l'importance de la réponse immunitaire dans l'élimination des tumeurs, on pourrait considérer que cette capacité de certaines cellules tumorales à échapper au système immunitaire serait une septième « caractéristique » (*Hallmark*) nécessaire à la survie des cellules cancéreuses, s'ajoutant à celles que nous avons citées précédemment.

3. Les thérapies du cancer

3.1. Thérapies conventionnelles

Le traitement des tumeurs primaires consiste actuellement en une combinaison de plusieurs thérapies principalement : la chirurgie (une exérèse de la tumeur), la chimiothérapie (traitement par des drogues chimiques interférant avec la machinerie de réplication cellulaire, de réparation de l'ADN, ou les enzymes du cycle cellulaire induisant un arrêt de la prolifération suivi de la mort des cellules) et la radiothérapie (rayons entraînant des dommages irréparables dans l'ADN entraînant de ce fait la mort cellulaire) (Zitvogel, Apetoh et al. 2008).

John Burchenal fut l'un des pionniers de l'utilisation de la chimiothérapie pour traiter les cancers, dans les années 1950s, à une époque où peu de choses étaient connues sur les mécanismes moléculaires à l'origine des cancers. Par des traitements avec des drogues chimiques, son équipe a permis la rémission d'enfants atteints de leucémies agressives (Burchenal, Murphy et al. 1956). Par la suite, le développement de la chimiothérapie mais aussi de la radiothérapie s'est basé sur un concept, qui s'est largement complexifié depuis, d'endommager l'ADN et le cycle des cellules tumorales dépourvues de machinerie fonctionnelle de réparation.

Jusqu'aux années 2000, les avancées majeures dans la compréhension du cancer, ne semblent avoir eu qu'un très faible impact sur les méthodes utilisées par les cliniciens pour diagnostiquer ou traiter les cancers (Varmus 2006). Mais malgré une efficacité certaine les traitements chimiques et radiothérapeutiques restent lourds d'effets secondaires notamment à cause de leur manque de spécificité. Même si quelques drogues chimiques ont été sélectionnées pour leur spécificité comme par exemple l'Imatinib (Gleevec®), qui bloque spécifiquement la tyrosine kinase (BCR-ABL) et induit une rémission complète chez tous les patients à des stades précoces de leucémie myéloïdes chroniques (Druker, Talpaz et al. 2001), la majorité des chimiothérapies ne sont pas spécifiques d'une cible tumorale. De plus, les CSC dont nous avons parlé précédemment poseraient un réel problème au sein des tumeurs puisqu'il semblerait qu'elles puissent résister aux chimiothérapies (Li, Lewis et al. 2008) ainsi qu'à la radiothérapie (Bao, Wu et al. 2006) et pourraient être responsable des rechutes et de l'initiation du développement de nouvelles tumeurs. Il est donc primordial de développer de nouvelles thérapies ciblées au sein desquelles l'utilisation du système immunitaire, luttant spécifiquement contre les tumeurs, semble avoir un avenir prometteur.

De façon intéressante, on peut noter que les thérapies classiques pourraient promouvoir la réponse immunitaire adaptative (Apetoh, Tesniere et al. 2008). En effet, la mort des cellules tumorales suite aux traitements va entraîner le relarguage de signaux de danger qui vont favoriser le développement de l'immunité anti-cancer (Ullrich, Bonmort et al.

2008). Par exemple, l'équipe de Zitvogel L a montré que la chimiothérapie et la radiothérapie peuvent entraîner le relargage de molécules du *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) par les cellules tumorales mourantes qui vont fixer le TLR4 présent sur les DC et induire ainsi une cross-présentation aux cellules T $\alpha\beta$ et une activation efficace de ces dernières (Apetoh, Ghiringhelli et al. 2007). Plus récemment, cette équipe a montré que ces mécanismes nécessitent l'activation d'un complexe nommé « inflammasome » au niveau des DC par l'ATP libéré par les cellules tumorales mourantes. Ce complexe activé permettrait le relargage de l'IL1 β qui fixerait ensuite son récepteur en surface des lymphocytes T $\alpha\beta$ et participerait à leur activation (Ghiringhelli, Apetoh et al. 2009).

3.2. Immunothérapies

a. Immunothérapies *via* le système immunitaire inné

Plusieurs équipes ont cherché à activer *ex vivo* ou *in vivo* des cellules du système immunitaire inné en tant que cellules effectrices de l'immunothérapie. On peut citer quelques exemples ci-après. Par exemple, des stimulations *ex vivo* de NK puis des transferts adoptifs avec de larges doses d'IL2 ont déjà entraînés des rémissions complètes, mais cependant très rares, chez certains patients souffrant de cancers avancés métastatiques (reins ou mélanomes) (Rosenberg, Lotze et al. 1993). De plus, plusieurs études faites chez des patients atteints de cancers pulmonaires, en phase clinique I (Nieda, Okai et al. 2004). (Ishikawa, Motohashi et al. 2005) et très récemment en phase II (Motohashi, Nagato et al. 2009), ont utilisé une approche d'activation *in vivo* des NKT de type I par injection de DC exprimant le glycolipide alpha galactoside céramide via CD1d. Les résultats sont encourageant et démontrent notamment une expansion des NKT *in vivo* et une augmentation du taux d'IFN γ qui permet par la suite une activation des NK. Cependant, il semble qu'un problème de toxicité, dû, entre autre, au TNF α relargué par les NK activés reste à résoudre et que le manque de ciblage spécifique des tumeurs soit une des failles de ce type d'approches.

Enfin, on peut aussi citer à titre d'exemple les méthodes consistant à utiliser des cellules du système immunitaire inné en tant qu'activateur de la réponse adaptative. Par exemple des études cherchent à augmenter le nombre de DC dans la circulation pour améliorer par la suite la réponse immunitaire adaptative chez des patients souffrant de mélanomes ou cancer rénaux en injectant un ligand des DC : le FLT3 (Marroquin, Westwood et al. 2002; Chen, Chan et al. 2005). On peut aussi citer les essais thérapeutiques utilisant des vésicules « exosomes » dérivant de DC et présentant des antigènes tumoraux *via* des molécules de CMH, notamment chez des patients atteints de mélanomes métastatiques (Chaput, Taieb et al. 2004).

b. Immunothérapie à base d'anticorps (Ac) monoclonaux

Les thérapies à base d'Ac monoclonaux sont actuellement les seules immunothérapies réellement utilisées en routine dans le traitement des patients notamment dans les lymphomes et les cancers du sein mais aussi les cancers coliques sur lesquels nous reviendrons plus tard. Ainsi, le transfert passif de l'Ac rituximab, dirigé contre le CD20 des lymphocytes B, a déjà été validé en tant qu'immunothérapie efficace (en combinaison des chimiothérapies) et est couramment utilisé chez des patients souffrant de lymphomes B Non-hodgkiniens (McLaughlin, Grillo-Lopez et al. 1998; Coiffier 2002; Hernandez-Ilizaliturri and Czuczman 2009). De plus, actuellement lors des cancers du sein, des Ac anti HER2/neu (Trastuzumab) sont beaucoup utilisés en combinaison avec des chimiothérapies (Cobleigh, Vogel et al. 1999) (Slamon, Leyland-Jones et al. 2001) et ont été validés pour leur efficacité lorsque HER2 est surexprimé au niveau des tumeurs (Romond, Perez et al. 2005). En parallèle, on peut citer des

Ac dirigés contre le CD33, exprimé notamment lors des leucémies myéloïdes aiguës, qui ont déjà été approuvés dans leur utilisation thérapeutique, en conjugaison avec une drogue anti-tumorale (Sievers, Appelbaum et al. 1999). Un Ac anti-CD52 (Alemtuzumab), capable de fixer le complément a également été approuvé en tant que thérapie lors des leucémies lymphocytaires chroniques (Lundin, Kimby et al. 2002). Les mécanismes expliquant l'activité anti-tumorale de ces Ac peuvent être divers. On peut par exemple citer leur capacité à activer la réponse au complément ou à médier la réponse cytotoxique cellulaire (ADCC) détruisant les cellules tumorales via les cellules NK ou encore les macrophages et leurs Fc récepteurs (Steplewski, Lubeck et al. 1983). Les Ac peuvent également fixer le Fc récepteur des DC pour promouvoir leur fonction d'APC (Amigorena 2002; Dhodapkar, Dhodapkar et al. 2008).

Les Ac monoclonaux peuvent activer (agonistes) ou supprimer (antagonistes) les fonctions moléculaires de la cible qu'ils fixent et ainsi être respectivement immunostimulants ou immunorépresseurs. On peut citer en exemple, un Ac qui augmente la réponse anti-tumorale aux antigènes tumoraux en bloquant les fonctions du co-récepteur des cellules T : *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA-4) et qui apporte des résultats prometteurs (Egen, Kuhns et al. 2002) notamment en provoquant des régressions tumorales chez certains patients atteints de mélanomes métastatiques (Phan, Yang et al. 2003; Maker, Phan et al. 2005). Très récemment, il a été montré que l'administration des Ac anti-CTLA-4 chez ces patients avec des régressions tumorales est corrélée avec une infiltration massive de CTL CD8⁺ au sein de lésions tumorales (Ribas, Comin-Anduix et al. 2009). Cependant des progrès restent encore à être faits sur ces immunothérapies à base d'Ac. En témoigne notamment, certains échecs comme lors de cet essai clinique de phase I en 2006 lors duquel un Ac monoclonal immunostimulant anti-CD28 était testé et a entraîné une toxicité sévère (dont une inflammation systémique aiguë) chez les volontaires traités (Suntharalingam, Perry et al. 2006).

c. Transfert adoptif de lymphocytes T

Cette approche consiste en l'identification *ex vivo* de lymphocytes autologues avec une activité anti-tumorale qui seront ensuite transférés dans des patients, avec des facteurs appropriés pour stimuler leur expansion mais aussi leur survie *in vivo* (Rosenberg, Restifo et al. 2008).

L'équipe de Rosenberg S.A a énormément travaillé sur les thérapies basées sur le transfert adoptif de cellules T (ACT). Plusieurs essais cliniques basés sur cette thérapie ACT depuis 1988 (Rosenberg, Packard et al. 1988), ont contribué à la classer aujourd'hui comme le traitement le plus efficace chez des patients souffrant de mélanomes métastatiques (Dudley, Wunderlich et al. 2002). En effet, ils ont pu montrer que 50% des patients atteints de mélanomes métastatiques, réfractaires à tout autres types de traitements, répondent par des régressions tumorales à une lymphodéplétion par chimiothérapie suivie d'une thérapie d'ACT (Dudley, Wunderlich et al. 2005). D'autre part on peut citer à titre d'exemple des essais réalisés par cette équipe visant à stimuler directement *in vivo* l'immunité adaptative. Des vaccinations avec des antigènes spécifiques tumoraux, ont été testées mais il semble malheureusement que très peu d'entre elles ne soient capables de provoquer des régressions de cancer solides (Rosenberg, Yang et al. 2004). Des résultats récents montrent que malgré la large expansion des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques des tumeurs *in vivo* suite à une vaccination par des peptides tumoraux, aucun effet inhibiteur sur la progression de mélanome ne peut être obtenu chez les patients (Rosenberg, Sherry et al. 2005). L'approche d'ACT présente le gros avantage de permettre des manipulations génétiques au niveau des lymphocytes T de l'hôte, visant à leur conférer des améliorations de certaines propriétés, avant de les retransférer. En effet, récemment, l'équipe de Rosenberg SA a démontré pour la première fois, qu'une thérapie ACT utilisant des lymphocytes T transduits avec un TCR

reconnaissant un antigène tumoral spécifique, peut entraîner une régression tumorale chez les patients atteints de mélanomes (Morgan, Dudley et al. 2006).

De plus, on peut noter que les thérapies à base d'ACT ont été montrées comme pouvant être efficaces chez des patients souffrant de cancers exprimant des antigènes viraux. Par exemple, on peut citer des études utilisant des lignées de lymphocytes T spécifiques d'antigènes à l'Epstein Barr virus (EBV), qui suite à un ACT ont entraîné une régression tumorale de lymphomes chez des patients (Rooney, Smith et al. 1995; Rooney, Smith et al. 1998) ou plus récemment des rémissions partielles voire complètes de carcinomes nasopharyngiaux (Comoli, Pedrazzoli et al. 2005; Straathof, Bollard et al. 2005).

Cependant, le problème majeur de ces thérapies ACT reste que ce sont des traitements très personnalisés, difficiles à mettre en place avec les pratiques oncologiques actuelles. Elles nécessitent un travail et une expertise en laboratoire très développés et seraient plutôt délivrés en tant que « service ». Or, il s'avère que pour l'instant, les compagnies pharmaceutiques détenant le monopole du marché des thérapies anti-cancers préfèrent probablement commercialiser des drogues faciles à produire et à administrer en routine ce qui limite encore l'expansion des thérapies utilisant une approche ACT.

Les lymphocytes T $\gamma\delta$, que nous décrivons par la suite en détail dans les parties B et C de cette introduction sont activement étudiés à l'heure actuelle pour la mise en place de nouvelles thérapies. Comme nous le verrons, ces lymphocytes T $\gamma\delta$, à l'interface du système immunitaire inné et adaptatif, possèdent de nombreuses caractéristiques (notamment une reconnaissance de ligand indépendante du CMH contrairement aux lymphocytes T $\alpha\beta$) qui leur confèrent un potentiel prometteur pour l'immunothérapie des cancers.

d. Thérapie du cancer colorectal

Les thérapies conventionnelles, dont la chimiothérapie, restent les plus utilisées à l'heure actuelle contre les cancers colorectaux. En effet, le 5-Fluorouracile (5FU), un analogue de nucléoside bloquant la réplication de l'ADN, est l'agent chimiothérapeutique le plus couramment utilisé dans les thérapies de cancer coliques (1998). On peut citer en exemple d'autres drogues dont, la capecitabine (un fluoropyrimidine) qui a démontré une efficacité similaire au 5FU lors d'une étude clinique récente de phase III (Arkenau, Arnold et al. 2008). De même, l'irinotecan, un dérivé de la capecitabine peut être utilisé en première ligne de traitement (Conti, Kemeny et al. 1996) ou en seconde ligne suite à un échec des traitements 5FU (Rougier, Van Cutsem et al. 1998).

Le cancer colorectal peut être traité par immunothérapie et notamment par l'utilisation d'Ac monoclonaux. On peut citer un Ac dirigé contre des facteurs de croissance de l'endothélium (VEGF) (Bevacizumab) qui a été montré, en combinaison avec des drogues chimiques (comme l'irinotecan ou le 5'fluorouracile), comme capable d'augmenter la survie des patients souffrant de cancers colorectaux métastatiques (Hurwitz, Fehrenbacher et al. 2004). Il existe également un Ac dirigé contre le récepteur à l'EGF exprimé par les cellules tumorales colorectales, le Cetuximab. Il posséderait une activité clinique significative (caractérisée entre autre par une meilleure survie des patients), seul ou en combinaison avec une chimiothérapie à l'irinotecan (Cunningham, Humblet et al. 2004). Très récemment des essais de cliniques de Phase III combinant plusieurs chimiothérapies et anticorps différents ont démontré des effets bénéfiques chez les patients avec notamment une augmentation du taux de survie (Tol, Koopman et al. 2008; Hecht, Mitchell et al. 2009).

B. LYMPHOCYTES T GAMMA DELTA ($\gamma\delta$) HUMAINS

Pendant longtemps, on a pensé que les lymphocytes T matures n'étaient constitués que de lymphocytes T alpha beta ($\alpha\beta$). On distinguait les lymphocytes T $CD4^+$ ou T $CD8^+$ capables de reconnaître des antigènes peptidiques liés aux molécules de classe I ou II du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH I ou II), résidant dans les organes lymphoïdes secondaires et jouant un rôle central dans l'immunité adaptative.

Depuis une vingtaine d'années, d'autres lymphocytes appelés T non conventionnels : les lymphocytes T gamma delta ($\gamma\delta$) sont venus augmenter la diversité des sous-populations de lymphocytes T connues. Ces lymphocytes T $\gamma\delta$ possèdent des caractéristiques exceptionnelles qui les impliquent dans une variété étendue de réponses immunitaires. Ils sont définis par : 1) un récepteur de cellule T (TCR), constitué d'une chaîne γ et d'une chaîne δ spécifique d'un antigène, qui les rattache au système immunitaire acquis. 2) une reconnaissance antigénique indépendante du CMH I ou II et pas de nécessité d'expression des corécepteurs $CD4$ ou $CD8$ $\alpha\beta$, 3) un phénotype activé ou mémoire et parfois une auto-réactivité, leur conférant des fonctions effectrices rapides tout comme le système immunitaire inné, 4) des voies de différenciations différentes de celles des lymphocytes T conventionnels, 5) enfin une situation en minorité dans les sites de localisations typiques des lymphocytes (comme la rate et les ganglions lymphatiques) et une concentration plutôt au niveau des épithéliums et du foie. De par ces caractéristiques, on considère ces cellules comme étant à l'interface du système immunitaire inné et acquis (Kronenberg and Havran 2007).

1. Les Populations de Lymphocytes T $\gamma\delta$

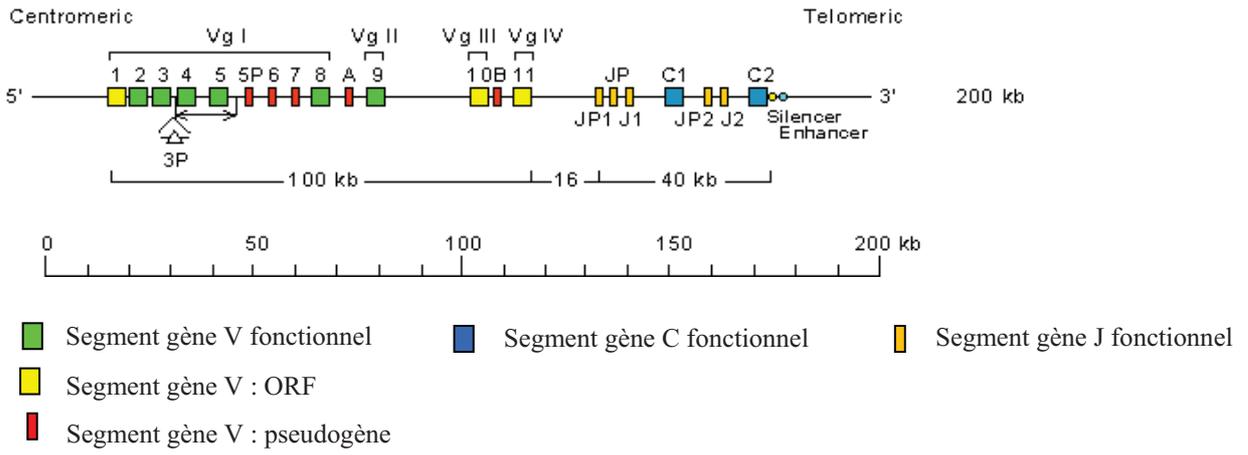
1.1. Le Récepteur des cellules T $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$)

Il y a maintenant 25 ans que la structure permettant la reconnaissance de l'antigène chez les lymphocytes T $\gamma\delta$, le TCR $\gamma\delta$, a été identifiée (Saito, Kranz et al. 1984). Le TCR $\gamma\delta$ comprend une chaîne gamma (γ) et une chaîne delta (δ). Les protéines constituant ces chaînes sont codées par des gènes réarrangés au niveau somatique à partir d'un pool de segments variables (V), de diversité (D), de jonction (J) et constant (C), lors de la maturation intrathymique des cellules T.

a. Organisation génétique

Chez l'homme, la famille de gènes codant pour la chaîne γ (environ 160kb) est située sur le chromosome 7. Au niveau de ce locus, γ il a été décrit 14 gènes variables (V) dont 6 seraient potentiellement fonctionnels ($V\gamma_2$, 3, 4, 5, 8 de la famille $V\gamma_1$ et $V\gamma_9$ de la famille $V\gamma_2$), 5 éléments jonctionnels (JP1, JP, J1, JP2 et J2) et enfin 2 gènes codant pour la région constante ($C\gamma_1$ et $C\gamma_2$) (Figure 7a). (Lefranc and Rabbitts 1990). Le locus δ (1000kb) est situé sur le chromosome 14, à l'intérieur du locus codant pour la chaîne α du TCR $\alpha\beta$, entre des segments $V\alpha$ et $J\alpha$. Il contient 8 segments variables (TCRV δ) dont 5 peuvent potentiellement se réarranger avec la région constante α , 4 éléments de jonctions J (TCRDJ 1 à 4), 3 segments de diversité D (TCRD 1 à 3) et une unique région constante C (TCRDC) (figure 7b).

a. Locus de la chaîne γ



b. Locus de la chaîne δ

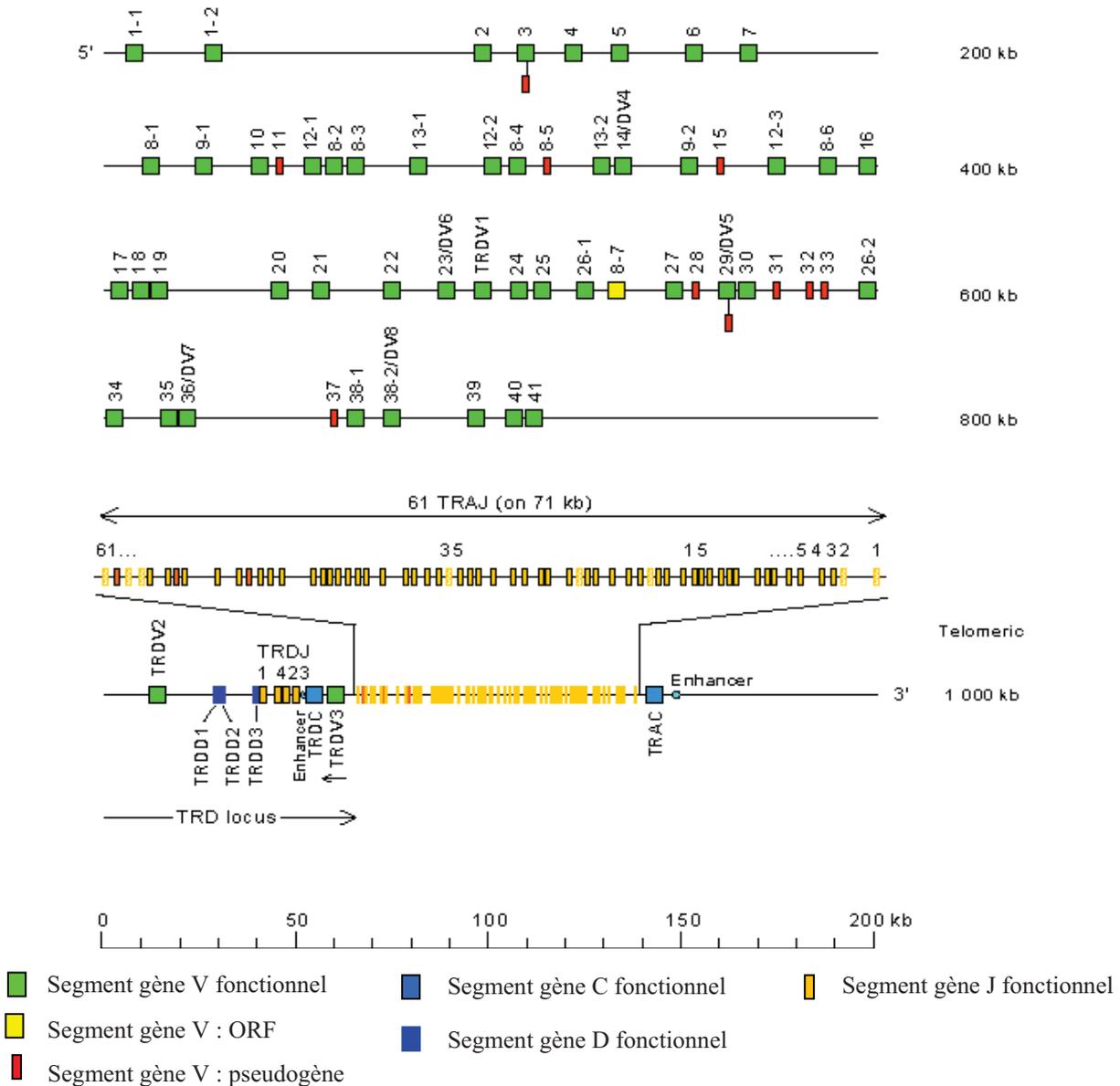


Figure 7 : Organisation des gènes codant pour a) la chaîne γ et b) la chaîne δ . Extrait de la base de donnée : « the international ImMunoGeneTics information system® » <http://www.imgt.org>,

Comme pour les gènes codant pour les immunoglobulines (Ig) et les TCR α , les gènes codant pour la chaîne δ du TCR s'assemblent via un réarrangement V-D-J alors que ceux codant pour la chaîne γ s'assemblent via un réarrangement V-J. (Brenner, Strominger et al. 1988; Cai and Tucker 2001).

b. Structure des chaînes

La structure des quatre chaînes de TCR existants (α , β , γ , δ) a été très conservée au cours de l'évolution. Le TCR $\gamma\delta$ est un récepteur hétérodimérique comprenant 2 chaînes polypeptidiques contenant chacune 2 domaines Ig-like (caractéristique des immunoglobulines) avec un domaine amino-terminal (NH₂) V et un domaine carboxy-terminal (COOH) C (Figure 8 a et b). On voit sur un exemple de TCR $V\gamma9V\delta2$ que chaque domaine V et C est composé d'un « sandwich » de 2 feuillets β . Les angles entre les domaines restent conservés d'un récepteur à un autre et on remarque que le domaine C est replié vers le domaine V formant un angle d'environ 90° par rapport à un axe vertical (Allison, Winter et al. 2001) (Figure 8a).

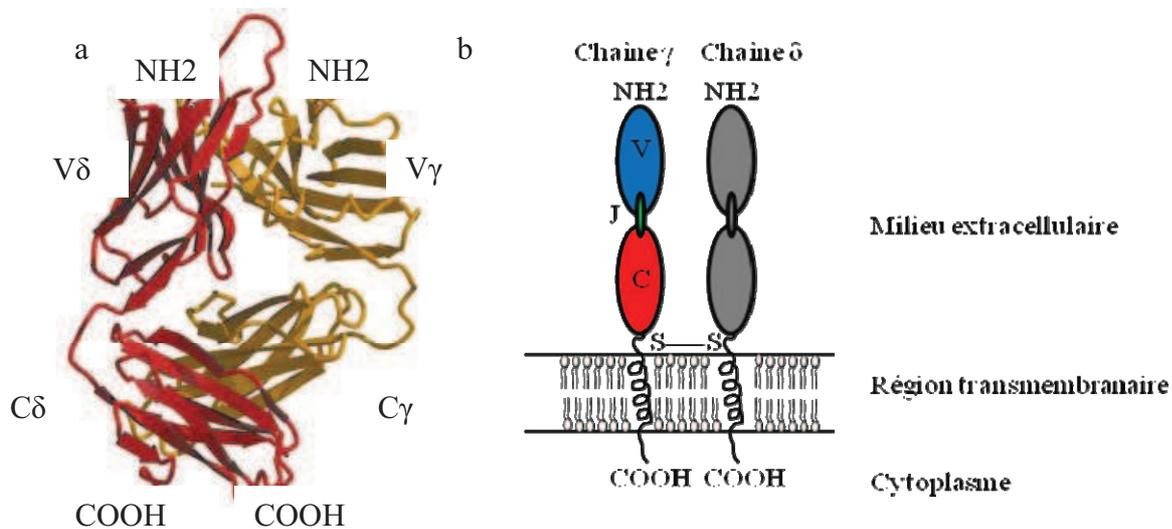


Figure 8 : Structure du TCR $\gamma\delta$. a. Structure tertiaire de la protéine constituant un TCR $V\gamma9V\delta2$ avec en rouge la chaîne δ et en jaune la chaîne γ (Allison, Winter et al. 2001). b. Représentation schématique avec en bleu : Ig-like domaine de la région variable (V), en vert : région jonctionnelle, en rouge : Ig-like domaine de la région constante (C). S-S représente le pont disulfure entre les 2 chaînes.

c. Variabilité

Les propriétés du TCR $\gamma\delta$ sont essentiellement dues à son énorme variabilité. Un faible nombre de régions V et J, comparées aux chaînes α et β ou aux chaînes des Ig, limite la diversité combinatoire des TCR $\gamma\delta$. Cependant, des mécanismes d'excisions et d'additions de nucléotides au niveau des régions jonctionnelles, lors des réarrangements géniques V, D et J, vont conférer au répertoire des lymphocytes T $\gamma\delta$ une diversité largement supérieure au répertoire des lymphocytes T $\alpha\beta$ et des Ig (Davis and Bjorkman 1988). Des régions appelées *complementarity-determining region* (CDR), également retrouvées au niveau des TCR $\alpha\beta$ et des Ig, représentent les sites de reconnaissances des antigènes. Les régions boucles CDR1 et CDR2 sont codées par des segments de gènes V. CDR3 quant à elle est codée au niveau des jonctions (V-J) et est constituée des séquences de longueurs variables. Les CDR3 de la chaîne δ sont plutôt longues et variables alors que les CDR3 de la chaîne γ sont courtes et

conservées. On peut noter que la longueur des boucles CDR3 dans les TCR $\gamma\delta$ est plus proche de celles des CDR3 d'anticorps que celle des CDR3 des TCR $\alpha\beta$ ce qui pourrait leur conférer une caractéristique de reconnaissance antigénique directe proche de celle des Ig. (Rock, Sibbald et al. 1994; Schild, Mavaddat et al. 1994).

1.2. Répartition dans l'organisme

a. Généralités

Chez l'adulte, les lymphocytes T $\gamma\delta$ représentent la population lymphocytaire CD3⁺ minoritaire dans le sang périphérique chez des individus sains (1 à 10%) (Groh, Porcelli et al. 1989) et sont peu représentés dans les organes lymphoïdes secondaires. En revanche, il semblerait que ces cellules T $\gamma\delta$ peuplent les épithéliums (peau et muqueuses intestinales entre autres). Cependant, les cellules T CD3⁺ demeurant majoritaires dans les épithéliums humains restent les lymphocytes T $\alpha\beta$ contrairement aux épithéliums murins essentiellement peuplés de lymphocytes T $\gamma\delta$ (Havran and Boismenu 1994). Ainsi, les tissus épithéliaux présentent un système immunitaire unique au sein duquel les lymphocytes T $\gamma\delta$, faisant partis des lymphocytes T intraépithéliaux (appelés IELs), seraient des acteurs cruciaux grâce à des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles exceptionnelles (Kaufmann 1996).

On distingue différentes sous-populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ en fonction des parties V des chaînes de leur TCR. Dans cette thèse, on les classera en 2 sous-populations: les lymphocytes T $\gamma\delta$ exprimant la chaîne V δ 2 (toujours associée à la chaîne V γ 9) et tous les autres lymphocytes T $\gamma\delta$, concernés dans mon projet de thèse, n'exprimant pas cette chaîne V δ 2 regroupés sous le terme V δ 2 négatifs (V δ 2^{neg}). Ces 2 types de sous-populations se répartissent différemment dans les tissus de l'organisme (figure 9).

b. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2

On les retrouve majoritairement:

■ Dans la circulation sanguine

En effet, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 y représentent 50 à 95% des lymphocytes T $\gamma\delta$ circulants (Porcelli, Brenner et al. 1991; Kabelitz, Wesch et al. 1999). Cette prédominance peut être expliquée par une sélection et une expansion périphérique considérable de ces sous-populations médiée par des antigènes spécifiques dès l'âge de 6-10 ans (Parker, Groh et al. 1990). De plus l'expression de marqueurs mémoire tel le CD45RO en surface de ces cellules T V δ 2V γ 9 circulantes confirme leur état d'activation suite à un contact avec l'antigène (Miyawaki, Kasahara et al. 1990).

■ Dans les organes lymphoïdes secondaires

Au niveau des ganglions, des amygdales et des plaques de Peyer, les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont minoritaires (1% à 15% des lymphocytes T CD3⁺ totaux). La majorité de ces lymphocytes T $\gamma\delta$ expriment la chaîne V δ 2 (Falini, Flenghi et al. 1989).

Les sous-populations V δ 2⁺ sont aussi présentes :

■ Dans le thymus postnatal

Au niveau du thymus postnatal, les cellules T $\gamma\delta$ constituent une population minoritaire (0,5% à 16% des CD3 thymiques). Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 y représentent seulement 10 à 15% des cellules CD3⁺ (Groh, Porcelli et al. 1989).

■ Dans le foie

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ y représentent 5% des cellules T CD3⁺ et expriment essentiellement la chaîne V δ 2 associée à la chaîne V γ 9 (Seki, Abo et al. 1990)

c. Les lymphocytes T V δ 2^{neg}

Les lymphocytes T V δ 2^{neg} sont essentiellement représentés au niveau des tissus épithéliaux et appelés lymphocytes « résidants ». Parmi eux, les lymphocytes T exprimant la chaîne V δ 1 associée à différents V γ forment une part significative des IELs (Hayday, Theodoridis et al. 2001).

■ Dans l'épithélium intestinal

Les lymphocytes TV δ 1⁺ sont majoritaires parmi les lymphocytes T $\gamma\delta$ au niveau des épithéliums de l'intestin grêle (Holtmeier, Pfander et al. 2001). Ils s'y distinguent notamment par l'expression d'un marqueur CD8 $\alpha\alpha$ (Deusch, Luling et al. 1991). La majorité de ces IELs $\gamma\delta$ expriment les chaînes V δ 1 et V γ 8 (Soderstrom, Bucht et al. 1994). Des lymphocytes T exprimant la chaîne V δ 3 représentent 17% des cellules T intestinales (Peyrat, Davodeau et al. 1995). De plus, au niveau du colon, les lymphocytes T $\gamma\delta$ pourraient représenter environ 40% des IELs (Ullrich, Schieferdecker et al. 1990) et sembleraient exprimer essentiellement la chaîne V δ 1 (Chowers, Holtmeier et al. 1994; Holtmeier, Chowers et al. 1995).

■ Au niveau de la peau

1 à 15% des IELs CD3⁺ du derme seraient des lymphocytes T $\gamma\delta$ (Groh, Porcelli et al. 1989). Les lymphocytes T V δ 1⁺ y sont retrouvés le plus fréquemment (Holtmeier, Pfander et al. 2001). On peut noter que chez la souris, il existe au niveau de l'épiderme une population particulière de lymphocytes T V γ 5V δ 1 appelée cellules T dendritiques épidermales (DETC), qui n'est pas retrouvée chez l'homme et qui est importante pour l'immunosurveillance locale (Sharp, Jameson et al. 2005).

Les sous-populations V δ 1⁺ sont également majoritaires :

■ Dans le thymus postnatal

Les lymphocytes exprimant la chaîne V δ 1 représenteraient 65% des cellules T $\gamma\delta$ totales (Lanier, Ruitenberg et al. 1988).

En revanche ces lymphocytes T V δ 2^{neg} sont peu représentés dans les organes lymphoïdes secondaires.

Cependant, ils sont prépondérants :

■ Dans la rate

En effet, la rate est l'organe lymphoïde qui contient le plus de lymphocytes T $\gamma\delta$ (15% à 20% des cellules T CD3⁺). C'est au niveau de la pulpe rouge et de la zone marginale de cet organe que l'on trouve les lymphocytes T $\gamma\delta$ dont 70% expriment la chaîne V δ 1 (Falini, Flenghi et al. 1989). De plus 50% de ces cellules T $\gamma\delta$ spléniques expriment le marqueur CD8 (Bucy, Chen et al. 1989).

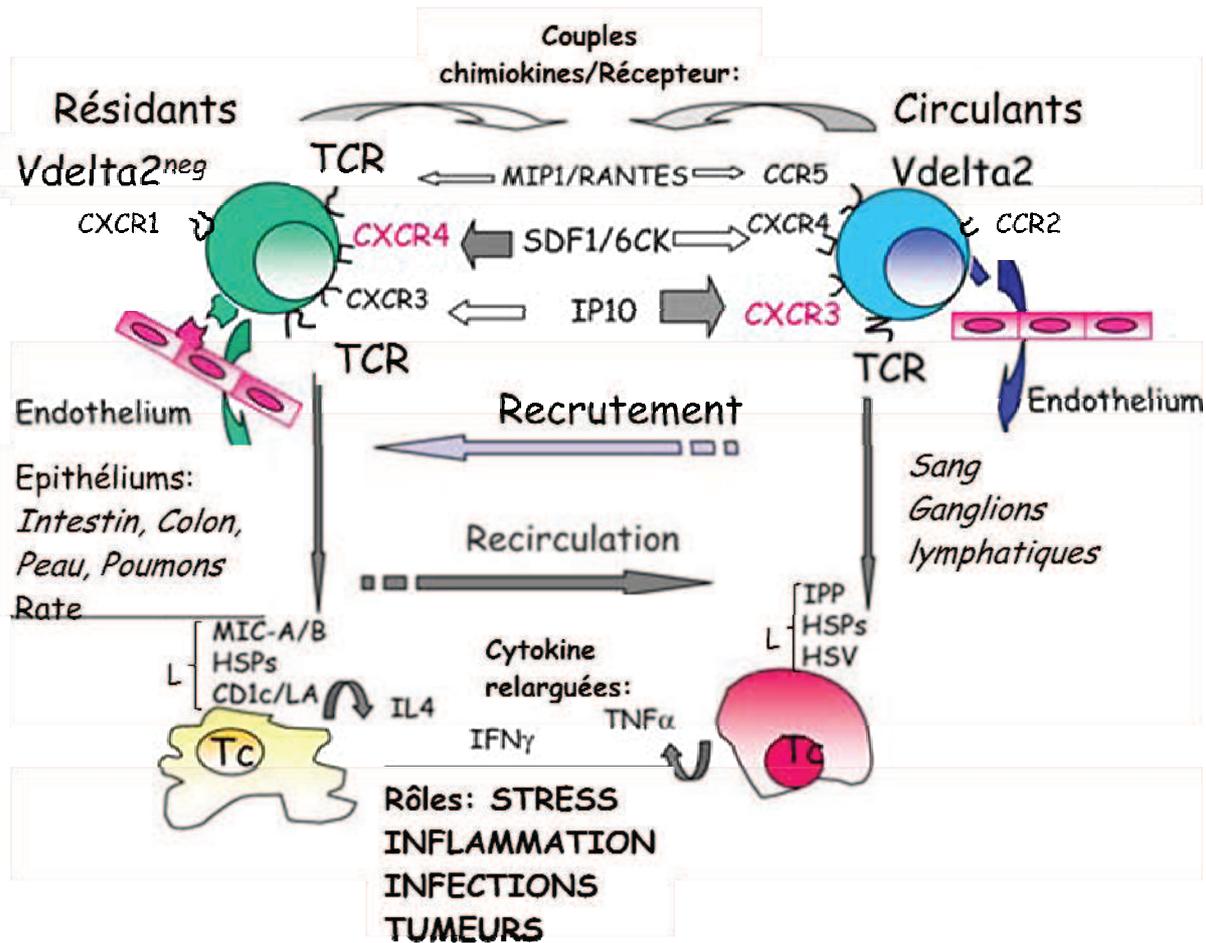


Figure 9 : Caractéristiques (fonctionnelles, phénotypiques et migratoires) des 2 types de sous-populations lymphocytaires T $\gamma\delta$: V γ 9V δ 2 (Vdelta2) et V δ 2^{neg} (Vdelta2^{neg}). D'après (Poggi, Carosio et al. 2004) avec L=ligand, Tc=cellule cible, LA= Ag lipidique.

2. Fonctions des lymphocytes T $\gamma\delta$

Les fonctions physiologiques des lymphocytes T $\gamma\delta$ sont restées longtemps énigmatiques d'autant plus que comme nous l'avons décrit précédemment, ceux-ci constituent une population T minoritaire dans les sites de localisations préférentielles des cellules T : les organes lymphoïdes périphériques.

2.1 La reconnaissance de ligands spécifiques

a. Généralités

Deux principales caractéristiques différencient la reconnaissance des ligands entre les lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels et les lymphocytes T $\gamma\delta$. D'une part, la majorité des cellules T $\gamma\delta$ ne reconnaîtrait pas des protéines présentées, sous forme de peptides antigéniques, par des APC mais des antigènes « non conventionnels » tels que par exemple des métabolites microbiens phosphorylés ou encore des antigènes lipidiques. D'autre part, il a été montré que les ligands des lymphocytes T $\gamma\delta$ ne sont pas présentés par les molécules classiques du CMH I et II (Moingeon, Ythier et al. 1986). La seule étude structurale d'un TCR gamma-delta avec son ligand a été réalisée avec le TCR du clone T $\gamma\delta$ murin G8 et son ligand la molécule murine non classique du CMH T22 (Adams, Chien et al. 2005). Cette étude démontre une

reconnaissance de la molécule du CMH en tant que protéine intacte *via* des contacts avec la région CDR3 de la chaîne δ du TCR. De ce fait, la reconnaissance spécifique des antigènes par le TCR $\gamma\delta$ ressemblerait à celle effectuée par les Ig que par les lymphocytes T $\alpha\beta$ (Hayday 2000). Cependant récemment des arguments, sur lesquels nous reviendrons plus tard (dans le chapitre reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T $\gamma\delta$), soutiennent que les TCR $\gamma\delta$ pourraient éventuellement suivre le paradigme des TCR $\alpha\beta$ et reconnaître des Ag présentés par des molécules (Hayday 2009).

b. Ligands des lymphocytes T V γ 9V δ 2 (figure 9)

■ Les phosphoantigènes

En 1990, Pfeffer et al ont mis en évidence que les lymphocytes T V γ 9V δ 2 reconnaissent des molécules de faible poids moléculaire non-peptidiques (Pfeffer, Schoel et al. 1990). Constant et al ont montré qu'ils pourraient notamment s'agir de différents antigènes de nature non peptidiques de *Mycobacterium tuberculosis* (Constant, Davodeau et al. 1994). Plusieurs études ont ensuite montrées que les lymphocytes T $\gamma\delta$ reconnaît des composés phosphorylés tel que l'isopentenyl pyrophosphate (IPP) (Tanaka, Morita et al. 1995), le 3-formyl-butyl-PP (Belmant, Espinosa et al. 1999) ou encore le 4-hydroxy-3-méthyl-but-2-ényl pyrophosphate (HMB-PP) (Hintz, Reichenberg et al. 2001). Ces phosphoantigènes sont issus de la voie de synthèse des isoprénoïdes (vitamines, cholestérol et hormones stéroïdes), existant chez tous les organismes, qui conduit à la formation de l'IPP et du DMAPP (diméthylallylpyrophosphate) (Jomaa, Feurle et al. 1999). L'HMB-PP étant un intermédiaire spécifique des procaryotes et de plusieurs parasites (Eberl, Hintz et al. 2003). Il est aujourd'hui connu qu'il faut une concentration 10 000 fois plus élevée d'IPP que d'HMB-PP pour activer les lymphocytes T V γ 9V δ 2 (Poupot and Fournie 2004). De plus, une étude récente a montré que le taux de production de l'HMB-PP, à partir de différentes bactéries détermine l'importance de l'expansion des cellules T V γ 9V δ 2 humaines aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* après un transfert dans des souris SCID (Puan, Jin et al. 2007). Comme nous l'avons précédemment évoqué, il pourrait exister une reconnaissance directe des phosphoantigènes par le TCR V γ 9V δ 2. Cependant, on ne peut pas exclure que les lymphocytes T V γ 9V δ 2 pourraient reconnaître un antigène non peptidique présenté par un élément en surface de cellules (comme des monocytes par exemple) (Miyagawa, Tanaka et al. 2001). Par exemple, l'HMB-PP pourrait être présenté par une APC au TRC V γ 9V δ 2 de macaques (Wei, Huang et al. 2008).

Nous le reverrons dans le chapitre des immunothérapies anti-cancer avec des lymphocytes T $\gamma\delta$ mais les niveaux de production d'IPP dans les cellules eucaryotiques peuvent être modulés expérimentalement par l'utilisation des alkylamines (Thompson, Rojas-Navea et al. 2006) ou des aminobisphosphonates (Kunzmann, Bauer et al. 2000). Ces molécules pourraient provoquer une stimulation des lymphocytes T V δ 2V γ 9 par une action d'inhibition de la farnesyl pyrophosphate synthétase (FPPS), en aval de l'IPP dans la voie de synthèse des isoprénoïdes, provoquant ainsi une accumulation intracellulaire d'IPP.

■ Le complexe Apolipoprotéine A1 (ApoA1) / Adénosine triphosphate Synthase (AS)

Récemment, il a été montré que les lymphocytes T V γ 9V δ 2 seraient capables de reconnaître le complexe enzymatique ApoA1/AS. Celui-ci est normalement situé dans la membrane interne mitochondriale et peut être transloqué en surface de certaines cellules tumorales (Scotet, Martinez et al. 2005). Une association entre les 2 protéines ApoA1/AS

semble nécessaire car ni des protéines purifiées ApoA, ni des billes coatées avec AS purifiée seule ne suffisent pour activer des lymphocytes T V γ 9V δ 2. L'interaction moléculaire entre le TCR V γ 9V δ 2 et l'ApoA1/AS a été démontrée par résonance plasmonique de surface (Biacore). Le mécanisme de translocation d'AS au niveau de la membrane plasmique demeure incertain. Il pourrait notamment consister en la fusion de la membrane plasmique avec la membrane interne mitochondriale au cours du processus d'apoptose. La reconnaissance d'AS pourrait alors permettre aux lymphocytes T $\gamma\delta$ de détecter les cellules stressées ou pré-apoptotiques (Thedreuz, Sabourin et al. 2007).

■ Les Heat Shock Protein (HSP)

Ces protéines sont exprimées en surface de cellules stressées ou transformées. L'augmentation de leur expression en surface de cellules tumorales a été corrélée avec l'activation de lymphocytes T V γ 9V δ 2 (Fisch, Malkovsky et al. 1990). Cependant ces résultats n'ont jamais été confirmés et la dépendance du TCR dans ce processus n'a jamais été démontrée. Il a été montré que les lymphocytes T V γ 9V δ 2 ne sont pas activés par des HSP recombinantes ou des anticorps anti-HSP (Fisch, Moris et al. 2000).

■ Superantigène

Un superantigène connu pour les lymphocytes T $\alpha\beta$, l'entérotoxine A (SEA), a été montré comme étant reconnu par tous les lymphocytes T $\gamma\delta$ exprimant la chaîne V γ 9 (Rust, Verreck et al. 1990). La stimulation par SEA se ferait indépendamment de la chaîne V δ , ainsi les populations T V δ 2V γ 9 mais aussi V δ 1V γ 9 répondent au superantigène (Morita, Li et al. 2001).

c. Ligands des lymphocytes T V δ 2^{neg}

Ils sont bien moins connus que les ligands des lymphocytes T V γ 9V δ 2. Jusqu'à aujourd'hui, tous les ligands des lymphocytes T V δ 2^{neg} identifiés sont des molécules non polymorphiques apparentées aux molécules du CMH comme MICA/B, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d. Cependant aucune interaction directe entre les TCR V δ 2^{neg} et leurs ligands n'a jamais été démontrée.

■ MICA/MICB

Ces molécules, induites par des stress cellulaires, sont exprimées dans des conditions physiologiques normales en surface de cellules épithéliales et de fibroblastes (Zwirner, Dole et al. 1999). Elles appartiennent à la superfamille des immunoglobulines et sont des molécules du CMH proches de la classe I. Les cellules T V δ 1⁺ seraient capables de reconnaître MICA et MICB de manière TCR-dépendante, comme nous le décrivons plus tard (Groh, Steinle et al. 1998). Qi et son équipe ont montrés que des molécules MICA recombinantes pouvaient spécifiquement induire la prolifération de lymphocytes T V δ 1⁺ provenant de carcinomes ovariens ou coliques (Qi, Zhang et al. 2003). Ces lymphocytes T V δ 1⁺ présentent ensuite une activité cytolytique forte vis-à-vis de lignées tumorales exprimant MICA dont l'efficacité est modulée par le niveau d'expression de MICA en surface des cellules.

Les ligands MIC peuvent également être reconnus par les lymphocytes T $\gamma\delta$ (aussi bien V δ 2⁺ que V δ 2^{neg}) *via* un autre récepteur appartenant à la famille des récepteurs des NK (NKR) : la molécule NKG2D sur laquelle nous reviendrons plus en détail plus tard. Un signal co-stimulateur est fournit aux cellules T $\gamma\delta$ suite à l'engagement de NKG2D avec les molécules MIC (Bauer, Groh et al. 1999). Des exemples chez la souris montrent que H60c et

Rae-1, des molécules ligands du NKG2D murin ressemblant structurellement au MICA, peuvent co-stimuler des DETC V γ 5V δ 1 *in vitro* (Girardi, Oppenheim et al. 2001; Whang, Guerra et al. 2009).

Les molécules MIC pourraient donc délivrer à la fois un signal aux TCR $\gamma\delta$ et aux molécules co-stimulatrices NKG2D.

■ Molécules CD1

Il existe 5 protéines CD1 (CD1a, b, c, d et e). Cette molécule apparentée aux molécules du CMH I peut présenter des lipides ou des glycolipides d'origine bactériens ou synthétiques et est généralement exprimée sur les cellules dendritiques immatures (Bricard and Porcelli 2007). Plusieurs études ont d'abord proposé que le CD1c soit reconnu par les lymphocytes T $\gamma\delta$ V δ 1⁺ retrouvés dans l'intestin ou dans la rate (Porcelli, Brenner et al. 1989; Faure, Jitsukawa et al. 1990). 10 ans plus tard, une étude montre que 2 lignées cellulaires T V δ 1⁺ pourraient proliférer en présence de cellules exprimant CD1c et lyser spécifiquement des cellules CD1c⁺ *via* une cytotoxicité médiée par la perforine et Fas (Spada, Grant et al. 2000). Même si Spada et al ont montré par du transfert de TCR dans des JRT3 une reconnaissance du CD1c par le TCR V δ 1, il n'existe pas encore de preuves moléculaires. Plus récemment Russano et son équipe ont montré que la prolifération et l'activité cytotoxique *in vitro* de cellules T V δ 1⁺ provenant du duodénum sont inhibées en présence d'Ac anti-CD1 (Russano, Bassotti et al. 2007).

■ Autres ligands

Les lymphocytes T V δ 2^{neg} pourraient reconnaître d'autres molécules du soi induites en surface des cellules lors de stress. Par exemple, des molécules d'origine non virales, exprimées en surface de lymphocytes B suite à une infection par l'EBV permettraient la prolifération *in vitro* de lymphocytes T V δ 1⁺ (Hacker, Kromer et al. 1992). De plus, des études effectuées au sein de notre équipe montrent que des sous-populations V δ 2^{neg} (surtout V δ 1, V δ 3) s'expandent largement dans le sang de transplantés développant une infection à cytomégalovirus (CMV) (Dechanet, Merville et al. 1999). Des clones T V δ 2^{neg} isolés de ces patients présentent une réactivité TCR-dépendante contre des fibroblastes infectés par le CMV *in vitro* (Dechanet, Merville et al. 1999). Plus récemment, l'équipe du Dr Déchanet Merville a démontré que ces clones V δ 2^{neg} étaient cross-réactifs contre le CMV et contre des cellules de carcinomes coliques, suggérant ainsi l'existence d'un ligand commun entre les cellules infectées par le CMV et les cellules tumorales (Halary, Pitard et al. 2005). Les recherches actuelles de l'équipe se concentrent sur la recherche de ce ligand induit par le stress, encore inconnu mais qui serait d'origine protéique (perdu suite à des traitements protéases sur les cellules cibles).

Enfin, à titre d'exemple de ligands du soi, on peut également citer des travaux concernant des lymphocytes T $\gamma\delta$ murins, qui restent bien différents des lymphocytes T $\gamma\delta$ humains, montrant que des lymphocytes T V δ 6 (mis aussi V δ 2) répondraient à différents phospholipides (tel que la cardiolipine et l'apolipoprotéine H) (Born, Vollmer et al. 2003).

2.2. Rôle des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans diverses pathologies

Comme nous venons de le voir, les éléments du TCR $\gamma\delta$ semblent avoir évolué pour reconnaître directement des antigènes impliqués dans les maladies infectieuses mais aussi dans certains stades critiques de l'organisme lors de différents stress cellulaires (transformation tumorale par exemple) (Janeway, Jones et al. 1988) (figure 9).

Nous décrirons plus en détail les rôles des sous-populations $V\delta^{neg}$ auxquelles s'intéresse ma thèse. De plus, le rôle des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans les cancers sera décrit dans la dernière grande partie C de l'introduction.

a. Rôle des lymphocytes T $V\gamma9V\delta2$

Des observations d'expansions de lymphocytes T $V\delta2^+$ dans le sang de patients infectés par des bactéries par rapport à des patients sains ainsi que des études *in vitro* et dans des modèles animaux ont permis d'impliquer ces sous-populations lymphocytaires $V\delta2^+$ dans l'immunité anti-bactérienne. On peut citer par exemple, les observations d'expansions périphériques de lymphocytes T $V\delta2^+$ lors des infections à *Mycobacterium tuberculosis* (Balbi, Valle et al. 1993; Chen 2005) mais aussi d'autres infections bactériennes comme la tularémie à *Francisella tularensis* (Sumida, Maeda et al. 1992) (Poquet, Kroca et al. 1998), le choc septique à *Salmonella typhi* (Hara, Mizuno et al. 1992), la brucellose à *Brucella melitensis* (Bertotto, Gerli et al. 1993), la listériose à *Listeria monocytogenes* (Jouen-Beades, Paris et al. 1997).

De même, les lymphocytes T $V\delta2^+$ ont été démontré comme étant augmentés dans la circulation sanguine des patients lors de certaines infections parasitaires comme l'infection à *Plasmodium Falciparum* (ou paludisme) (Ho, Webster et al. 1990; Roussilhon, Agrapart et al. 1990) mais aussi la toxoplasmose aigüe (Scalise, Gerli et al. 1992) ou encore la leishmaniose viscérale (Raziuddin, Telmasani et al. 1992)

Enfin, des expansions *in vitro* de lymphocytes T $V\gamma9V\delta2$ provenant de patients infectés par différent virus impliqueraient ces sous-populations notamment dans les infections à Herpès simplex virus (HSV). De plus des lymphocytes T $V\gamma9V\delta2$ isolés de patients infectés par HSV-1 pourraient lyser *in vitro* des cellules infectées par HSV (1 et 2) (Bukowski, Morita et al. 1994). De la même façon, des lignées de lymphocytes T $V\delta2^+$ issues de patients infectés par le Virus de l'immunodéficience humaine (VIH) pourraient lyser des cellules infectées par le VIH (Wallace, Bartz et al. 1996).

b. Rôle des lymphocytes T $V\delta2^{neg}$

Les contextes pathologiques impliquant les sous-populations de lymphocytes TV $\delta2^{neg}$ décrits jusqu'à aujourd'hui sont différents et plus nombreux que ceux concernant les sous-populations $V\gamma9V\delta2$. En effet, en plus des cancers que nous décrirons plus tard, les lymphocytes T $V\delta2^{neg}$ sont impliqués dans plusieurs pathologies (comme les maladies inflammatoires chroniques et auto-immunes, la réparation tissulaire ainsi que des infections bactériennes, virales et parasitaires) essentiellement par des observations d'augmentations dans la circulation sanguine ou sur des sites infectés et des preuves *ex vivo* mais aucune preuve directe *in vivo* chez les patients n'existe réellement.

■ Implication dans les maladies auto-immunes et inflammatoires

D'une manière générale, plusieurs contextes inflammatoires provoquent des infiltrations de lymphocytes TV $\delta2^{neg}$:

✓ Arthrite

Il a été décrit une infiltration de cellules T $\gamma\delta$ exprimant préférentiellement la chaîne V $\delta1$ et un phénotype activé (CD69 et HLA-DR) dans le liquide synovial de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde (cette maladie auto-immune étant caractérisée par une inflammation

chronique de la membrane synoviale en réponse à une infiltration massive de lymphocytes T) (Bucht, Soderstrom et al. 1992; Olive, Gatenby et al. 1992). De même, dans la maladie de Lyme ou arthrite de Lyme provoquée par l'infection par *Borrelia burgdorferi*, un recrutement des lymphocytes T V δ 1⁺ a été observé au niveau du liquide synovial. Ces cellules V δ 1⁺ recrutées peuvent proliférer *in vitro* en réponse à des lysats de *Borrelia burgdorferi* contrairement à des cellules V δ 1⁺ circulantes de ces mêmes malades ou des lymphocytes T V δ 1⁺ d'individus sains (Glatzel, Entschladen et al. 2002). Cependant la présence de ces infiltrats de lymphocytes T V δ 1⁺ n'a pas été démontrée comme étant corrélée avec une rémission des patients.

✓ **Maladies inflammatoires de l'intestin**

La maladie cœliaque est une maladie auto-immune de l'intestin caractérisée par une atrophie des villosités intestinales suite à une réaction inflammatoire due à une intolérance au gluten. Une expansion de lymphocytes T V δ 1⁺ a été décrite au niveau des muqueuses intestinales inflammatoires chez les patients souffrant de cette pathologie mais n'a cependant pas été corrélée avec la rémission des patients (De Libero, Rocci et al. 1993). Il se pourrait que les lymphocytes T V δ 1⁺ aient des fonctions immunorégulatrices dans cette pathologie. En effet, Bhagat et son équipe ont récemment montré que des IELs exprimant la molécule CD8, le TCR $\gamma\delta$ et le récepteur inhibiteur NKG2A et produisant du TGF- β 1 aurait un rôle immunorégulateur dans la maladie cœliaque en supprimant l'activité cytotoxique des lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8⁺ (Bhagat, Naiyer et al. 2008). De plus, il semblerait que la présence des infiltrats de lymphocytes T V δ 1⁺ au niveau des intestins enflammés pourrait être inversement corrélée avec les complications de la maladie cœliaque (Verbeek, von Blomberg et al. 2008).

On peut également citer la maladie de Crohn, une autre maladie inflammatoire digestive, dans laquelle une expansion locale des lymphocytes V γ 8V δ 1 a été décrite au niveau des granulomes ainsi qu'une augmentation des lymphocytes T V δ 1⁺ dans le sang de patients (Giacomelli, Parzanese et al. 1994; Soderstrom, Bucht et al. 1996).

✓ **Scélérodermie ou sclérose systémique**

Cette maladie auto-immune rare est caractérisée par une fibrose progressive, un épaissement de la peau, et une dysfonction de plusieurs organes internes provoqués par une production de collagène augmentée par les fibroblastes. Durant cette maladie, une augmentation significative des lymphocytes T V δ 1⁺ a été observée dans le sang et la peau des patients mais n'a pas été corrélée avec un état clinique des patients (Giacomelli, Matucci-Cerinic et al. 1998; Bendersky, Markovits et al. 2009). On peut noter que ces cellules V δ 1⁺ semblent présenter un phénotype activé.

■ **Dans les infections**

✓ **Infections virales**

De nombreuses études ont mis en évidence des expansions de lymphocytes T $\gamma\delta$ des sous-populations V δ 2^{neg} dans le sang ou dans les organes de patients infectés par différents virus. On y trouve des éléments concernant 2 virus à ARN (HIV et le virus de l'hépatite C (HCV) ainsi que 3 Herpès virus humain (HHV) (l'Epstein-Bar-Virus (EBV), HHV 8 et CMV) (Poccia, Agrati et al. 2005).

Il existerait une expansion des lymphocytes T V δ 1⁺ durant l'infection à HIV aussi bien dans la circulation sanguine (De Paoli, Gennari et al. 1991) que dans la moelle osseuse (Rossol, Dobmeyer et al. 1998) ou encore dans les muqueuses rectales (Poles, Barsoum et al. 2003). Il semblerait que lors de l'infection VIH, les cellules B puissent activer et faire proliférer les lymphocytes T $\gamma\delta$ (Hyjek, Bartkowiak et al. 1997). De plus, lors des infections

chroniques HIV et HCV, l'expansion des lymphocytes T $V\delta 1^+$ dans différents organes (aussi bien sang, moelle osseuse, muqueuse rectale que foie infecté) est accompagnée par une diminution du pourcentage et un état d'anergie des lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$ circulants (Gougeon, Boullier et al. 1999; Par, Rukavina et al. 2002).

Enfin, comme nous l'avons cité précédemment (chapitre autres ligands des lymphocytes T $V\delta 2^{neg}$), notre équipe au laboratoire a démontré que plusieurs populations de lymphocytes T $V\delta 2^{neg}$ sont augmentées dans le sang de transplantés infectés par le CMV (Dechanet, Merville et al. 1999). Des analyses individuelles des patients transplantés ont démontré que cette expansion de lymphocytes T $\gamma\delta$ est concomitante avec la résolution de la maladie due au CMV suggérant un rôle protecteur des lymphocytes T $\gamma\delta$ durant les infections à CMV (Lafarge, Merville et al. 2001).

✓ Infections bactériennes et parasitaires

Des analyses immuno-histochimiques de lésions de leishmanioses et de lèpres ont démontrées la présence de lymphocytes T $V\delta 1^+$ au sein des lésions (Uyemura, Deans et al. 1991; Uyemura, Klotz et al. 1992). Des cellules $V\delta 2^+$ ont été retrouvées concentrées au niveau des granulomes dermiques (site de répliation des bactéries) alors que les lymphocytes T $V\delta 1^+$ sont retrouvés surtout au niveau des lésions épidermiques infiltrées. Ces observations suggèrent que les lymphocytes T $V\delta 2^+$ seraient plutôt impliqués dans l'élimination directe des microorganismes (par reconnaissance des phosphoantigènes produits) alors que les lymphocytes T $V\delta 1^+$ seraient impliqués dans la résolution des granulomes ainsi que la réparation tissulaire (suite à la reconnaissance d'un antigène de stress).

■ Dans la réparation tissulaire

Les nombreuses études effectuées au sujet des DETC ($V\gamma 5V\delta 1$) présents dans la peau exclusivement chez la souris, démontrent clairement une implication de ces cellules dans la réponse aux lésions tissulaires épidermiques (Kabelitz and Wesch 2003). En effet ces cellules présentent une capacité accrue à proliférer en réponse à des kératinocytes stressés (Havran, Chien et al. 1991) et produire du le facteur de croissance des fibroblastes-7 (FGF-7) (Boismenu and Havran 1994). Une preuve très récente de l'implication des lymphocytes T $V\delta 2^{neg}$ dans la réparation tissulaire a été amenée chez l'homme. En effet il semblerait que des lymphocytes T $V\delta 1^+$ isolés d'épithéliums au niveau de blessures graves pourraient relarguer de l'insuline growth factor (IGF-1), et ainsi réguler la migration de kératinocytes et contribuer à la réparation tissulaire. Par contre dans des blessures chroniques (prolongées), les lymphocytes T $\gamma\delta$ semblent anergiques et incapables de sécréter IGF-1 (Toulon, Breton et al. 2009).

2.3. Fonctions effectrices des lymphocytes T $\gamma\delta$

a. Sécrétion de cytokines (figure 9)

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ peuvent sécréter, tout comme les lymphocytes T $\alpha\beta$ un profil de cytokines de type Th1 ou Th2 suivant les situations (Wen, Barber et al. 1998). En effet, *in vitro*, des lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$ en culture dans des conditions de stimulation Th1 (IL12 et Ac anti-IL4) vont développer un profil Th1 (sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α) alors que ces lymphocytes T cultivés en conditions cytokiniques Th2 (IL4 et Ac anti-IL12) vont développer un profil Th2 (sécrétion d'IL4) (Wesch, Glatzel et al. 2001). De manière générale, les lymphocytes T $\gamma\delta$ semblent sécréter plus de TNF- α et d'IFN γ que les lymphocytes T $\alpha\beta$ (Lafont, Liautard et al. 2000; Wang, Das et al. 2001). De plus, cette capacité à produire rapidement du TNF- α et de l'IFN- γ concerne, après stimulation, aussi bien les lymphocytes T

V γ 9V δ 2 (Goodier, Lundqvist et al. 1995; Lafont, Liautard et al. 2001) que les lymphocytes T V δ 2^{neg} comme par exemple les cellules T V δ 1⁺ lors des infections HIV (Boullier, Dadaglio et al. 1997).

On peut noter des études, rapportant que les lymphocytes T $\gamma\delta$ peuvent sécréter des facteurs comme le FGF et le facteur de croissance des kératinocytes (KGF) (Workalemahu, Foerster et al. 2004) mais aussi le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF) (Workalemahu, Foerster et al. 2003). Ceci renforce la notion que les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont impliqués dans des processus de surveillance et de réparation des tissus endommagés.

Des études récentes effectuées, essentiellement chez la souris, suggèrent que les lymphocytes T $\gamma\delta$ seraient des producteurs d'IL17. Par exemple dans des modèles murins d'infections à *M. tuberculosis* (Lockhart, Green et al. 2006), à *E.coli* (Shibata, Yamada et al. 2007), ou à *Listeria monocytogenes* (Hamada, Umemura et al. 2008), les cellules T V δ 1⁺ contribueraient à l'infiltration des neutrophiles sur le site infectieux, *via* une sécrétion précoce d'IL17. Les données chez la souris souligneraient une production massive très rapide de l'IL17 au niveau des sites infectieux, avant une expansion des cellules T $\gamma\delta$ sous l'effet d'un antigène reconnu. De façon intéressante, deux équipes ont très récemment proposé que les lymphocytes T $\gamma\delta$ Th17 pourraient rapidement produire de l'IL17 de manière indépendante d'une activation *via* leur TCR, par des « voies de signalisation innées » faisant intervenir les récepteurs l'IL23 et l'IL1 (Sutton, Lalor et al. 2009) ou encore les récepteurs TLR2 et dectine-1 (Martin, Hirota et al. 2009) exprimés par les cellules T $\gamma\delta$. Chez l'homme, très peu de données existent, cependant on peut citer une étude montrant que des lymphocytes T V δ 1⁺ provenant de patients HIV⁺ expriment de fort taux intracellulaires d'IL17 *ex vivo* et peuvent proliférer et produire l'IL17 *in vitro* en réponse à *Candida albicans* (Fenoglio, Poggi et al. 2009).

Enfin, on peut noter qu'en parallèle de leur capacité à sécréter des cytokines, les lymphocytes T $\gamma\delta$ dépendent d'un certain nombre de cytokines pour leur survie et leur prolifération. En effet, plusieurs cytokines intervenant dans la prolifération des lymphocytes T $\gamma\delta$ ont été identifiées dans des études portant d'une manière générale sur les sous-populations V γ 9V δ 2. Par exemple, des cellules T V γ 9V δ 2 ne semblent être capables de proliférer *in vitro* après une stimulation antigénique, qu'en présence d'IL2 (exogène ou produit par des lymphocytes T $\alpha\beta$ CD4⁺) (Pechhold, Wesch et al. 1994). L'IL15 serait également une cytokine homéostatique importante pour les cellules T V γ 9V δ 2 périphériques, du moins *in vitro* (Caccamo, Meraviglia et al. 2005). Plus récemment, Thedrez A et son équipe ont démontré l'implication de l'IL21 dans la prolifération de cellules T V γ 9V δ 2 (Thedrez, Harly et al. 2009).

b. Activité cytotoxique

Il apparaît que les lymphocytes T $\gamma\delta$ peuvent exercer des fonctions effectrices cytotoxiques qui leur permettent de lyser des cellules cibles par 2 voies : l'une implique des molécules granzyme/perforine/granulysine (Koizumi, Liu et al. 1991), l'autre fait intervenir les molécules Fas-FasL (De La Barrera, Finiasz et al. 2003) mais aussi les molécules TRAIL (Vermijlen, Ellis et al. 2007).

En effet, des vésicules cytotoxiques, contenant les molécules perforines et granzymes, situées dans les lymphocytes T V γ 9V δ 2 ont été montré comme impliquées dans la lyse de cellules métastatiques issues de cancers rénaux (Viey, Fromont et al. 2005) ou encore plus récemment dans la cytotoxicité vis-à-vis de cellules de carcinome de peau (Alexander, Maniar et al. 2008). De même Spada et son équipe ont mis en évidence l'expression de granulysine dans des clones de lymphocytes T V δ 1⁺ cytotoxiques vis-à-vis de cellules CD1c⁺ (Spada, Grant et al. 2000). Des lymphocytes T V γ 9V δ 2 peuvent sécréter des molécules cytotoxiques

(granzyme) mais aussi apoptotiques (TRAIL) au contact de cellules initiatrices de cancer colique (Todaro, D'Asaro et al. 2009).

Il apparaît également que les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont particulièrement efficaces pour up-réguler l'expression de leur FasL suite à une activation, ce qui contribuerait par exemple à leur activité d'immunorégulation dans certaines infections virales (Huber, Shi et al. 2002) ou encore lors de réactions inflammatoires comme lors d'une inflammation du système nerveux central (Ponomarev and Dittel 2005). Cette voie Fas-FasL leur permettrait également par exemple de lyser des cellules cibles tel que des macrophages infectés par *Mycobacterium tuberculosis* (De La Barrera, Finiasz et al. 2003) ou encore de réguler la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ (Vincent, Roessner et al. 1996).

c. Rôle initiateur et régulateur dans la réponse immunitaire par des interactions avec d'autres acteurs du système immunitaire

Plusieurs travaux de l'équipe de Moser B ont proposé que les lymphocytes T $\gamma\delta$ jouent un rôle activateur dans la réponse immunitaire adaptative. En effet, les lymphocytes T $\gamma\delta$ pourraient se différencier en cellules présentatrices d'antigènes (Moser and Brandes 2006) et induire la différenciation et la prolifération des lymphocytes T $\alpha\beta$ notamment au niveau des centres germinatifs (Brandes, Willimann et al. 2005). Les cellules T $\gamma\delta$ seraient capables de présenter des peptides antigéniques via le CMH II mais aussi le CMH I. En effet, très récemment cette même équipe a démontré que des lymphocytes T V γ 9V δ 2 pourraient ainsi induire une forte prolifération et une activation de lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8⁺ (Brandes, Willimann et al. 2009). De même, les cellules T $\gamma\delta$ pourraient aussi développer des interactions avec les lymphocytes B. Pour preuve cette étude dans laquelle une sous-population T V δ 2⁺ particulière (exprimant le récepteur CXCR5) pourrait grâce à des molécules co-stimulatrices (ICOS et CD40-L) et la sécrétion de cytokines (IL2, IL4 et IL10) aider les lymphocytes B à sécréter des Ig (Caccamo, Battistini et al. 2006).

De même, les lymphocytes T $\gamma\delta$ pourraient intervenir dans l'activation de la réponse immunitaire innée. On peut citer, en exemple, les travaux très récents de Eberl et son équipe qui ont démontré une interaction rapide entre des lymphocytes T V γ 9V δ 2 et des monocytes entraînant la production de facteurs pro-inflammatoires (tels que l'IL6, l'IFN- γ , le TNF- α) dans le cadre des infections microbiennes (Eberl, Roberts et al. 2009).

3. Migration des lymphocytes T $\gamma\delta$

Nous venons de décrire les capacités fonctionnelles des lymphocytes T $\gamma\delta$. Il paraît évident qu'une réaction immunitaire nécessitant des cellules T $\gamma\delta$ doit avoir lieu au bon moment, au bon endroit, que ce soit sur un site infecté, inflammatoire ou cancérisé. Cette condition est remplie grâce à un phénomène relativement complexe : la migration. Selon nous, la migration des lymphocytes T $\gamma\delta$ est une part entière et nécessaire de leur activité. Nous allons maintenant décrire les bases et l'état des connaissances concernant les lymphocytes T $\gamma\delta$ et leur capacité à atteindre un site tumoral.

3.1. Généralités

a. Le phénomène de migration des lymphocytes

Depuis longtemps, on distingue deux phénomènes dans la migration. Le phénomène de migration orientée des cellules ou chimiotaxie: le trafic des cellules dépend en grande partie de leur orientation spécifique selon un gradient de cytokines ayant une activité chimio-attractrice (les chimiokines) vers des tissus sécréteurs. Le phénomène de chimiokinèse: les

cellules, non orientées par un gradient de chimiokines, migrent aléatoirement et passivement suite à la disparition du signal de rétention qui leur permettait de rester fixées à un compartiment cellulaire (Wilkinson 1988). Ces deux phénomènes sembleraient synergiques (la chimiokinèse faciliterait la réponse aux chimiokines) (Palframan, Collins et al. 1998). Par la suite, nous nous intéresserons de plus près à la chimiotaxie et plus particulièrement au système chimiokines/récepteurs à chimiokines impliqués dans la migration des lymphocytes.

Le recrutement des lymphocytes à partir du sang vers un site cible fait intervenir 4 étapes (Figure 10):

1) Un roulement (*rolling*) poussé par le flux sanguin, contrôlé par des interactions faibles entre des molécules de la famille des intégrines et/ou des sélectines (présentes en surface des lymphocytes) et leurs ligands (présents à la surface des cellules endothéliales)

2) L'activation des intégrines lymphocytaires induites par la fixation des chimiokines sur leur récepteur spécifique en surface des lymphocytes

3) Cette activation des intégrines provoque une augmentation rapide de leur affinité pour leur ligand endothélial dont résulte un arrêt et une adhérence ferme des lymphocytes sur l'endothélium

4) La diapédèse durant laquelle le lymphocyte passe à travers l'endothélium vers le tissu cible, cette étape étant réglée par des molécules de la superfamille de Ig (Friedl and Weigelin 2008). On peut noter que seuls les lymphocytes capables de transmigrer à travers l'endothélium local sur un site donné, à un moment donné sont capables de répondre aux signaux envoyés par les chimiokines (Moser and Eberl 2007).

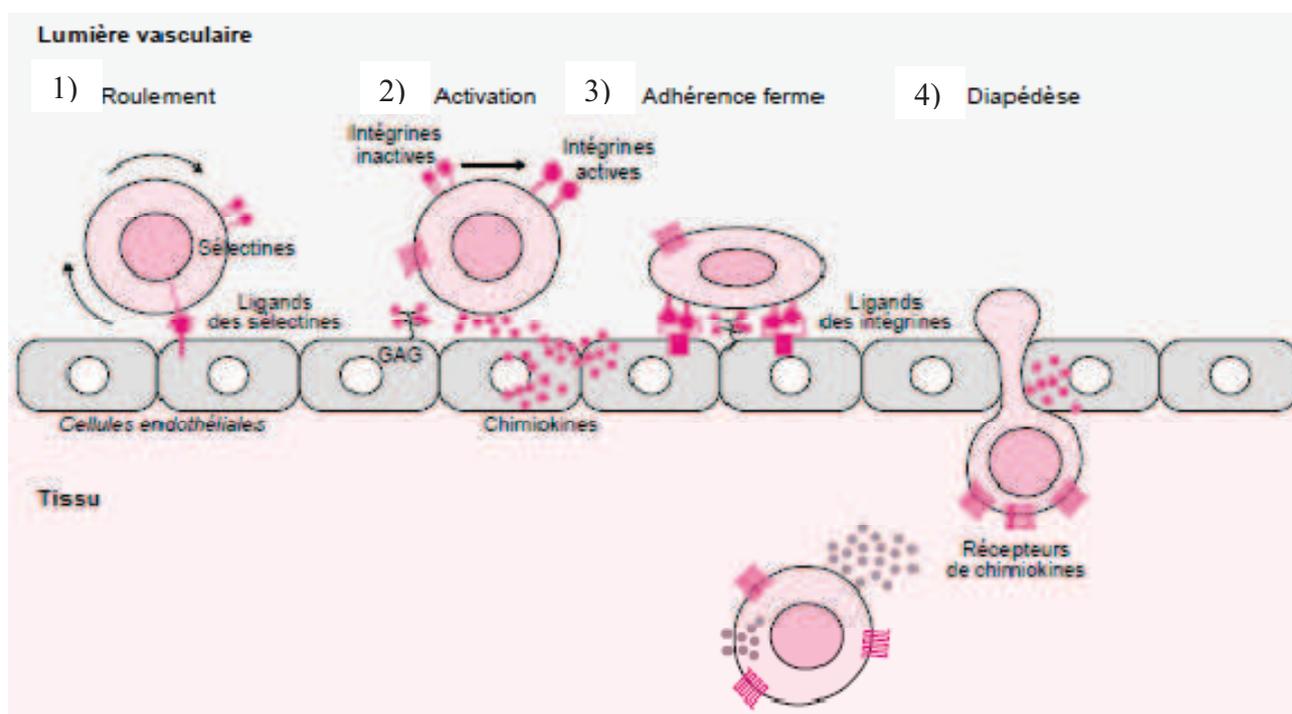


Figure 10 : Les étapes du recrutement des leucocytes circulants. Tiré de la revue « Les chimiokines et la longue marche des leucocytes » Foussat A. et al. *Médecine/sciences* 2000 ; 16 : 757-66

b. Le système chimiokines / récepteurs à chimiokines

Chaque sous-population lymphocytaire possède une extraordinaire flexibilité dans ces propriétés migratoires grâce à la multiplicité des chimiokines et de leurs récepteurs et grâce à une régulation fine de leur production (Kakinuma and Hwang 2006).

■ Chimiokines

Les chimiokines sont essentiellement produites par des cellules endothéliales activées, des cellules épithéliales et plusieurs cellules du système immunitaire (Moser, Wolf et al. 2004). Ce sont des protéines solubles de faible poids moléculaire (8-17 kD), qui possèdent généralement 4 cystéines conservées (Cys1 à Cys4) permettant la formation de 2 ponts disulfure (entre Cys1 et Cys3, entre Cys2 et Cys4) (figure 11). Quatre familles de chimiokines ont été décrites selon le nombre d'acides aminés (aa) séparant Cys1 et Cys2. Les CC chimiokines (CC Ligand (L)) où Cys1 et Cys2 sont adjacentes, les CXC chimiokines (CXCL) possèdent 1 aa entre Cys1 et Cys2, les CX3C chimiokines (CX3CL) possèdent 3 aa entre Cys1 et Cys2 (la fractalkine est l'unique membre identifié (Baggiolini 1998; Moser and Loetscher 2001)) et les C chimiokines (XCL) dont la lymphotactine est le seul membre (Kennedy, Kelner et al. 1995), sont caractérisées par la présence de seulement Cys2 et Cys4. Les chimiokines ont été classées en fonction de leurs conditions de production (figure 12): 1) homéostatiques : produites de manière constitutive, 2) inductibles ou inflammatoires: produites lors d'un processus inflammatoire 3) à « double fonctionnalité » produites dans les 2 contextes, elles peuvent être classées dans les catégories 1) et 2) à la fois.

■ Récepteurs à chimiokines

Les chimiokines peuvent fixer des récepteurs spécifiques à 7 segments transmembranaires couplés aux protéines G sur leur partie intracellulaire (figure 11). Ces récepteurs sont nommés en fonction des chimiokines qu'ils reconnaissent. Il existe à l'heure actuelle 13 récepteurs identifiés pour les CCL (CCR1 à 10 mais aussi CCX-CKR, D6 et DARC) (Borroni, Bonocchi et al. 2008), 9 pour les CXCL (CXCR1, 2, 3a, 3b, 4, 5, 6 et 7 et DARC), 1 (XCR1) pour la lymphotactine et 1 (CX3CR1) pour la fractalkine. Le système des chimiokines et leurs récepteurs est redondant, en général une chimiokine peut fixer plusieurs récepteurs et un récepteur peut lier une ou plusieurs chimiokines (Allen, Crown et al. 2007).

On peut noter que la majorité des réponses migratoire dues à la fixation des chimiokines à leur récepteur sont inhibées par un traitement à la toxine pertussique (PTX), indiquant le rôle primordial des protéines de la famille Gi généralement associées aux récepteurs à chimiokines. De plus, la signalisation intracellulaire suite à la fixation d'une chimiokine fait intervenir l'activation de phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), des sérines/thréonines kinases, et une cascade de MAP kinases. (Mellado, Rodriguez-Frade et al. 2001).

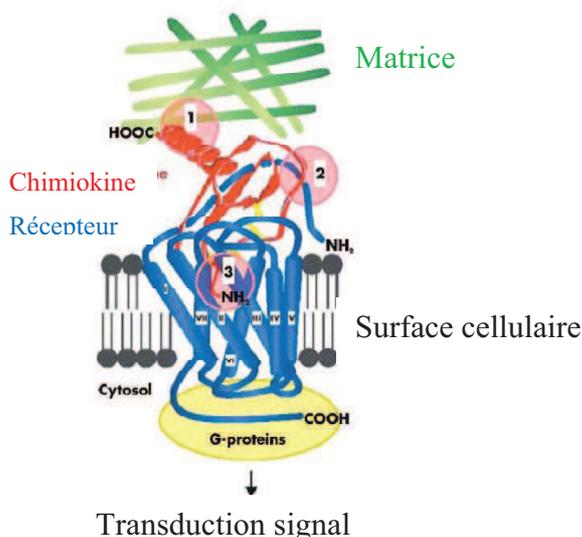


Figure 11 : Structures et interactions entre une chimiokine et son récepteur. Le récepteur à chimiokine est ancré dans la membrane cellulaire et on distingue sur cette protéine (en bleu) 3 boucles en NH₂-terminal, côté extracellulaire, qui interviennent dans l'interaction avec les chimiokines et 3 boucles en COOH-terminal, côté intracellulaire, qui interviennent dans la liaison avec les protéines G (G-proteins). Au niveau de la chimiokine (en rouge) on distingue : le site de fixation à la matrice (1), et les sites de liaisons au récepteur (2 et 3). Adapté de (Moser and Willmann 2004).

	Chimiokines Inflammatoires: leurs récepteurs	Chimiokines Homéostasiques: leurs récepteurs	Chimiokines à « double fonction » : leurs récepteurs
Famille: CXC	CXCL1 (GRO α): CXCR2, 1 CXCL2 (GRO β): CXCR2 CXCL3 (GRO γ): CXCR2 CXCL5 (ENA-78): CXCR2 CXCL6 (GCP-2): CXCR1, 2 CXCL7 (NAP-2): CXCR2 CXCL8 (IL8): CXCR1, 2	CXCL12 (SDF-1): CXCR4 CXCL13 (BCA-1): CXCR5 CXCL14 (BRAK): inconnu	CXCL9 (Mig): CXCR3 CXCL10 (IP-10): CXCR3 CXCL11 (I-TAC): CXCR3 CXCL16: CXCR6
Famille: CC	CCL3 (MIP-1 α): CCR1, 5 CCL2 (MCP-1): CCR2 CCL4 (MIP-1 β): CCR5 CCL5 (RANTES): CCR1, 3, 5 CCL7 (MCP-3): CCR1, 2, 3 CCL8 (MCP-2): CCR3 CCL11 (Eotaxine): CCR3 CCL13 (MCP-4): CCR2, 3 CCL14 (HCC-1): CCR1 CCL15 (HCC-2): CCR1, 3 CCL24 (Eotaxine-2): CCR3 CCL26 (Eotaxine-3): CCR3 CCL27 (CTACK): CCR10 CCL28 (MEC) CCR3, 10	CCL18 (DC-CK1): inconnu CCL19 (SLC): CCR7 CCL21 (SLC): CCR7	CCL1 (I-309): CCR8 CCL17 (TARC): CCR4 CCL20 (LARC): CCR6 CCL22 (MDC): CCR4 CCL25 (TECK): CCR9
Famille: XCL	XCL1 (Lymphotactine): XR1 XCL2: XCR1		
Famille: CX3C	CX3CL1 (Fractalkine): CX3CR1		

Figure 12 : Classification des chimiokines en sous-familles fonctionnelles. Dans ce tableau ont été regroupé le nom des chimiokines selon la nomenclature systématique avec L : ligand et les abréviations traditionnelles, les récepteurs correspondants avec R : récepteur en fonction des différentes familles (CXC, CC, XC, CX3C) des couples chimiokines/récepteurs connus. Les abréviations sont détaillées dans la partie abréviation du début du manuscrit.

3.2. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ et le système chimiokines/récepteurs à chimiokines

Jusqu'à aujourd'hui peu d'études se sont intéressées spécifiquement à la migration des lymphocytes T $\gamma\delta$ et au profil d'expression de récepteurs à chimiokines qu'ils expriment. De plus, la majorité des données portent sur les sous-populations circulantes V γ 9V δ 2, plus étudiées et mieux caractérisées que les sous-populations V δ 2^{neg} ainsi, peu de choses sont connues sur les récepteurs exprimés par les cellules T V δ 2^{neg} résidentes au niveau des épithéliums. Cependant, dans quelques études, que nous allons citer par la suite, des marquages ont été effectués *ex vivo* sur des lymphocytes T $\gamma\delta$ fraîchement isolés d'individus ou encore stimulés *in vitro* avec notamment de l'IL2, de la PHA ou de l'IPP. Nous le verrons plus tard les conditions dans lesquelles sont marqués les lymphocytes T $\gamma\delta$ ont leur importance car une activation des cellules peut moduler l'expression de leur récepteurs.

a. Expression de différents récepteurs (figure 9)

L'identification de l'expression et de la modulation d'un certain nombre de récepteurs à chimiokines en surface des cellules T $\gamma\delta$ apporte des preuves de leur rôle potentiel dans les processus inflammatoires mais aussi dans l'activation de l'immunité adaptative.

■ Les sous-populations T V γ 9V δ 2

Les propriétés migratoires des lymphocytes T V γ 9V δ 2 diffèrent étonnamment de celles des lymphocytes T $\alpha\beta$ circulants. En effet, la majorité (+ de 80%) des lymphocytes TV δ 2⁺ provenant du sang d'individus normaux, n'expriment pas ou peu de récepteurs à chimiokines homéostatiques (par exemple CCR7 ou CXCR5 qui contrôlent le trafic vers les organes lymphoïdes secondaires) mais ils présentent plutôt un profil de récepteurs à chimiokines inflammatoires. Il a été montré que les lymphocytes T V γ 9V δ 2 isolés du sang d'individus sains exprimeraient essentiellement CXCR3 (fixant Mig, IP-10 et I-TAC) et CCR5 (fixant MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES) (figure 9) qui sont des récepteurs typiques des lymphocytes T $\alpha\beta$ effecteurs/mémoires et des cellules du système immunitaire inné (Glatzel, Wesch et al. 2002; Brandes, Willimann et al. 2003). On peut noter que Glatzel et al ont relevé l'expression variable d'un certain nombre d'autres récepteurs sur les cellules T V γ 9V δ 2, dont le CXCR4 (fixant SDF-1) (Glatzel, Wesch et al. 2002). Ainsi l'expression du CXCR3 et du CCR5, relevée sur la majorité des cellules T V γ 9V δ 2 circulantes, pourraient confirmer leur état de pré-activation dans la circulation et leur phénotype mémoire. De Rosa et al ont relevé qu'environ 95% des cellules T V γ 9V δ 2 chez l'adulte possèdent un phénotype mémoire (CD45RO⁺/CD27⁻) (De Rosa, Andrus et al. 2004). Plusieurs études ont confirmé par la suite l'expression du CXCR3 et du CCR5 sur les cellules T V γ 9V δ 2. Par exemple, cette étude récente effectuée chez le macaque démontre que suite à une stimulation *in vivo* par un phosphoantigène et de l'IL2, on retrouve une augmentation de cellules T V γ 9V δ 2 qui exprime CCR5 (Ali, Shao et al. 2007). De même, Poggi et al ont démontré que des clones lymphocytes T V δ 2⁺, provenant de patients avec des scléroses multiples (Poggi, Zancolli et al. 2007), ou infectés par HIV (Poggi, Carosio et al. 2004) expriment CXCR3 et peuvent migrer *in vitro* sous l'effet de l'IP10.

■ Les sous-populations V δ 2^{neg}

Comme les sous-populations T V γ 9V δ 2, les lymphocytes T V δ 1⁺ ont été montré comme capables d'exprimer des récepteurs à chimiokines pro-inflammatoires comme le CCR5 (Poggi, Carosio et al. 2004). Par ailleurs, Glatzel et al ont montré une forte expression de CXCR1 (fixant IL-8 et GCP-2) préférentiellement sur des cellules T V δ 1⁺ purifiées *ex vivo* (Glatzel, Wesch et al. 2002). Ils ont également observé une expression de CXCR4 sur les cellules T V δ 2^{neg}. Cette expression du CXCR4 sur les différentes sous-populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ a par la suite été confirmée (Poggi, Catellani et al. 2007; Poggi, Zancolli et al. 2007).

D'autre part, des récepteurs à chimiokines conférant des propriétés de *homing* vers des tissus épithéliaux ont été observés en surface des lymphocytes T V δ 2^{neg}. Schaerli et al ont montré que des lymphocytes T V δ 1⁺ isolés de peau saine expriment CCR8 (fixant I-309) contrairement à des lymphocytes T $\gamma\delta$ isolés du sang périphérique. I-309 est relargué au sein de tissus de peau normale (Schaerli, Ebert et al. 2004). Les lymphocytes T V δ 1⁺ seraient maintenus dans la peau en condition normale grâce au CCR8 (Ebert, Meuter et al. 2006). Comme nous l'avons décrit précédemment, les épithéliums intestinaux sont riches en lymphocytes T V δ 2^{neg}. Il est connu que ces tissus expriment la chimiokine TECK (Wurzel, Philippe et al. 2000). Des preuves chez la souris soutiendraient que les IELs $\gamma\delta$ de l'intestin grêle pourraient utiliser le CCR9 (fixant TECK) pour migrer en réponse de la chimiokine TECK sécrétée localement. En effet, des études faites dans le modèle murin ont démontré que l'expression du CCR9 est nécessaire aux lymphocytes T $\gamma\delta$ pour atteindre l'intestin grêle (Marsal, Svensson et al. 2002; Uehara, Song et al. 2002).

De façon intéressante, on peut noter que le CCR6 (fixant LARC) semble être un marqueur caractéristique des cellules Th17 (Acosta-Rodriguez, Rivino et al. 2007). Récemment, il a été montré que la majorité des lymphocytes Th17 $\gamma\delta$ (sécrétants d'IL17) de souris immunisées en s.c avec des extraits de *Mycobacterium tuberculosis* exprimeraient le CCR6 (Martin, Hirota et al. 2009).

■ Modulation de l'expression des récepteurs

Il est aujourd'hui connu que l'expression des récepteurs à chimiokines pourrait être modulée sur les lymphocytes T de manière générale par une stimulation cellulaire. Cette expression pourrait être aussi bien up-régulée, par exemple *in vitro* sous l'effet de l'IL15 (Perera, Goldman et al. 1999) ou encore l'IL2 (Yang, Tomura et al. 2001) que down-régulée (Sallusto, Kremmer et al. 1999).

Concernant les lymphocytes T $\gamma\delta$, quelques études démontrent également l'existence de cette modulation sous l'effet d'une stimulation antigénique ou cytokinique. Par exemple, l'expression du CCR5 pourrait être down-régulée suite à une stimulation *in vitro*, notamment avec de la PHA ou un phosphoantigène bactérien ainsi que de l'IL2 sur des lymphocytes T V δ 2⁺ (Glatzel, Wesch et al. 2002). Dans une autre étude, une down-régulation du CCR5 et même du CXCR3 a également été démontré alors que CXCR1 semblerait up-régulé sur des lignées T $\gamma\delta$ issue de patients avec une sclérose multiple suite à une activation non spécifique avec du *phorbol myristate acetate* (PMA) (Murzenok, Matusevicius et al. 2002).

■ Cas du CCR7 (fixe ELC et SLC)

CCR7 est exprimé sur différents lymphocytes circulants aussi bien T $\alpha\beta$ que B et une sous-population de cellules T mémoires (T_{CM} pour central memory) (Sallusto, Geginat et al. 2004). Les cellules exprimant CCR7 possèdent à leur surface des récepteurs d'adhésion tel que la sélectine CD62L et l'intégrine α 4 β 7, et sont spécifiquement dirigées (*homing*) vers des tissus lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, plaque de Peyer).

De manière générale, les lymphocytes T $\gamma\delta$ n'expriment pas les CCR7 ce qui explique leur localisation préférentielle en dehors des ganglions lymphatiques (Morita, Jin et al. 2007). On peut noter de façon intéressante que l'expression de récepteurs à chimiokines pro-inflammatoires au lieu du CCR7 est une caractéristique des lymphocytes T $\gamma\delta$, partagée avec de nombreuses cellules du système immunitaire inné (granulocytes, monocytes...), qui souligne leur capacité à répondre immédiatement aux infections et aux inflammations. Cependant, suite à une stimulation *in vitro* (IPP ou PHA), une inversion du profil cytokine a pu être observée sur les lymphocytes T $\gamma\delta$: une induction de l'expression des récepteurs à chimiokines homéostatiques dont fait parti le CCR7 mais aussi le CCR4 parallèlement à une diminution drastique de l'expression du récepteur CCR5 (Brandes, Willmann et al. 2003). Cette down-régulation du CCR5 au profit du CCR7 et du CCR4 a notamment été mise en évidence pour les sous-populations T V γ 9V δ 2 (Cipriani, Borsellino et al. 2000; Glatzel, Wesch et al. 2002) et pourrait représenter une capacité transitoire de ces cellules à se diriger vers les ganglions lymphatiques et à activer l'immunité adaptative. De façon intéressante, il a été montré que l'IL-15, cytokine importante pour les lymphocytes T $\gamma\delta$, pourrait diminuer l'expression du CCR7 sur des lymphocytes T $\gamma\delta$ après une stimulation par un phosphoantigène (Eberl, Engel et al. 2002).

De même des clones V δ 1⁺ générés à partir de ces cellules et stimulés en PMA/ionomycine perdent l'expression du CCR8 et up-régulent le CCR7 suggérant que suite à une activation locale les lymphocytes T $\gamma\delta$ cutanés peuvent altérer leurs propriétés de homing, ne plus être retenus au niveau de la peau pour recirculer et se relocaliser au niveau d'organes lymphoïdes secondaires. (Ebert, Meuter et al. 2006).

b. Sécrétion de chimiokines par les lymphocytes T $\gamma\delta$

En parallèle de l'expression de récepteurs à chimiokines, que nous venons de voir, les cellules T $\gamma\delta$ peuvent sécréter des chimiokines et ainsi exercer leurs fonctions effectrices et réguler la migration d'autres cellules (Dagna, Iellem et al. 2002). Par exemple, Cipriani et son équipe ont montré que des lignées T V γ 9V δ 2, stimulées avec de l'IPP peuvent sécréter MIP-1 β mais aussi MIP-1 α et RANTES (Cipriani, Borsellino et al. 2000). Ces données ajoutées à d'autres supportent la notion d'une boucle d'amplification du signal chimioattractant. Des lymphocytes T $\gamma\delta$ attirés sur un site endommagé par des chimiokines pourraient ensuite attirer d'autres lymphocytes circulants incluant des lymphocytes T $\gamma\delta$ en relarguant des chimiokines pro-inflammatoires (Boismenu, Feng et al. 1996).

3.3. Les chimiokines et leurs récepteurs impliqués dans les cancers

Les chimiokines peuvent affecter le développement tumoral aussi bien en influençant les interactions cellules immunitaires (dont les cellules T $\gamma\delta$) /cellules tumorales par le phénomène de migration qu'en participant directement à la transformation, la survie et la croissance tumorale ainsi qu'aux processus d'invasion, d'angiogénèse et de développement des métastases (figure 13). Le rôle des chimiokines dans le développement tumoral est d'autant plus complexe que certaines vont favoriser la progression tumorale alors que d'autres vont plutôt soutenir l'immunité anti-tumorale (Vandercappellen, Van Damme et al. 2008).

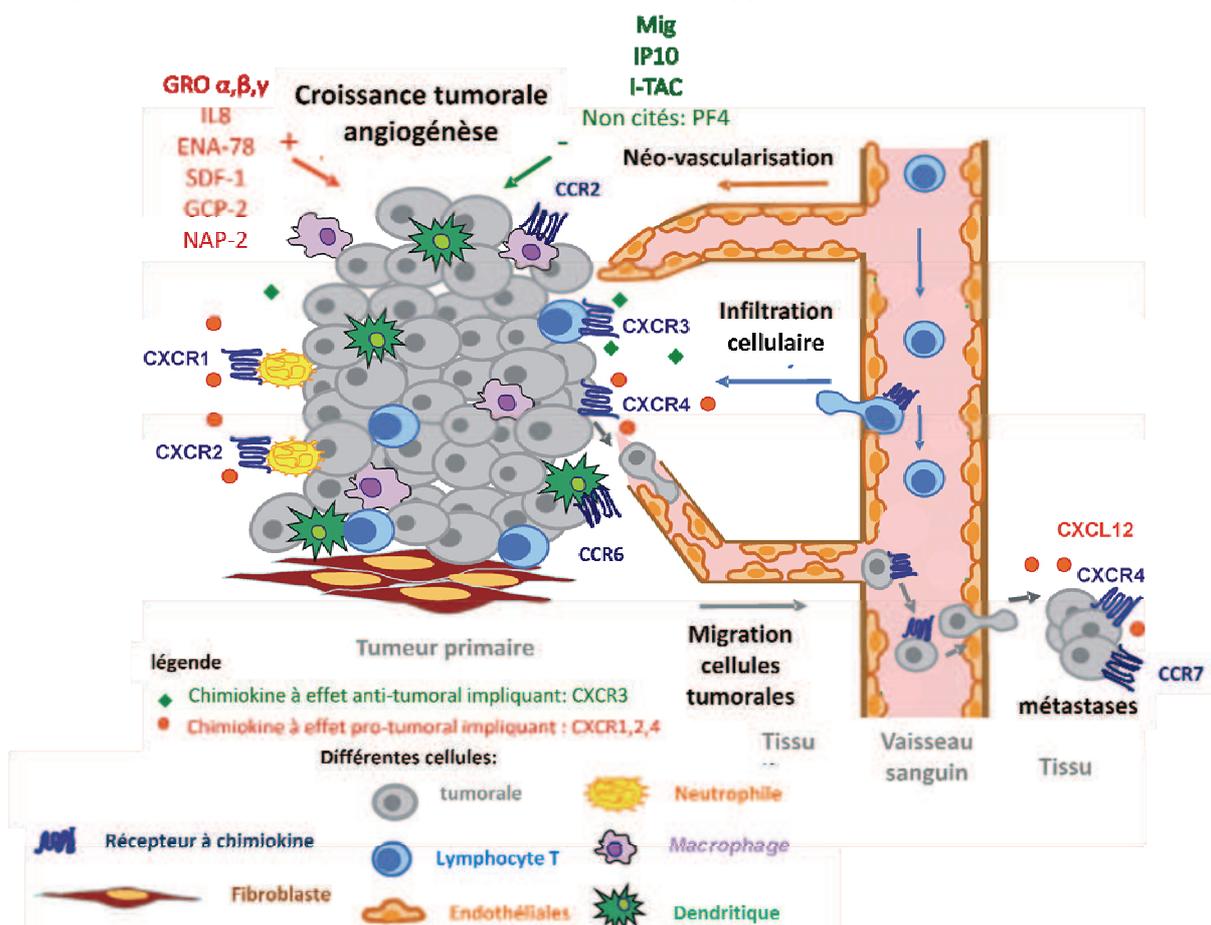


Figure 13: Rôle des chimiokines et de leurs récepteurs dans l'environnement tumoral. Cette figure a été inspirée de la figure de la revue (Vandercappellen, Van Damme et al. 2008). Des chimiokines et leurs récepteurs cités dans la partie 3.3 « les chimiokines et leur récepteur impliqués dans les cancers » y sont reportés. Cette liste n'est pas exhaustive.

a. Les chimiokines et leurs récepteurs impliqués dans la tumorigénèse

■ Lors de la croissance tumorale

Les chimiokines les mieux caractérisées comme favorisant la croissance tumorale sont certainement celles de la famille des *growth-related oncogen* chimiokines (GRO α , GRO β , GRO γ) et l'IL8 qui ont été d'abord impliquées dans la croissance des mélanomes (Schadendorf, Moller et al. 1993). En effet, les cellules tumorales de mélanomes exprimeraient CXCR1 et CXCR2 pouvant fixer ces chimiokines (Varney, Li et al. 2003). Depuis, ces chimiokines ont été impliquées dans la croissance d'autres cancers comme ceux du rein, du pancréas (Miyamoto, Shimizu et al. 1998) ou du colon (Brew, Erikson et al. 2000). On peut noter qu'il peut exister certaines boucles de régulations positives puisque, par exemple, les cellules de mélanomes diffèrent des mélanocytes sains par une expression constitutive de chimiokines GRO et IL8 (Dhawan and Richmond 2002). De plus, la chimiokine ENA-78 a été également montré comme favorisant la croissance de carcinomes de poumons (Arenberg, Keane et al. 1998) ou plus récemment de cancers gastriques (Park, Park et al. 2007).

■ Lors de l'angiogénèse

Les chimiokines peuvent également induire l'angiogénèse au niveau du microenvironnement tumoral. Il est aujourd'hui reconnu que les chimiokines membres de la famille CXC qui contiennent un motif d'aa ELR (aa Glu-Leu-Arg) à leur extrémité N-terminale sont des facteurs angiogéniques. Ainsi, les CXC chimiokines membres de la famille des GRO, ENA-78, GCP-2, NAP-2 et IL8 sont directement chimiotactiques pour des cellules endothéliales et peuvent stimuler l'angiogénèse *in vivo* (Strieter, Polverini et al. 1995). Cependant des chimiokines ne possédant pas ce motif ELR peuvent aussi favoriser l'angiogénèse. On peut citer l'exemple de SDF-1 qui peut être sécrétée par des cellules du stroma tumoral notamment dans les cas de tumeurs du sein (Allinen, Beroukhim et al. 2004; Orimo, Gupta et al. 2005).

Par ailleurs, d'autres chimiokines, qui n'ont pas le motif ELR, sont connues pour inhiber l'angiogénèse (Strieter, Belperio et al. 2004). Par exemple, IP-10 aurait des effets anti-angiogéniques et inhiberait la progression de tumeurs du poumon (Arenberg, Kunkel et al. 1996).

b. Les chimiokines et leurs récepteurs impliqués dans les métastases

Comme nous l'avons soulevé au début de l'introduction, la migration des cellules métastatiques fait intervenir le système chimiokine/récepteur à chimiokines. Dans les cancers humains, CXCR4 est de loin le récepteur à chimiokines montré comme étant le plus représenté en surface des cellules tumorales et son implication dans le développement de métastases a largement été prouvée. En effet plus de 23 cancers différents incluant le cancer du sein, ovarien, de la prostate mais aussi les mélanomes présenteraient une surexpression de CXCR4 (Balkwill 2004). De plus, la présence de ce récepteur serait corrélée avec la dissémination des cellules tumorales d'origine intestinale (Schimanski, Galle et al. 2008). Même si CXCR4 peut être exprimé par de nombreux tissus, il est quasiment absent sur la plupart des tissus normaux. De plus, SDF-1, l'unique ligand de CXCR4 est produit constitutivement par de nombreux tissus, incluant ceux où des métastases se développent préférentiellement (comme le poumon ou le foie) (Scotton, Wilson et al. 2001).

Une notion de panels de récepteurs à chimiokines caractéristiques d'un type de cancer a été initiée par Muller et al. En effet, ils ont démontré que les cellules de cancer du sein ont tendance à exprimer CXCR4, CXCR2 et CCR7 et que des cellules de mélanomes expriment typiquement CCR10, CXCR4 et CCR7. (Muller, Homey et al. 2001). Ces récepteurs peuvent être impliqués dans le processus métastatique. Dans ces mêmes travaux, cette équipe a montré que SCL (un ligand de CCR7) et SDF-1 étaient fortement sécrétés respectivement au niveau des ganglions lymphatiques et des poumons, où on peut retrouver des métastases issues de tumeurs mammaires. Plusieurs études corroborent ces résultats : CCR7, exprimé par des cellules de différents cancers solides, serait impliqué dans le processus métastatique vers les ganglions lymphatiques et corrélé avec un mauvais pronostic de rémission du cancer (Ding, Shimada et al. 2003; Takanami 2003; Takeuchi, Fujimoto et al. 2004).

c. Infiltration des tumeurs par des cellules du système immunitaire

Les différentes chimiokines sécrétées par les cellules tumorales ainsi que les cellules constituant le stroma tumoral (fibroblastes et cellules endothéliales) vont réguler l'influx et l'infiltration de nombreuses cellules immunitaires inflammatoires dont les lymphocytes T $\gamma\delta$ sur lesquels nous reviendrons plus tard. Elles peuvent provoquer un recrutement de cellules du système immunitaire inné. Par exemple, la chimiokine inflammatoire MCP 1 a été montrée importante pour l'infiltration tumorale par les macrophages, elle peut fixer CCR2 présent sur les macrophages. Des cellules de cancer ovarien peuvent produire MCP 1 et son niveau d'expression est corrélé avec le nombre de macrophages infiltrés dans la tumeur (Negus, Stamp et al. 1995). D'autre part, plusieurs tumeurs seraient également capables de relarguer la chimiokine LARC/MIP3 α , connue pour attirer les cellules dendritiques immatures (non activées) *via* le récepteur CCR6 (Bell, Chomarat et al. 1999). Enfin, les récepteurs CXCR1 et CXCR2, présents sur les neutrophiles seraient responsables de leur migration vers un site tumoral au niveau duquel serait présent le ligand commun aux deux récepteurs GCP-2 (Addison, Daniel et al. 2000). Le recrutement des cellules du système immunitaire adaptatif serait également régulé par des chimiokines spécifiques. De même que pour les macrophages, la présence de la chimiokine RANTES, produite par des tumeurs ovariennes, est corrélée avec l'infiltration de lymphocytes T CD8⁺ (Negus, Stamp et al. 1997). De plus, plusieurs études montrent que Mig et IP-10 peuvent induire une infiltration de cellules T (majoritairement CD8⁺) au sein de tumeurs (Luster and Leder 1993; Sun, Kundu et al. 2001; Dorsey, Kundu et al. 2002). L'infiltration des tumeurs par des cellules T reg (CD4⁺CD25⁺CD3⁺Foxp3⁺) a été corrélée avec l'expression de CCR4 en surface de ces cellules et la fixation du ligand MDC, sécrété notamment par des tumeurs ovariennes (Curiel, Coukos et al. 2004).

Il est intéressant ici de souligner que, comme nous l'avons décrits dans la première partie de l'introduction sur le cancer, l'infiltration de ces cellules inflammatoires peut réguler de manière négative ou positive le processus tumoral (Talmadge, Donkor et al. 2007)

Enfin, jusqu'à aujourd'hui, plusieurs stratégies thérapeutiques anti-cancer ont proposé de cibler les chimiokines et leurs récepteurs au niveau de chaque étape du développement tumoral que nous venons de citer. Malheureusement, malgré quelques succès occasionnels, la plupart de ses stratégies se sont avérées impraticables ou inefficaces, probablement à cause du manque de spécificité tumorale de ce système complexe des chimiokines et de leur récepteurs (Dell'Agnola and Biragyn 2007).

d. Localisation des lymphocytes T $\gamma\delta$ sur un site tumoral

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ ont été montrés depuis longtemps comme capables d'infiltrer des tumeurs (nous reviendrons sur ce point plus en détail dans la partie suivante) ce qui démontre leur capacité à répondre à des stimuli chimio-attractants générés au niveau d'un site tumoral (Haas, Pereira et al. 1993). Nous l'avons précédemment décrit, les cellules T $\gamma\delta$ circulantes (sous-population V γ 9V δ 2) mais aussi résidentes (sous-populations V δ 2^{neg}) expriment un panel de récepteurs à chimiokines variés qui leur permet une extravasation à travers les matrices extracellulaires pour atteindre un site tumoral.

Même si, très peu de données décrivent, les chimiokines et leurs récepteurs spécifiquement impliqués dans la migration des lymphocytes T $\gamma\delta$ vers un site tumoral, il est connu que les lymphocytes T $\gamma\delta$ infiltrant les tumeurs (TILs), tout comme les TILs $\alpha\beta$ possèdent des récepteurs pouvant fixer des chimiokines sécrétées par des tumeurs, comme par exemple des cellules tumorales de cancer du poumon (Ferrero, Fabbri et al. 1998).

■ Les lymphocytes T V γ 9V δ 2

Les cellules T V γ 9V δ 2 circulantes, *in vivo*, ont été montrées comme étant sensibles aux gradients chimiotactiques et de ce fait susceptibles d'être attirées vers des tissus endommagés tumoraux. Pour preuve les travaux de Van de Corput L et son équipe qui ont démontré une augmentation remarquable de lymphocytes exprimant un TCR V γ 9V δ 2 au niveau des rates des patients leucémiques (van de Corput, Kester et al. 1997). Bouet-Toussaint et son équipe l'ont démontré chez des patients souffrants de carcinomes hépatocellulaires ou coliques, les lymphocytes TV δ 2⁺ circulant dans le sang expriment essentiellement CXCR3 et CCR5 et pas CCR7 (Bouet-Toussaint, Cabillic et al. 2008). Il semblerait que ce profil d'expression de récepteurs à chimiokines varie quand les lymphocytes T V γ 9V δ 2 infiltrent des tumeurs. En effet, récemment, Viey et al ont relevé une forte expression de CXCR4 en surface de lymphocytes T V γ 9V δ 2 provenant d'infiltrats de tumeurs rénales chez des patients. Ce récepteur leur permettrait de migrer *in vitro* vers des cellules provenant des tumeurs (Viey, Lucas et al. 2008).

■ Les lymphocytes T V δ 2^{neg}

Les lymphocytes T V δ 2^{neg} infiltrant les tumeurs peuvent également présenter un profil de récepteurs à chimiokines particulier. Par exemple, les lymphocytes T V δ 1⁺ infiltrant les cancers du poumon expriment fortement CXCR3 et migrent sous l'influence d'IP10 le plus souvent (Sallusto, Lenig et al. 1998). De plus, ces ligands IP-10, Mig et I-TAC ont été montrés comme relargués au niveau de différents tissus tumoraux comme par exemple au niveau de carcinomes ovarien (Furuya, Suyama et al. 2007)

Pour conclure sur ce phénomène de migration de lymphocytes T au sein d'une tumeur, il est intéressant de souligner qu'après avoir infiltré une tumeur suite à une extravasation à travers l'endothélium, le TIL $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ poursuit sa migration au sein même de la tumeur, guidé par l'existence d'un gradient de chimiokines interstitiel. Récemment, une équipe a démontré par microscopie *in vivo* qu'apparemment le TIL se déplacerait au hasard dans la tumeur à la recherche d'un Ag et serait stoppé dès la reconnaissance d'un ligand connu en surface d'une cellule cible (Mrass, Takano et al. 2006).

C. IMPLICATION DES LYMPHOCYTES T GAMMA DELTA DANS LES CANCERS

Avec ce que nous venons de décrire, il semble que les lymphocytes T $\gamma\delta$ possèdent des caractéristiques (notamment au niveau de la reconnaissance directe de ligands conservés non reconnus par les lymphocytes T $\alpha\beta$) qui les placent comme des candidats idéaux dans l'immunosurveillance locale et les défenses immédiates anti-tumeurs (Kabelitz, Wesch et al. 2007). Ce concept, impliquant les lymphocytes T $\gamma\delta$ dans l'immunité anti-tumorale, a été alimenté ces 20 dernières années par un nombre croissant de données qui concernent essentiellement les sous-populations V δ 2⁺ et V δ 1⁺. A l'heure actuelle, il n'existe quasiment aucune donnée sur les autres populations T V δ 2^{neg} (V δ 3, V δ 5) chez l'homme. Nous allons maintenant décrire les démonstrations proposant un rôle déterminant des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans les cancers.

1. Données impliquant les lymphocytes T $\gamma\delta$ dans la surveillance anti-tumorale

1.1 Données chez la souris

Les modèles murins ont été un élément clé pour démontrer non seulement l'implication des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans la surveillance anti-tumorale mais aussi pour étudier leur mode d'action sur le développement tumoral. Des modèles murin/murin avec des tumeurs murines et des lymphocytes T $\gamma\delta$ murins ainsi que des modèles chimériques avec des cellules tumorales et des cellules T $\gamma\delta$ humaines transférées dans des souris ont été utilisés.

a. Modèle murin/murin démontrant l'importance des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans la surveillance et la réponse anti-tumorale

■ Les travaux de Girardi M et son équipe

La majorité des travaux démontrant clairement l'implication des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans la surveillance anti-tumorale à l'aide de modèles murins, furent certainement ceux réalisés par Girardi M. et son groupe. En 2001, lors d'une étude originale, ils ont utilisé des souris dépourvues de lymphocytes T $\gamma\delta$ (TCR δ ^{-/-}) qu'ils ont traitées avec le carcinogène chimique mutagène MCA, dont nous avons déjà parlé dans la partie immunité et cancer de l'introduction. Ils ont démontré que ces souris TCR δ ^{-/-} traitées sont plus susceptibles de développer des cancers cutanés que des souris normales (Girardi, Oppenheim et al. 2001) prouvant ainsi le rôle protecteur des cellules T $\gamma\delta$ DETC contre les cancers cutanés.

Par la suite, Girardi M. et son équipe ont confirmé l'importance de l'implication anti-tumorale des lymphocytes T $\gamma\delta$ en utilisant un modèle d'induction de carcinome de peau en deux étapes : une première application de DMB suivi d'applications répétées d'un autre agent mutagène (le TPA). Dans ce système, que nous avons cité auparavant dans l'introduction, des papillomes se développent dans un premier temps et peuvent évoluer vers des carcinomes cutanés baso-cellulaires (Owens, Wei et al. 1999). Dans ce modèle d'induction de cancers cutanés, les souris déficientes en lymphocytes T $\gamma\delta$ montrent une incidence de développement de papillomes et une évolution vers un cancer plus importante que des souris contrôles. Ainsi, les lymphocytes T $\gamma\delta$ pourraient prévenir du développement tumoral aussi bien à des stades

très précoces que lors de l'évolution des tumeurs vers des carcinomes. (Girardi, Glusac et al. 2003). Ce modèle d'induction en deux étapes du carcinome leur a également permis d'étudier les contributions relatives des cellules $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ dans l'immunosurveillance tumorale. Les lymphocytes T $\alpha\beta$ pourraient, entre autre, avoir une activité pro-tumorale qui serait régulée par les lymphocytes T $\gamma\delta$ (Girardi, Glusac et al. 2003). Les lymphocytes T $\gamma\delta$ infiltrant les tumeurs seraient une source précoce d'IFN γ (Gao, Yang et al. 2003) et pourraient stimuler la réponse cytotoxique CD8⁺ et la production d'IFN γ par les cellules T CD4⁺ (Girardi, Oppenheim et al. 2004).

■ Autres travaux dans le modèle murin/murin impliquant les lymphocytes T $\gamma\delta$ dans la surveillance anti-tumorale

On peut citer une étude dans laquelle des souris TCR δ ^{-/-} croisées avec des souris transgéniques pour l'adénocarcinome de prostate murin (TRAMP) (développant spontanément des cancers de la prostate), montrent une incidence plus élevée pour l'apparition de cancers de la prostate comparées à des souris TRAMP contrôles (Liu, Eltoum et al. 2008).

Ces modèles murins KO ont permis à d'autres équipes de démontrer l'implication des lymphocytes T $\gamma\delta$ contre le cancer par exemple dans l'immunité anti-lymphome en utilisant des souris déficientes pour certains éléments du système immunitaire (la β 2-microglobuline et la perforine) qui développent plus facilement des lymphomes. Des cellules de lymphomes prélevées chez ces souris, implantées en i.p chez d'autres souris immunodéficientes déplétées en lymphocytes T $\gamma\delta$, entraînent un fort taux de mortalité par rapport à des souris pourvues de ces sous-populations T $\gamma\delta$ (Street, Hayakawa et al. 2004). Dans un autre modèle, les lymphomes ont une incidence plus élevée chez des souris double KO déficientes pour la molécule Fas et les lymphocytes T $\gamma\delta$ (Peng, Robert et al. 1996).

b. Modèles chimériques de transfert adoptif de cellules humaines dans des souris immunodéficientes : xénogreffe

L'étude du contrôle du développement tumoral par les lymphocytes T $\gamma\delta$ a pu être approfondie *in vivo* grâce aux modèles murins chimériques (homme/souris) de souris immunodéficientes (comme les souris *Nude*, les souris *Severe Combined Immunodeficiency* (SCID)). Ces souris représentent un moyen d'étudier des lymphocytes T $\gamma\delta$ humains dans un contexte *in vivo* et peuvent être implantées avec des tumeurs primaires ou des lignées tumorales humaines à différents sites (sous-cutané (s.c), intraveineux (i.v), intrapéritonéal (i.p) ou en orthotopique) sans rejet de greffe, et suite à un transfert adoptif de lymphocytes T $\gamma\delta$ humains, on peut suivre l'évolution du développement tumoral. La très grande majorité des études faites dans ce modèle chimérique portent sur le rôle des cellules T V γ 9V δ 2 et très peu de données concernent les lymphocytes T V δ 2^{neg}.

■ Cas des hémopathies malignes

Initialement, l'activité anti-tumorale des lymphocytes T $\gamma\delta$ vis-à-vis de tumeurs telles que les leucémies ou les lymphomes fut proposée exclusivement pour les sous-populations V γ 9V δ 2 de part leur localisation dans la circulation sanguine. L'absence des sous-populations T V γ 9V δ 2 chez la souris a considérablement complexifié l'étude de leur rôle *in vivo*. Cependant des transferts adoptifs de ces cellules T V γ 9V δ 2 humaines dans des souris immunodéficientes a permis d'évaluer leur action contre les tumeurs.

Par exemple, des clones T V γ 9V δ 2 humains peuvent réduire le développement de lymphomes de Burkitt injectés en i.v ou en i.p dans les souris SCID (Malkovska, Cigel et al.

1992). De la même façon, le transfert de TILs $\gamma\delta$ V γ 9V δ 2 en i.p (provenant de tumeurs colorectales), dans des souris *Nude* ayant reçues des lignées de lymphomes en i.p, peut prolonger leur survie de manière significative par rapport à des souris non traitées (Chen, Niu et al. 2001)

■ Cas des tumeurs solides

Kabelitz et son équipe ont montré que des lignées T V γ 9V δ 2, provenant de donneurs sains, stimulées *in vitro* et injectées en i.p avec de l'IL2 prolongent la vie de souris SCID ayant reçu des lignées tumorales pancréatiques ou de mélanomes en i.p (Kabelitz, Wesch et al. 2004).

De plus, un rôle des cellules T $\gamma\delta$ sur la croissance des tumeurs solides a pu être étudié grâce à ces modèles murins. Par exemple, des souris *Nude* inoculées, par voie s.c, avec des lignées humaines de carcinome nasopharyngial développent des tumeurs solides. Des lymphocytes T $\gamma\delta$, provenant de sang humain, administrés par voie i.v à ces mêmes souris, peuvent infiltrer la tumeur et seraient impliqués dans l'arrêt temporaire de la croissance de celle-ci et dans le prolongement de la vie des souris (Zheng, Chan et al. 2001). Lozupone F et al ont rapporté que des clones T V γ 9V δ 2 mais aussi des clones T V δ 1⁺, pouvaient, après des injections répétées en i.v dans des souris SCID, ralentir le développement tumoral de lignées de mélanomes implantées en s.c (Lozupone, Pende et al. 2004). Une infiltration tumorale par les clones T V δ 1⁺ a même été mise en évidence par immunohistochimie. Récemment, l'utilisation de ces modèles chimériques a permis d'étudier l'activité anti-tumorale des lymphocytes T $\gamma\delta$ humains dans des cancers comme les neuroblastomes avec l'utilisation de souris NOD-SCID (Otto, Barfield et al. 2005), le cancer de la vessie (Yuasa, Sato et al. 2009) ou encore le cancer du sein (Beck, Kim et al. 2009).

1.2. Données chez l'homme

L'implication des cellules T $\gamma\delta$ dans les réponses anti-tumorales chez l'homme s'appuie sur les observations suivantes : 1- les lymphocytes T $\gamma\delta$ infiltrent différentes tumeurs *in vivo*, 2- chez certains patients, il existe une corrélation inverse entre le nombre de lymphocytes T $\gamma\delta$ potentiellement réactifs dans le compartiment sanguin et la survenue de cancers (Zheng, Ng et al. 2002; Wilhelm, Kunzmann et al. 2003) 3- les lymphocytes T $\gamma\delta$ ont la capacité de lyser des lignées tumorales d'origine diverses *in vitro* (nous le décrirons au chapitre suivant).

a. Infiltrations tumorales par des lymphocytes T $\gamma\delta$

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont depuis longtemps identifiés comme capable d'infiltrer des tumeurs chez l'homme, on les appelle alors les lymphocytes infiltrant les tumeurs $\gamma\delta$ (TILs $\gamma\delta$). Cependant on peut noter que très peu d'études ont comparées les infiltrats de lymphocytes T $\gamma\delta$ entre les épithéliums sains et les épithéliums tumoraux.

Généralement les TILs $\gamma\delta$ retrouvés au sein de carcinomes expriment majoritairement les chaînes V δ 1 probablement à cause de leur capacité de *homing* vers les épithéliums différentes de celles des cellules T V δ 2⁺ (Glatzel, Wesch et al. 2002) mais aussi du fait de l'expression de certaines molécules d'adhésions particulières (CD49d, CD49e et α 4 β 7) sur les cellules T V δ 1⁺ comme il a été montré dans le cas de cancer de l'œsophage (Thomas, Badwe et al. 2001). Ces cellules T V δ 1⁺ ont été retrouvées dans une variété de tumeurs épithéliales fraîchement isolées (poumons, prostate, ovaires, colon, sein) (Groh, Rhinehart et al. 1999).

Les tumeurs rénales, relativement bien étudiées, ainsi que d'autres types de tumeurs solides sont connues comme étant infiltrées par des cellules T $\gamma\delta$.

■ Infiltration de tumeurs rénales :

Plusieurs études rapportent une infiltration de tumeurs rénales par des lymphocytes T $\gamma\delta$. Kowalczyk D et son équipe ont montré que environ 3,8% des TILs CD3⁺ dans des tumeurs rénales sont des lymphocytes T $\gamma\delta$ activés exprimant CD25 (la chaîne α du récepteur à l'IL2) ce qui suggère une pré-activation *in vivo* (Kowalczyk, Skorupski et al. 1996; Kowalczyk, Skorupski et al. 1997). Généralement, un taux plus important de lymphocytes T $\gamma\delta$ est retrouvé dans une tumeur de rein par rapport à un rein normal et ils expriment préférentiellement la chaîne V δ 1 (Olive, Nicol et al. 1997). Par exemple Choudhary et al montre que des lymphocytes T V δ 1⁺ infiltreraient des tumeurs rénales (Choudhary, Davodeau et al. 1995). Récemment il a été observé que des lymphocytes T $\gamma\delta$ majoritairement V δ 2⁺ ont aussi la capacité d'infiltrer des tumeurs rénales (Viey, Fromont et al. 2005).

Malgré des preuves très claires d'une infiltration de tumeurs rénales par ces cellules T $\gamma\delta$, une étude récente menée sur un grand nombre d'échantillons de tumeurs du rein montre que l'infiltrat de TIL $\gamma\delta$ reste faible par rapport aux autres lymphocytes T et qu'on ne peut le corrélérer avec aucun pronostic de survie chez les patients (Inman, Frigola et al. 2008).

■ Infiltration d'autres tumeurs solides

Peng et al ont par exemple pu mettre en évidence que des TILs isolés de tumeur du sein contenaient des lymphocytes T $\gamma\delta$ réactifs vis-à-vis de différentes cellules tumorales et que parmi eux se trouvaient 95% de lymphocytes T V δ 1⁺ exprimant CD8 $\alpha\alpha$ qui pouvaient avoir un rôle immunosuppresseur (Peng, Wang et al. 2007). D'autre part, les tumeurs pulmonaires ont été montrées comme souvent infiltrées par des lymphocytes T $\gamma\delta$ exprimant préférentiellement V δ 1 (Zocchi, Ferrarini et al. 1994). Apparemment, la moitié de ces cellules T V δ 1⁺ expriment l'homodimère CD8 $\alpha\alpha$ (Ferrarini, Heltai et al. 1994). Des lymphocytes T $\gamma\delta$ exprimant essentiellement les chaînes V δ 1 ont été montrés comme infiltrant des mélanomes (Bialasiewicz, Ma et al. 1999). Enfin, les tumeurs coliques, sur lesquelles se porte l'intérêt de ma thèse, sont connues comme étant infiltrées par des lymphocytes T V δ 2^{neg} exprimant préférentiellement la chaîne V δ 1 (Maeurer, Martin et al. 1996). De manière intéressante, Corvaisier et al montrent que parmi des TILs de différents échantillons de tumeurs coliques, stimulés *ex vivo* de façon polyclonale en présence d'IL2, il apparaît que 0,1 à 3% des TILs sont des lymphocytes T V γ 9V δ 2 (Corvaisier, Moreau-Aubry et al. 2005).

b. Expansion périphérique des lymphocytes T $\gamma\delta$

Il a été également observé lors de certains cancers, notamment les lymphomes, une expansion périphérique des lymphocytes T $\gamma\delta$. En effet, des patients souffrant de lymphomes peuvent présenter une expansion de 42% des lymphocytes T $\gamma\delta$ circulant dans le sang (McClanahan, Fukushima et al. 1999). Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 semblent augmentés dans le compartiment sanguin, où ils sont majoritairement localisés, notamment lors de lymphomes associés à EBV (Oyoshi, Nagata et al. 2003). On peut noter que Kobayashi et ses collègues ont également relevé une augmentation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 dans la circulation sanguine de patients souffrant d'un carcinome rénal comparé à des patients sains (Kobayashi, Tanaka et al. 2001).

c. Corrélation positive entre l'expansion de lymphocytes T $\gamma\delta$ et le cancer

■ Dans la survie des patients

Une corrélation positive a été trouvée entre l'infiltration de mélanomes par des cellules T $V\delta 1^+$ et la survie de patients (Bialasiewicz, Ma et al. 1999). Chez ces patients, les TILs $V\delta 1^+$ étaient présents dans 52,7% des mélanomes nécrotiques et dans 14% des mélanomes non-nécrotiques. Par ailleurs, Lamb L.S. et al ont décrit une corrélation significative entre l'augmentation des cellules T $V\delta 1^+$ de donneurs de moelle osseuse dans le sang de patients souffrant d'une leucémie lymphoblastique (LL) aiguë et la survie de ceux-ci sans récurrence après une transplantation de moelle osseuse (Lamb, Musk et al. 2001). De plus, il n'a été observé aucune progression du cancer dans les LL chronique à cellules B chez les patients dans lesquels on détecte une augmentation des cellules T $V\delta 1^+$ dans la circulation sanguine par rapport à des patients avec une faible quantité de lymphocytes T $V\delta 1^+$ dans le sang (Poggi, Venturino et al. 2004). Enfin, Catellani et son équipe ont observé une expansion de cellules T $V\delta 1^+$ dans le sang périphérique de patients atteints de lymphomes non-Hodgkiniens. L'expansion des lymphocytes T $V\delta 1^+$ circulants ainsi que, comme nous le détaillerons plus bas, l'expression de ligands de NKG2D sur les cellules B de ces patients sont associées à un faible taux de progression de la maladie (Catellani, Poggi et al. 2007).

■ Dans la survenue des cancers

On peut citer pour illustrer ce point une récente étude de l'équipe dans laquelle j'ai préparé ma thèse. Celle-ci suggère que des patients transplantés possédant un nombre de lymphocytes T $V\delta 2^{neg}$ augmentés dans le sang sont moins sujets à développer des cancers. Lors de cette étude longitudinale, le taux de lymphocytes T $\gamma\delta$ dans le sang de transplantés rénaux (chez qui le risque de cancérogénèse est augmenté) a été suivi pendant 8 ans post-greffe. Il a été observé que la médiane du pourcentage de cellules T $\gamma\delta$ à 18, 12 et 6 mois avant l'apparition du cancer chez certains patients est inférieure à celle des patients ne développant aucun cancer. De plus, cette corrélation significative entre l'augmentation des lymphocytes T $V\delta 2^{neg}$ et l'incidence réduite de cancer a été observée uniquement chez des transplantés ayant subi une infection à CMV. Donc, dans la continuité des études sur le CMV faites au laboratoire et citées précédemment, il a été mis en évidence, chez une autre cohorte de patients, que les transplantés rénaux n'ayant jamais été infectés par le CMV ont un risque accru de cancérogénèse, avant ou après leur greffe, par rapport à ceux ayant été exposés au CMV. L'effet observé pourrait être dû à une activation par le CMV des lymphocytes T $V\delta 2^{neg}$ qui seraient cross-réactives contre des cellules tumorales (Couzi, Levaillant et al. 2009).

2. Fonctions des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans les cancers

Des lignées et des clones T $\gamma\delta$ établis à partir de TILs peuvent reconnaître et lyser non seulement des cellules tumorales autologues mais la plupart du temps une variété étendue de cellules tumorales différentes, probablement de part la reconnaissance de ligands partagés.

2.1 Cytotoxicité des lymphocytes T $\gamma\delta$ vis-à-vis de cellules tumorales *in vitro*

a. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2

Comme nous l'avons déjà dit, initialement, les populations V γ 9V δ 2 avaient été montrées comme stimulées plutôt par des cellules tumorales d'origine hématopoïétique (Fisch, Meuer et al. 1997). Ces sous-populations T V γ 9V δ 2 activées, *in vitro* par des antigènes non-peptidiques sont aujourd'hui connues comme étant capables d'exercer une cytotoxicité envers un large panel de cellules tumorales (Kato, Tanaka et al. 2001).

■ Cytotoxiques vis-à-vis de cellules tumorales d'origine hématopoïétique

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 sont connus comme capables de reconnaître directement des cellules dérivées de myélomes (Selin, Stewart et al. 1992) et de lymphomes. En effet ces sous-populations T V γ 9V δ 2 ont été démontrées comme étant cytotoxiques *in vitro* vis-à-vis de diverses lignées de myélomes (Ali, Shao et al. 2007) ou encore des cellules autologues de myélomes (Kunzmann, Bauer et al. 2000). De même, Fisch P et ses collaborateurs, qui ont beaucoup travaillé sur les cellules T V γ 9V δ 2, ont montré qu'elles étaient particulièrement efficaces pour détruire des lignées de lymphome de Burkitt (la plus connue étant la lignée Daudi) (Fisch, Malkovsky et al. 1990; Sturm, Braakman et al. 1990). Dans leurs expériences, des clones T V δ 2⁺ mais pas des clones T V δ 1⁺, isolés du sang de donneurs sains, reconnaissent des cellules de différents lymphomes B. Ils prolifèrent *in vitro* et sont cytotoxiques (sécrètent des cytokines comme TNF α ou GM-CSF).

■ Cytotoxiques vis-à-vis de cellules tumorales épithéliales

Plus récemment, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 ont été montrés comme capables de lyser des cellules de tumeurs épithéliales *in vitro*. En effet, des cellules T V γ 9V δ 2, provenant d'individus sains, peuvent lyser des cellules de différentes lignées de carcinomes de sein (Guo, Liu et al. 2005), de carcinomes de prostate (Liu, Guo et al. 2005), des lignées de mélanomes (Kabelitz, Wesch et al. 2004), de carcinomes nasopharyngial (Zheng, Chan et al. 2001), de neuroblastomes (Otto, Barfield et al. 2005), de carcinomes de rein (Kobayashi, Tanaka et al. 2001) (Viey, Fromont et al. 2005) et de carcinomes pulmonaires (Sato, Kimura et al. 2005). De façon intéressante Corvaisier et al démontrent qu'un clone de lymphocytes T V γ 9V δ 2, isolé d'ascites d'un patient atteint d'une tumeur colique, a une forte réactivité *in vitro* vis-à-vis de plusieurs lignées tumorales coliques autologues (Corvaisier, Moreau-Aubry et al. 2005). Les lymphocytes T V δ 2⁺ auraient aussi une réactivité *in vitro* vis-à-vis mais aussi des cellules souches de cancers coliques (initiatrice d'une tumeur colique), dont nous avons parlé précédemment (Todaro, D'Asaro et al. 2009). Enfin, des lymphocytes T V γ 9V δ 2, provenant de la circulation sanguine de patients avec des carcinomes colorectaux, peuvent lyser *in vitro* tout un panel de lignées tumorales ainsi que des cellules tumorales colorectales autologues mais pas des cellules normales autologues (Bouet-Toussaint, Cabillic et al. 2008).

b. Les lymphocytes T V δ 2^{neg}

Les lymphocytes T V δ 2^{neg} étant essentiellement représentés dans les tissus épithéliaux, ils ont une localisation idéale pour être en première ligne de défense contre les tumeurs épithéliales (ou carcinomes). L'implication de ces sous-populations V δ 2^{neg} dans

l'immunosurveillance et la réponse immunitaire anti-cancer fut proposée dans des carcinomes de diverses origines: les mélanomes, les carcinomes coliques, rénaux, pulmonaires mais aussi des cancers circulants.

■ Cytotoxiques vis-à-vis de cellules tumorales épithéliales

De nombreuses études montrent que des lymphocytes T $\gamma\delta$ $V\delta 2^{\text{neg}}$ (essentiellement des $V\delta 1^+$) sont capables d'avoir une action cytotoxique vis à vis des cellules de cancers épithéliaux. En effet, des preuves ont été apportées en testant cette cytotoxicité aussi bien vis-à-vis de cellules autologues prélevées chez les patients que vis-à-vis de cellules de lignées tumorales générées *in vitro*. Par exemple, des cellules T $\gamma\delta$ isolées de TILs de patients avec des cancers colorectaux peuvent lyser des cellules tumorales autologues (coliques) mais aussi de nombreuses lignées épithéliales (provenant de carcinomes de sein, pancréas, mélanome, poumon, colon) (Maeurer, Martin et al. 1996). De même, des clones générés à partir des TILs $V\delta 1^+$ infiltrant les tumeurs rénales, dont nous avons parlé précédemment, peuvent lyser *in vitro* des cellules tumorales autologues (Choudhary, Davodeau et al. 1995). De façon intéressante, il a été montré que des TILs $V\delta 1^+$ provenant de différentes tumeurs épithéliales avaient un potentiel cytotoxique aussi bien vis-à-vis de cellules de carcinome intestinal autologue qu'hétérologue (ne provenant pas du même individu) (Groh, Rhinehart et al. 1999). Enfin, des clones de lymphocytes T $V\delta 1^+$ provenant de peau saine ont été montré comme capable de lyser, de manière perforine-dépendante, des cellules de lignées de mélanome (Ebert, Meuter et al. 2006).

■ Cytotoxiques vis-à-vis de cellules tumorales d'origine hématopoïétique

Plusieurs études soutiennent que les lymphocytes T $V\delta 2^{\text{neg}}$ ($V\delta 1^+$) auraient aussi un rôle anti-tumoral potentiel dans les leucémies et les lymphomes. En effet, des lymphocytes T $V\delta 1^+$ provenant du sang peuvent reconnaître des cellules de lignées de lymphomes B (Hacker, Kromer et al. 1992) et relarguer le contenu de leurs granules (Narazaki, Watari et al. 2003). D'autres preuves sont apportées notamment par une étude que nous avons citée précédemment. En effet, des lignées dérivant de lymphocytes T $V\delta 1^+$ isolés de moelle osseuse de transplantés avec des leucémies lymphoblastiques (LL) aiguës, sont cytotoxiques *in vitro* vis-à-vis des différentes lignées lymphoïdes mais pas de lignées myéloïdes (Lamb, Musk et al. 2001; Meeh, King et al. 2006). De même des cellules T $\gamma\delta$ principalement $V\delta 1^+$, provenant de patients atteints de leucémies aiguës, lysent des cellules tumorales autologues ainsi que des lignées de cellules tumorales leucémiques *in vitro* (Duval, Yotnda et al. 1995; Meeh, King et al. 2006).

2.2. Reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T $\gamma\delta$

Plusieurs molécules peuvent participer à la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T $\gamma\delta$ et à leur activation. Aujourd'hui, il est connu que, les TCR $\gamma\delta$ et leur ligands spécifiques participent à l'activation des cellules T $\gamma\delta$ mais aussi d'autres récepteurs co-activateurs comme la molécule NKG2D capable elle aussi de reconnaître des ligands en surface des cellules tumorales.

a. Reconnaissance *via* le TCR $\gamma\delta$ (figure 14)

Aucune preuve directe d'une liaison TCR/ligands n'existe chez l'homme à l'heure actuelle. En effet, seules des expériences de transferts des gènes du TCR $\gamma\delta$, d'utilisation de

TCR solubles ou encore de blocages à l'aide d'Ac anti-TCR $\gamma\delta$ suggèrent une activation des cellules dépendante du TCR.

■ TCR et ses ligands tumoraux pour les lymphocytes T $V\delta 2^+$

Des exemples de transferts des gènes du TCR $V\gamma 9V\delta 2$ sur des lignées *reporter* ou des blocages avec des Ac anti-TCR $\gamma\delta$ démontrent que la lyse des lignées de lymphomes résulterait d'une stimulation médiée spécifiquement par le TCR $V\gamma 9V\delta 2$ et qu'elle peut faire intervenir la voie granzyme/perforine (Bukowski, Morita et al. 1995; Sicard, Al Saati et al. 2001).

Des preuves indirectes soutiennent que le TCR des lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$ pourrait reconnaître des phosphoantigènes. Il est aujourd'hui connu que certaines cellules tumorales peuvent produire IPP à des taux augmentés (Gober, Kistowska et al. 2003; Uchida, Ashihara et al. 2007), ce qui permettrait aux cellules T $\gamma\delta$ de les discriminer des cellules non transformées. La reconnaissance de cet IPP pourrait se faire d'une manière dépendante du TCR, par exemple, dans l'étude Corvaisier et al, le clone T $V\delta 2^+$, isolé pour sa forte réactivité (IPP dépendante) contre des lignées de carcinomes coliques, a été montré comme capable de reconnaître les cellules tumorales de façon TCR dépendante (mais aussi NKG2D dépendante) (Corvaisier, Moreau-Aubry et al. 2005). De plus, nous en avons parlé précédemment, Scotet et son équipe ont montré que le complexe enzymatique ApoA1/AS pouvait être retrouvé en surface de cellules tumorales et reconnu par des lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$. A l'aide de TCR solubles, ils ont mis en évidence qu'il existerait probablement une interaction entre le TCR et ce complexe (Scotet, Martinez et al. 2005).

Comme nous l'avons soulevé précédemment, on ne sait pas clairement aujourd'hui si les TCR $\gamma\delta$ reconnaissent un antigène seul ou présenté par une molécule présentatrice (Hayday 2009). Par exemple, en utilisant des TCR $V\delta 2^+$ solubles de macaques, Wei et al ont proposé l'existence d'une molécule membranaire des APC présentant le phosphoantigène HMBPP, non retrouvée sur des APC murines et éliminée par un traitement aux protéases (Wei, Huang et al. 2008). Cette molécule qui pourrait présenter les phosphoantigènes n'a pas encore été identifiée mais ne semble pas être une molécule classique du CMH ou le CD1 (Sarikonda, Wang et al. 2008).

■ TCR et ses ligands tumoraux pour les lymphocytes T $V\delta 2^{neg}$

Les ligands des tumeurs des TCR T $V\delta 2^{neg}$ restent encore, à l'heure actuelle, inconnus. Seuls MICA et MICB, dont nous avons parlé précédemment, ont été proposés pour l'instant en tant que ligands exprimés par les cellules tumorales pour les TCR $V\delta 1^+$. En effet, Groh et son équipe ont observé l'expression de MICA/B sur de nombreuses tumeurs épithéliales fraîchement isolées (poumon, prostate, ovaire, colon, sein). De plus, ils ont démontré que l'infiltrat de cellules T $V\delta 1^+$ dans des tumeurs est corrélé avec la présence de MICA (Groh, Rhinehart et al. 1999). L'expression de MIC a été montrée sur des mélanomes primaires et leurs lésions métastatiques (Vetter, Groh et al. 2002) laissant supposer une action possible des lymphocytes T $\gamma\delta$ à la fois sur des tumeurs primaires mais aussi sur leurs métastases. Des études amènent les preuves d'une reconnaissance directe de MICA par le TCR $V\delta 1^+$ contrairement aux TCR $V\gamma 9V\delta 2$; grâce à des tétramères MICA fixant des TCR de transfectants exprimant le TCR $V\delta 1^+$ mais pas NKG2D (Wu, Groh et al. 2002) ou encore grâce à des TCR $V\delta 1^+$ solubles qui lient spécifiquement la protéine MICA recombinante (Zhao, Huang et al. 2006). Groh et al ont montré que des clones T $V\delta 1^+$ dérivés de cellules infiltrant des carcinomes coliques pouvaient reconnaître, via leur TCR des cellules exprimant MICA et MICB et les lyser (Groh, Steinle et al. 1998). On peut noter que contrairement au

CD1, l'autre ligand connu des TCR $V\delta 2^{neg}$, exprimé par des APC qui pourrait être une molécule présentant des glycolipides microbiens aux TCR $V\delta 1$ (Hayday 2009), MICA/B n'est pas une molécule présentatrice d'antigène et serait reconnu directement par les TCR $\gamma\delta$.

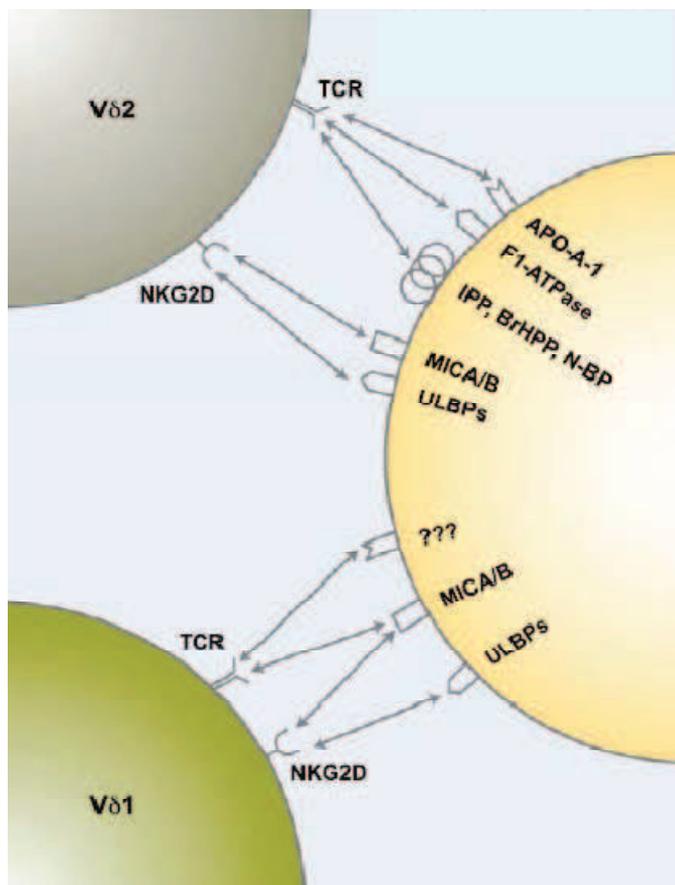


Figure 14 : Ligands tumoraux reconnus par les différentes sous-populations T $\gamma\delta$. D'après (Kabelitz, Wesch et al. 2007) avec N-BP=aminobisphosphonates

b. Reconnaissance *via* NKG2D (figure 14)

La majorité des cellules T $\gamma\delta$ expriment de nombreux récepteurs NK (NKR) qui pourraient expliquer en partie leur réactivité vis-à-vis de ces nombreux types de cellules tumorales (Bauer, Groh et al. 1999; Das, Groh et al. 2001). Parmi ces récepteurs, nous nous concentrerons uniquement sur le NKG2D qui semble important dans la reconnaissance des cellules tumorales et fut probablement le plus étudié des récepteurs NK au niveau des lymphocytes T $\gamma\delta$. De manière intéressante, il semble que NKG2D pourrait être une molécule co-stimulatrice et/ou éventuellement directement activatrice pour les cellules T $\gamma\delta$.

■ NKG2D exprimé sur les lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$

Les molécules de stress MICA/MICB exprimées par les cellules tumorales (Girlanda, Fortis et al. 2005) peuvent être, comme nous l'avons déjà vu, directement reconnues par le TCR des lymphocytes T $V\delta 2^{neg}$ mais aussi par le NKG2D exprimé par les cellules T aussi bien $V\gamma 9V\delta 2$ que $V\delta 2^{neg}$. Ainsi, plusieurs études, effectuant notamment des blocages de NKG2D à l'aide d'Ac, proposent que NKG2D aurait des fonctions co-stimulatrices du TCR $V\gamma 9V\delta 2$. On peut citer par exemple l'étude de Das et al dans laquelle la sensibilité de cellules

tumorales (Daudi), sur-exprimant MICA, à la lyse par un clone T V δ 2⁺ est largement augmentée (de 15 fois) par rapport à des cellules Daudi, non transfectées avec MICA et cette cytotoxicité est partiellement bloquée à l'aide d'Ac anti-NKG2D (Das, Groh et al. 2001). De même, dans l'étude de Corvaisier et al que nous avons cité précédemment, NKG2D interviendrait en tant que molécule co-stimulatrice dans la cytotoxicité des cellules T V γ 9V δ 2 vis-à-vis de lignées d'adénocarcinome colique puisque cette cytotoxicité est inhibée par l'ajout d'Ac anti-NKG2D (Corvaisier, Moreau-Aubry et al. 2005). Plus récemment, il a été mis en évidence que la molécule UL16 binding protein 4 (ULBP 4) (ligand d'ULBP4) serait exprimée en surface des cellules tumorales et pourraient lier à la fois des TCR V γ 9V δ 2 et NKG2D jouant ainsi un rôle dans le contrôle du développement tumoral (Kong, Cao et al. 2009).

Plus récemment, des données proposent que des cellules T V γ 9V δ 2 pourraient être activées directement par NKG2D (via des Ac anti-NKG2D ou des protéines MICA) et être capables de lyser de cellules MICA⁺ en absence d'un signal transmis par le TCR (Rincon-Orozco, Kunzmann et al. 2005). De plus, Wrobel et al démontrent que la lyse de certaines lignées d'adénocarcinomes (poumons et mélanomes) par des lignées T V γ 9V δ 2 est inhibée par un Ac anti-NKG2D mais pas un Ac anti-TCR, suggérant qu'elle ne nécessiterait pas un engagement du TCR avec ces ligands (Wrobel, Shojaei et al. 2007).

■ NKG2D exprimé sur les lymphocytes T V δ 2^{neg}

L'activation des lymphocytes T V δ 2^{neg} par les tumeurs peut aussi faire intervenir non seulement de signaux dépendant du TCR mais aussi des signaux de co-stimulations délivrés par les molécules NKG2D. Des cellules T V δ 1⁺ semblent reconnaître les molécules MICA/MICB en surface de cellules tumorales simultanément avec leur TCR et le NKG2D qu'elles expriment (Wu, Groh et al. 2002). De plus, tout comme la molécule ULBP4 pour les cellules T V δ 2⁺, d'autres molécules ULBP ligands du NKG2D peuvent être retrouvées en surface des cellules tumorales et pourraient être des co-stimulateurs des lymphocytes T V δ 2^{neg}. Des cellules tumorales exprimant ULBP3 peuvent être reconnues et lysées par des cellules T V δ 1⁺ (Poggi, Venturino et al. 2004). De manière intéressante, chez des patients avec des lymphomes non-Hodgkinnien (Catellani, Poggi et al. 2007) ou des patients avec des LL chroniques à cellules B (Poggi, Venturino et al. 2004), l'expression de ULBP2 et ULBP3 sur les cellules tumorales est associée avec une meilleure lyse par des cellules T V δ 1⁺ NKG2D⁺ *in vitro*. Contrairement aux lymphocytes T V γ 9V δ 2, il ne semble pas avoir été démontré jusqu'à présent sur des lymphocytes T V δ 2^{neg} humains qu'une activation cellulaire pouvait passer par NKG2D seul indépendamment du TCR.

2.3. Rôle immunosuppresseur des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans les tumeurs

L'activité immuno-régulatrice est très connue pour les lymphocytes T $\alpha\beta$ CD4⁺, en revanche, beaucoup moins de données existent concernant les lymphocytes T $\gamma\delta$. Des observations montrent que les lymphocytes T $\gamma\delta$ pourraient exprimer des chimiokines (comme RANTES, MIP-1 α et δ ou la lymphotactine) et des molécules régulatrices (tel que l'IL10 ou TGF β) de la même façon que les lymphocytes T Reg $\alpha\beta$ dans le cadre d'infection à différents pathogènes (Hayday and Tigelaar 2003). De même des souris déficientes en lymphocytes T $\gamma\delta$ semblent développer des réponses immunitaires accélérées dans des modèles non-infectieux de pathologies auto-immunes : comme le lupus érythémateux (Peng, Madaio et al. 1996) ou encore un modèle d'auto-immunité épidermique médiée par les cellules T $\alpha\beta$ (Shiohara, Moriya et al. 1996).

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ pourraient supprimer la réponse immunitaire effectrice au cours du développement d'un cancer mais peu de données existent à ce sujet à l'heure actuelle.

Cependant Ke et al ont déjà montré qu'une lignée tumorale de cellules thymiques implantée en s.c dans des souris dépourvues de lymphocytes T $\gamma\delta$ (déplétées à l'aide d'un Ac ou TCR $\delta^{-/}$) a une croissance ralentie comparée à des souris immunocompétentes (Ke, Kapp et al. 2003). Cette fonction immunosuppressive des cellules T $\gamma\delta$ est très bien illustrée dans l'étude récente de Peng et son équipe que nous avons citée précédemment. En effet ils se sont rendu compte que malgré un infiltrat de 95% de cellules T V $\delta 1^+$, les tumeurs mammaires continuent à grossir suggérant clairement un échec des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans l'élimination tumorale. Cette équipe a démontré *in vitro* que les TILs V $\delta 1^+$ provenant des tumeurs du sein, peuvent inhiber la prolifération des cellules T $\alpha\beta$ naïves, empêcher la sécrétion d'IL2 par les cellules T effectrices CD4 $^+$ ou CD8 $^+$ en réponse à des cellules tumorales mais aussi bloquer la maturation et les fonctions des cellules dendritiques. De manière intéressante, cette activité d'immunosuppression peut être réversée grâce à des ligands du Toll-Like Récepteur 8 (TLR) (comme Poly-G3 ou ssRNA40) *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de souris NOD-SCID. (Peng, Wang et al. 2007).

2.4 Spécificité tumorale

Cette notion de spécificité tumorale des lymphocytes T $\gamma\delta$ a été soulevé notamment par Choudhary et ses collaborateurs qui ont montré que des clones T V $\gamma 3$ V $\delta 1$, isolés à partir de carcinomes rénaux, peuvent lyser spécifiquement des cellules tumorales autologues ainsi que plusieurs cellules de carcinomes rénaux allogéniques mais pas d'autres cellules tumorales ou normales (Choudhary, Davodeau et al. 1995). Il semble en effet important de noter que les lymphocytes T $\gamma\delta$ tuent préférentiellement des cellules tumorales et ne montrent que très peu (voire pas du tout) de réactivité vis-à-vis de cellules non transformées. (Corvaisier, Moreau-Aubry et al. 2005; Viey, Fromont et al. 2005) (Halary, Pitard et al. 2005). Une reconnaissance de ligands « du soi » surexprimés lors de stress cellulaires (tumorigénèse) permettrait aux lymphocytes T $\gamma\delta$ de discriminer les cellules normales des cellules en transformation. De plus, malgré une reconnaissance non spécifique de ligands possible grâce aux molécules NKG2D, le TCR $\gamma\delta$ pourrait conférer cette caractéristique de spécificité tumorale aux lymphocytes T $\gamma\delta$. Ainsi, ces cellules pourtant proches du système immunitaire inné, serait particulièrement intéressantes pour un potentiel usage en immunothérapie.

3. Immunothérapies anti-cancer basées sur les lymphocytes T $\gamma\delta$

Deux principales approches peuvent être envisagées pour explorer le potentiel thérapeutique des lymphocytes T $\gamma\delta$ (figure 15) : 1) L'isolation *ex vivo* des lymphocytes T $\gamma\delta$ suivie d'une large expansion *in vitro* et d'un transfert adoptif chez les patients. 2) La stimulation directement *in vivo* par administration de molécules qui induisent une expansion et une activation des cellules T $\gamma\delta$. (Kabelitz, Wesch et al. 2004). Deux grands types de molécules sont utilisées pour les stimulations *in vivo* ou *ex vivo* de lymphocytes T $\gamma\delta$ dans les protocoles d'immunothérapies existant contre les cancers : les phosphoantigènes synthétiques et les amino-bisphosphonates (N-BP).

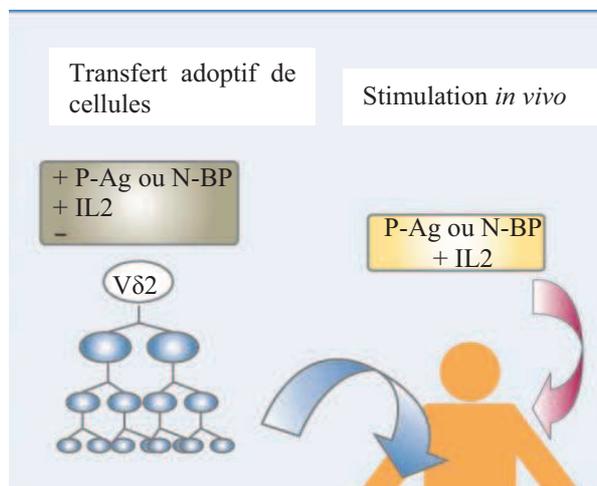


Figure 15 : Stratégies pour les immunothérapies à base de lymphocytes T $\gamma\delta$. D'après (Kabelitz, Wesch et al. 2007). P-Ag=Phosphoantigène N-BP=amino-bisphosphonates.

Jusqu'à aujourd'hui seules des stratégies impliquant les lymphocytes T $V\gamma9V\delta2$ ont été testées en tant qu'immunothérapies des cancers. En effet comme nous l'avons vu précédemment plusieurs ligands stimulant ces sous-populations $V\delta2^+$ ont été bien caractérisés alors que les ligands des sous-populations $V\delta2^{neg}$ restent encore à mieux définir (à l'exception des MIC). De plus les sous-populations T $V\delta2^{neg}$ sont minoritaires dans la circulation sanguine et, même si elles peuvent parfois être augmentées lors de certaines pathologies (Dechanet, Merville et al. 1999), il apparaît pour l'instant difficile d'en récupérer suffisamment chez des patients cancéreux pour les amplifier considérablement *ex vivo* et les re-transférer ensuite chez les malades.

3.1 Molécules utilisées pour stimuler les lymphocytes T $\gamma\delta$ dans les immunothérapies

a. Utilisation des phosphoantigènes synthétiques

Nous l'avons vu précédemment, les lymphocytes T $V\gamma9V\delta2$ peuvent être activés par des phosphoantigènes (Morita, Jin et al. 2007). Des phosphoantigènes synthétiques capables de stimuler les lymphocytes T $\gamma\delta$ ont été produits (figure 16). Pour l'instant le 2-méthyl-3-butényl-1-pyrophosphate (2M3BP) et le bromohydrine phosphate (BrHPP) ont été testé cliniquement en immunothérapie anti-cancer.

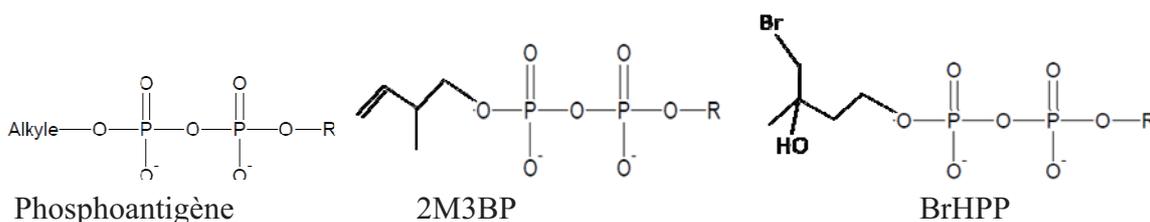


Figure 16 : Structures des phosphoantigènes. Ici sont représentées la structure générale des phosphoantigènes avec 2 groupements phosphates et un groupement alkyle (à gauche), et celles des 2 phosphoantigènes utilisés dans les protocoles actuels d'immunothérapie le 2-méthyl-3-butényl-1-pyrophosphate=2M3BP (au milieu) et le bromohydrine phosphate=BrHPP (aussi appelé PhosphostimTM, Innate Pharma, Marseille, France) (à droite).

Les phosphoantigènes synthétiques ont été montrés *in vitro* comme étant stimulant à des concentrations très faibles (de l'ordre du pico ou nano molaire) (Belmant, Espinosa et al.

1999). Ces phosphoantigènes sont capables non seulement d'activer les lymphocytes T V γ 9V δ 2 (Sireci, Espinosa et al. 2001) mais aussi d'augmenter leur cytotoxicité vis-à-vis de différentes sortes de cellules tumorales (Kato, Tanaka et al. 2001) comme par exemple des cellules de lignées de lymphome B (Sicard, Al Saati et al. 2001). Par exemple Viey et son équipe ont effectué, en présence de BrHPP et d'IL2, une amplification *ex vivo* de cellules T V γ 9V δ 2 provenant de patients avec des carcinomes rénaux métastatiques. Ces cellules T V γ 9V δ 2 ayant proliférées expriment des marqueurs d'activation et des marqueurs mémoires et peuvent lyser des cellules tumorales autologues (Viey, Fromont et al. 2005). Les phosphoantigènes synthétiques ont donc été utilisés dans des protocoles d'immunothérapies proposant une stimulation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 *ex vivo* mais aussi *in vivo*.

b. Utilisation des amino-bisphosphonates (N-BP)

Tout comme les phosphoantigènes, les bisphosphonates sont des molécules synthétiques. Ces molécules contiennent deux groupements phosphates et un ou plusieurs groupements amines (figure 17).

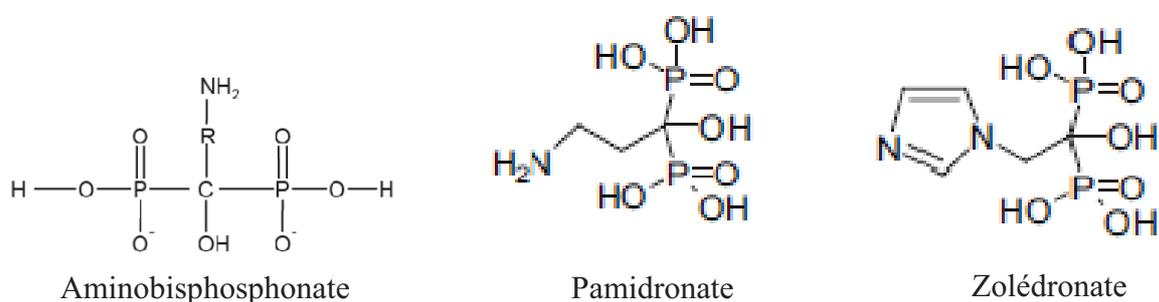


Figure 17: Structures des aminobisphosphonates. Ici sont représentées les structures: générale des aminobisphosphonates avec deux groupements phosphates et un groupement amine (à gauche), et de deux exemples de molécules amino-bisphosphonate utilisées en immunothérapie anti-cancer, le pamidronate (Aredia® Novartis, Basel, Switzerland) (au milieu) et le zolédronate (Zometa®) (à droite).

Les amino-bisphosphonates sont des inhibiteurs potentiels de l'enzyme FPPS de la voie de synthèse des isoprénoïdes (Bergstrom, Bostedor et al. 2000; Dunford, Thompson et al. 2001) provoquant une accumulation intracellulaire de l'IPP (figure 19) (Tanaka, Morita et al. 1995). On peut noter que l'inhibition de la FPPS médiée par les aminobisphosphonates contribue à une activation sélective des lymphocytes T V γ 9V δ 2 (Schnurr, Scholz et al. 2002).

L'utilisation de ces molécules bisphosphonates en immunothérapie anti-cancer résulte de l'observation que les N-BP, utilisés en thérapie pour traiter l'ostéoporose, pouvaient exercer une activité stimulatrice sur des cellules T V γ 9V δ 2 aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, en étant utilisés à des concentrations plus élevées que le BrHPP (de l'ordre du micro-molaire) (Kunzmann, Bauer et al. 1999). En effet la stimulation de lymphocytes T $\gamma\delta$ par différents N-BP (l'alendronate, l'ibandronate et le pamidronate) et de l'IL2 entraîne non seulement leur prolifération, le relargage de cytokines (comme l'IFN γ) mais aussi leur cytotoxicité contre des lignées cellulaires de lymphomes et de myélomes (Kunzmann, Bauer et al. 2000). De plus, Kondo et son équipe ont démontré que des lymphocytes T $\gamma\delta$ provenant de patients sains et de patients atteints de carcinomes variés (poumon, sein, prostate) peuvent être stimulés efficacement *in vitro* par un N-BP (le zolédronate) et de l'IL2. Ces cellules T $\gamma\delta$ peuvent alors proliférer et exprimer des molécules effectrices telles que l'IFN γ , le TNF α ou encore des perforines et des granzyme (Kondo, Sakuta et al. 2008).

Un gros avantage des N-BP réside dans le fait qu'ils ont été montrés comme pouvant exercer un effet anti-tumoral direct. En effet, ils pourraient induire de l'apoptose via la voie *ras* ou encore des propriétés anti-métastatiques démontrées *in vitro* comme l'inhibition de la migration, de l'invasion et de l'adhésion (Green 2003) (figure 18). Ainsi, les N-BP sont des candidats particulièrement attractifs pour l'immunothérapie de différents cancers puisqu'ils ont non seulement un effet activateur et stimulateur sur les lymphocytes T V γ 9 V δ 2 mais aussi une activité anti-tumorale directe.

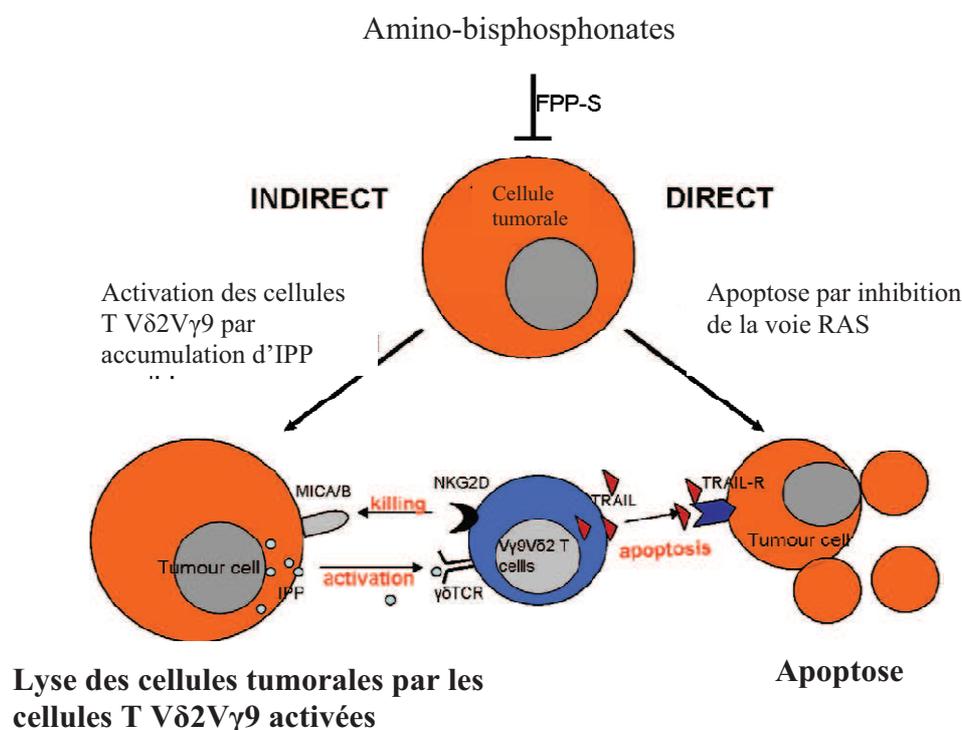


Figure 18 : Mode d'action des amino-bisphosphonates contre les tumeurs. Ils peuvent avoir un effet indirect en bloquant la FPP-S provoquant ainsi l'accumulation d'IPP dans la cellule tumorale et l'activation des cellules T V γ 9V δ 2 qui vont ensuite la lyser. Ils peuvent aussi avoir un effet direct sur les cellules tumorales en induisant l'apoptose. Sur la figure on voit aussi que les cellules T V δ 2V γ 9 peuvent exprimer la molécule TRAIL et induire l'apoptose des cellules tumorales. D'après (Laggner, Lopez et al. 2009).

c. Nécessité de l'IL2

Il est important de noter que la réponse proliférative des lymphocytes T $\gamma\delta$ aux phosphoantigènes et aux N-BP est strictement dépendante de la présence de la cytokine IL2. Cette cytokine est, comme nous l'avons vu précédemment, nécessaire à la survie des cellules T. Les concentrations d'IL2 relarguées par les lymphocytes T $\gamma\delta$ ne sont pas suffisantes (Pechhold, Wesch et al. 1994). Il est donc absolument essentiel de combiner les phosphoantigènes et les N-BP avec de l'IL2 dans les protocoles thérapeutiques d'activation des lymphocytes T $\gamma\delta$ ce qui ne pose pas de problème dans la mesure où la molécule d'IL2 possède une licence de drogue utilisée en thérapie notamment dans les carcinomes du rein (Yang, Sherry et al. 2003).

3.2. Protocoles d'immunothérapies anti-cancer utilisant la stimulation *ex vivo* et le transfert adoptif de cellules T $\gamma\delta$

a. Utilisation des phosphoantigènes synthétiques pour les stimulations *ex vivo*

Plusieurs protocoles utilisant le BrHPP ou le 2M3BPP ont été testés chez des patients. Ainsi, la majorité des protocoles mis au point pour les thérapies de cancer du rein ont proposé des transferts adoptifs. Plusieurs essais cliniques actuellement en Phase I et II, utilisant les lymphocytes T V γ 9V δ 2 s'appliquent chez des patients souffrant de cancers du rein (Viey, Laplace et al. 2005). On peut citer l'étude pilote dans le cancer du rein, dans laquelle des lymphocytes T $\gamma\delta$ isolés de patients ont été amplifiés *ex vivo* avec du 2M3BPP et administrés aux patients par transfert adoptif. Sur les 7 patients avec des carcinomes rénaux avancés inclus dans l'étude, aucune toxicité *in vivo* n'a été observée et 3 des patients présentent une augmentation de leur taux de lymphocytes T $\gamma\delta$ (Kobayashi, Tanaka et al. 2007). Très récemment un essai clinique de Phase I a utilisé la stimulation, à grande échelle, de lymphocytes T $\gamma\delta$ *ex vivo* via du BrHPP (Innacell $\gamma\delta^{\text{TM}}$, (Salot, Laplace et al. 2007)) suivi du transfert adoptif chez des patients atteints de carcinomes rénaux métastatiques. De même aucune toxicité du traitement pour l'organisme n'a été observée mais les résultats de l'étude ne permettent pas de conclure sur une réelle efficacité contre le cancer rein (Bennouna, Bompas et al. 2008).

Il est encore trop tôt, en l'état actuel des connaissances, pour dresser des conclusions sur une réelle efficacité thérapeutique de ces protocoles de stimulations *ex vivo* de lymphocytes T $\gamma\delta$ re-transférés ensuite chez les patients. Par contre l'ensemble des essais cliniques a permis de démontrer qu'il était possible d'amplifier *in vitro* jusqu'à 8.10^{12} cellules T enrichies en lymphocytes T V γ 9V δ 2 qui pouvaient être ensuite re-transférées à des patients, accompagnés d'une toxicité réduite pour l'organisme (caractérisée par des fièvres, des frissons et de la fatigue).

b. Utilisation des amino-bisphosphonates (N-BP) pour les stimulations *ex vivo*

La quasi-totalité des études effectuées chez les patients avec des stimulations *ex vivo* de cellules T V γ 9V δ 2 proposent des amplifications à l'aide de phosphoantigènes que nous venons de décrire. Cependant, on peut citer une étude pilote très récente, lors de laquelle Abe Y et son équipe proposent l'utilisation de N-BP et d'IL2, pour stimuler *ex vivo* des lymphocytes T $\gamma\delta$ qui sont ensuite transférés chez des patients souffrants de myélome multiple. Même si cette étude permet de démontrer que cette thérapie n'entraînerait pas de toxicité pour l'organisme, aucune conclusion quant à une efficacité de cette méthode de traitement ne peut être avancée (Abe, Muto et al. 2009).

3.3. Protocoles d'immunothérapies anti-cancer utilisant des activations *in vivo* de cellules T $\gamma\delta$

Des injections d'agonistes des lymphocytes T $\gamma\delta$ dont nous venons de parler (phosphoantigènes, N-BP) peuvent être réalisées directement *in vivo*, en combinaison avec l'IL2, de manière à stimuler les lymphocytes T $\gamma\delta$ circulants.

a. Utilisation des phosphoantigènes synthétiques pour les stimulations *in vivo*

Pour l'instant il ne semble pas avoir été publié d'études cliniques chez l'homme. Cependant, une étude chez le singe forme la base des futurs essais cliniques utilisant des phosphoantigènes synthétiques pour activer les cellules T V γ 9V δ 2 *in vivo*. En effet Sicard H et son équipe ont démontré qu'une injection de phosphoantigènes (BrHPP, Phosphostim®) et de faibles doses d'IL2 chez des singes peut entraîner une expansion et une activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 *in vivo* sans entraîner de toxicité. Des injections répétées du traitement sont suivies par une expansion des lymphocytes T V γ 9V δ 2 de moins en moins forte chez le singe suggérant un phénomène d'épuisement de la réponse (Sicard, Ingoure et al. 2005).

b. Utilisation des NBP pour les stimulations *in vivo*

L'étude pilote chez l'homme utilisant les N-BP en stimulation *in vivo* a été effectué chez des patients souffrant de lymphomes non-Hodgkiniens ou de myélomes multiples chez qui les thérapies anti-cancéreuses « classiques » avaient échouées. Pour la première fois, Wilhelm et son équipe ont montré que l'administration de pamidronate, combiné à des faibles doses d'IL2, induit une activation et une prolifération sélective des lymphocytes T V γ 9V δ 2 qui est nécessaire et pré-requis pour l'élimination tumorale médiée par les lymphocytes T $\gamma\delta$. On peut relever un certain succès dans cette étude puisqu'une rémission partielle est observée chez un sous-groupe de 3 à 9 patients (sélectionnés au départ pour la capacité de leurs lymphocytes T $\gamma\delta$ à répondre *in vitro* au pamidronate) (Wilhelm, Kunzmann et al. 2003).

Dans une autre étude, du zolédronate a été administré à des patients cancéreux avec des métastases osseuses. Les cellules T V γ 9V δ 2 prélevées chez les patients 3 mois après le traitement *in vivo* montrent une production d'IFN γ augmentée *in vitro* en réponse à de l'IPP. Cela pourrait souligner une différenciation *in vivo* des lymphocytes T V γ 9V δ 2 en cellules productrice d'IFN γ (Dieli, Gebbia et al. 2003). Plus récemment ce même N-BP (zolédronate+IL2) a été administré à des patients avec des cancers de la prostate réfractaires aux hormones et a été démontré non toxique. 6 patients sur 9 traités ont même montré une expansion de cellules T $\gamma\delta$ et une rémission partielle (Dieli, Vermijlen et al. 2007). Enfin, on peut citer, un résultat très récent et encourageant où une équipe médicale a pu obtenir une régression des métastases pulmonaires et osseuses chez une patiente souffrant d'un mélanome suite à un traitement par du zolédronate combiné à une radiothérapie localisée. De manière intéressante chez cette patiente la majorité des cellules T $\gamma\delta$ circulantes 1 an après le traitement sont des sous-populations T V δ 1⁺. Cette situation pourrait éventuellement refléter une migration des cellules T V γ 9V δ 2 activées du sang vers les tissus tumoraux (Laggner, Lopez et al. 2009).

Ces inductions *in vivo* de lymphocytes T V γ 9V δ 2 pourraient même être envisagées chez des patients souffrant de cancers incurables à des stades très avancés. En effet, il a été montré par exemple que des cellules T $\gamma\delta$ provenant de patients avec des cancers colorectaux ou de l'œsophage multi-métastatiques en phase terminale, proliféraient et s'activaient convenablement *in vitro* en réponse à du zolédronate et de l'IL2 (Nagamine, Yamaguchi et al. 2009).

3.4. Limites des immunothérapies utilisant des lymphocytes T $\gamma\delta$

Il apparaît malheureusement qu'à part dans les primates non-humains sains, la moitié des patients traités avec des agonistes des lymphocytes T $\gamma\delta$ et de l'IL2 n'expandent pas leur

cellules T V γ 9V δ 2 périphériques. En effet de nombreux problèmes peuvent être rencontrés lors de l'utilisation de ces cellules T V γ 9V δ 2 en immunothérapie.

Par exemple, certaines cellules du système immunitaire du patient, comme les lymphocytes T Reg peuvent supprimer la réponse effectrice anti-tumorale des lymphocytes T $\gamma\delta$ stimulés *ex vivo* ou *in vivo*. Cette suppression des fonctions cytotoxiques anti-tumorales des lymphocytes injectés a en effet été un problème majeur lors des immunothérapies avec les lymphocytes T $\alpha\beta$ spécifiques d'un peptide antigénique tumoral (Gattinoni, Finkelstein et al. 2005). De plus, Kunzmann V et son équipe ont récemment mis en évidence qu'il existait une corrélation inverse entre le nombre de cellules T Reg circulantes et le taux de prolifération des lymphocytes T V γ 9V δ 2 induit par des phosphoantigènes chez des patients cancéreux. Ils ont confirmé *in vitro* la capacité des cellules T Reg à inhiber la prolifération des lymphocytes T V γ 9V δ 2 (Kunzmann, Kimmel et al. 2009).

La réponse proliférative *in vitro* de lymphocytes T $\gamma\delta$ provenant de patients atteints de cancer reste inférieure à celle obtenue avec des patients en bonne santé. Ce phénomène pourrait s'expliquer par les stimulations induites par les tumeurs chroniques des lymphocytes T V γ 9V δ 2 et l'induction d'une anergie des cellules. Cette réduction de la capacité proliférative des lymphocytes T $\gamma\delta$ reste un désavantage important pour leur utilisation en immunothérapie. Ce problème pourrait être résolu, par exemple, par l'administration de lymphocytes T V γ 9V δ 2 provenant de donneurs sains. En effet, ces sous-populations $\gamma\delta$ ne sont pas connues comme étant alloréactives et n'ont pas été impliquées dans la réaction de rejet *graft-versus-host* (GVH) (Thedrez, Sabourin et al. 2007).

Enfin, on peut noter que ce sont surtout les personnes âgées qui font parties des populations à risques pour les cancers. Or, il est aujourd'hui connu que les lymphocytes T V γ 9V δ 2 possèdent des altérations numériques et fonctionnelles chez la plupart des personnes d'un âge avancé qui peuvent rendre difficile leur stimulation *ex vivo*. En effet, chez ce type de patient, les cellules T $\gamma\delta$ seraient en quantité réduite, en état d'anergie et répondraient très faiblement aux stimulations par les phosphoantigènes (Argentati, Re et al. 2002; Colonna-Romano, Aquino et al. 2004; Re, Poccia et al. 2005).

3.5. Optimisation des thérapies anti-cancer à lymphocytes T $\gamma\delta$

Les protocoles de thérapies anti-cancers à base de lymphocytes T V γ 9V δ 2 pourraient donc être améliorés par différentes stratégies, par exemple:

a. L'ajout de cytokines

L'ajout de certaines cytokines pourrait augmenter les fonctions effectrices des cellules T $\gamma\delta$ avant leur transfert adoptif ou directement *in vivo*. L'IL15 pourrait par exemple être utilisé puisqu'il est connu comme un important facteur de croissance des lymphocytes T $\gamma\delta$, comme nous l'avons déjà précisé précédemment (Caccamo, Meraviglia et al. 2005). De plus, cette cytokine pourrait favoriser la lyse de cellules cibles NKG2D-dépendantes par les lymphocytes T $\gamma\delta$ (Meresse, Chen et al. 2004). De même, l'IL21 en combinaison avec l'IL2 pourrait potentialiser la réponse anti-tumorale des lymphocytes T V γ 9V δ 2 (Thedrez, Harly et al. 2009).

b. La combinaison des transferts adoptifs de lymphocytes T $\gamma\delta$ avec des traitements par N-BP

Nous en avons parlé précédemment, les N-BP présentent des effets anti-tumoraux directs. De plus, on peut noter que des cellules tumorales ayant été en contact avec des N-BP semblent être plus sensibles à la lyse par les cellules T V γ 9V δ 2 (Gober, Kistowska et al.

2003) à cause de l'IPP intracellulaire qu'elles accumulent et/ou de l'action directe des N-BP. Ainsi, combiner un transfert adoptif de lymphocytes T $\gamma\delta$ avec un traitement N-BP pourrait accroître la sensibilité tumorale à la lyse par les cellules T V γ 9V δ 2.

c. La combinaison avec de la chimiothérapie

La chimiothérapie pourrait être appliquée comme un traitement préliminaire au patient receveur du transfert adoptif de lymphocytes T $\gamma\delta$, dans le but d'induire une lymphodéplétion et ainsi d'éliminer les populations T Reg. En effet, dans le cas de transfert de lymphocytes T $\alpha\beta$, des agents chimiothérapeutiques permettent une lymphodéplétion chez des patients atteints notamment de mélanomes métastatiques (Dudley, Wunderlich et al. 2002; Dudley, Wunderlich et al. 2005). Par ailleurs, on peut citer l'exemple d'une étude récente *in vitro* dans laquelle un pré-traitement des cellules tumorales, de lignées de carcinomes de diverses origines, avec des agents chimiothérapeutiques (comme le cisplatine ou la doxorubicine) et du zolédronate entraîne par la suite une lyse rapide de ces cellules tumorales par les lymphocytes T V γ 9V δ 2 (avec des niveaux de cytotoxicité avoisinant les 90%) (Mattarollo, Kenna et al. 2007). Les cellules T V γ 9V δ 2 pourraient donc être utilisées en thérapie en combinaison avec des agents anti-cancéreux chimiothérapeutiques.

d. La combinaison avec des Ac monoclonaux

Il a été démontré qu'une fraction significative des lymphocytes T V γ 9V δ 2 de la circulation sanguine exprime la molécule CD16 (le récepteur Fc γ RIII), cette molécule étant préférentiellement up-régulée sur des sous-populations cellulaires T récemment activées/ effecteurs mémoires (appelées TEMRA) (Angelini, Borsellino et al. 2004). Lafont et al avaient déjà montré que suite à une stimulation *via* des antigènes non-peptidiques des cellules T V γ 9V δ 2 pouvaient exprimer le CD16, molécule constitutivement exprimée par les cellules NK (Lafont, Liautard et al. 2001). Des cellules T $\gamma\delta$ CD16⁺ pourraient exercer une cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac (ADCC) via la molécule CD16 (Lanier, Kipps et al. 1985; Braakman, van de Winkel et al. 1992).

Nous avons déjà décrit au début de l'introduction que des immunothérapies anti-cancer à base d'Ac ont déjà fait les preuves de leur efficacité. Ainsi, sur la base des protocoles d'immunothérapie combinant l'Ac rituximab (actif contre les lymphomes B CD20⁺) et la chimiothérapie (Marcus, Imrie et al. 2005) ou l'Ac trastuzumab (actif contre les tumeurs du sein exprimant le récepteur HER2) et la chimiothérapie (Smith, Procter et al. 2007), Tokuyama et al ont cherché, récemment, à augmenter la cytotoxicité de cellules T V γ 9V δ 2 CD16⁺ à l'aide de ces deux Ac. Ils ont pu observer, *in vitro*, que la cytotoxicité de lymphocytes T V γ 9V δ 2 vis-à-vis de cellules de lignées tumorales CD20⁺ était améliorée avec des combinaisons avec le rituximab. De même une combinaison de ces lymphocytes T $\gamma\delta$ avec du trastuzumab entraîne une augmentation de la lyse de cellules tumorales exprimant HER2 (Tokuyama, Hagi et al. 2008). Gertner-Dradenne J et son équipe ont même démontré, plus récemment, que des injections de BrHPP et d'IL2 combinés à de l'Ac rituximab chez des macaques peuvent activer les lymphocytes T V γ 9V δ 2. Ils observent alors une déplétion des lymphocytes B, au niveau du sang et des ganglions lymphatiques, plus prolongée dans le temps que suite à un traitement par rituximab seul ou par rituximab + IL2 (Gertner-Dardenne, Bonnafous et al. 2009). Des thérapies combinant des lymphocytes T V γ 9V δ 2 CD16⁺ ayant proliféré *ex vivo* puis transférés passivement ou des injections directes d'agonistes stimulateurs (BrHPP et N-BP) avec des Ac spécifiques monoclonaux pourraient donc être envisagées.

Contexte de travail

CONTEXTE DES TRAVAUX AU LABORATOIRE

Un des principaux centres d'intérêts de l'équipe de Julie Déchanet Merville que j'ai intégrée au laboratoire est l'étude de la réponse des lymphocytes T $\gamma\delta$ au CMV. Les résultats initiaux de l'équipe mettent en évidence une expansion périphérique de lymphocytes T $\gamma\delta$ dans la circulation sanguine de patients transplantés, immunosupprimés et développant une infection à CMV (Dechanet, Merville et al. 1999). Ils ont montré que les sous-populations augmentées en périphérie étaient $V\delta 2^{neg}$ et possédaient non seulement un phénotype activé ($CD45RO^+CD45RA^{high}CD69^+$) mais aussi des marqueurs comme le $CD8\alpha$ suggérant une origine intestinale de ces cellules T $V\delta 2^{neg}$. Ces cellules T $V\delta 1^+$, $V\delta 3^+$ mais aussi $V\delta 5^+$ (chez un patient en particulier) qui sont normalement minoritaires dans le compartiment sanguin représentaient chez ces patients transplantés 5 à 50% des cellules T totales du sang (Dechanet, Merville et al. 1999). Leurs analyses montrent que l'expansion périphérique est prolongée dans le temps (Merville, Dechanet et al. 2000) et est concomitante avec la résolution du CMV chez les patients transplantés (Lafarge, Merville et al. 2001) suggérant clairement que les lymphocytes T $\gamma\delta$ uniquement des sous-populations $V\delta 2^{neg}$ auraient un rôle protecteur lors de l'infection à CMV. De façon intéressante, plus récemment, une étude de l'équipe de Julie Déchanet-Merville a étendu cette possible implication des lymphocytes T $V\delta 2^{neg}$ dans la réponse anti-CMV chez des individus sains. En effet, il a été observé une expansion périphérique de lymphocytes T $V\delta 1^+$, possédant un phénotype effecteur/mémoire (TEMRA) chez des individus sains séropositifs pour le CMV par rapport à des individus séronégatifs (Pitard, Roumanes et al. 2008).

Par ailleurs l'équipe a généré des lignées et des clones de lymphocytes T $V\delta 2^{neg}$, à partir de ces cellules $V\delta 2^{neg}$ isolées du sang des patients transplantés. Elle a montré l'expression de CCR9 sur ces cellules renforçant l'hypothèse de leur origine intestinale. De plus, ces cellules T $V\delta 2^{neg}$ présentaient *in vitro* une réactivité TCR-dépendante double; elles pouvaient lyser des fibroblastes humains infectés par le CMV mais aussi des cellules tumorales. Certains clones T $V\delta 2^{neg}$ en particulier, (dont le clone utilisé pour notre étude *in vivo*) présentaient une cytotoxicité spécifique vis à vis de lignées d'adénocarcinome colique (dont la lignée HT29) mais pas de cellules épithéliales normales (Halary, Pitard et al. 2005).

Ces résultats du laboratoire suggèrent que les cellules infectées par le CMV et les cellules tumorales pourraient exprimer un ligand commun induit par le stress, reconnu par les lymphocytes T $V\delta 2^{neg}$ et actuellement à l'étude au sein de l'équipe. Ainsi, les sous-populations T $V\delta 2^{neg}$, amplifiées durant l'infection à CMV, pourraient être impliquées dans l'immunosurveillance anti-tumorale. De plus, l'origine intestinale probable de ces cellules et leur réactivité *in vitro* vis-à-vis de lignée d'adénocarcinome colique supporte leur rôle potentiel dans l'immunosurveillance anti-tumorale au niveau d'épithéliums intestinaux. Par ailleurs, il est intéressant de noter que la grande majorité des études effectuées aussi bien chez l'homme que dans les modèles murins portent sur les lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$ et des immunothérapies anti-cancers utilisant ces sous-populations sont actuellement en phase d'essais cliniques. Il n'existe à l'heure actuelle aucune thérapie anti-cancer mise au point utilisant des lymphocytes T $V\delta 2^{neg}$ qui sont pourtant des candidats intéressants pour la lutte contre les carcinomes, notamment les carcinomes coliques, de part leur localisation préférentielle au niveau des épithéliums.

Objectif principal de ma thèse :

Ainsi, à mon arrivée au laboratoire notre objectif majeur était d'approfondir dans un contexte *in vivo*, le potentiel anti-tumoral, déjà mis en évidence *in vitro*, de ces lymphocytes T $V\delta 2^{neg}$ vis-à-vis de tumeurs d'origine colique. Nous avons donc développé une étude fondamentale dans des modèles murins du potentiel anti-tumoral de ces lymphocytes T $V\delta 2^{neg}$ humains vis-à-vis de cellules d'une lignée humaine d'adénocarcinome colique.

Résultats
1^{ère} Partie

I. 1^{ère} partie du projet : ETUDE DE LA REACTIVITE ANTITUMORALE DE LYMPHOCYTES T $\gamma\delta$, SPECIFIQUE DE CELLULES INFECTEES PAR LE CMV, DANS UN MODELE MURIN DE XENOGREFFE

1. Objectifs de l'étude

Comme nous venons de le voir, les études faites *in vitro* au laboratoire suggèrent un potentiel anti-tumoral des lymphocytes T V δ 2^{neg} réactifs contre le CMV. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ ont déjà été montrés *in vivo*, notamment dans les modèles murins, comme des cellules importantes dans l'immunosurveillance anti-tumorale.

Notre objectif était donc d'étudier la réactivité antitumorale *in vivo* de clones T V δ 2^{neg}, doublement réactifs *in vitro* contre le CMV et des cellules tumorales d'origine coliques. Nous avons à cet effet utilisé un modèle murin chimérique, que nous décrirons plus bas, qui nous a permis de tester les points ci-après :

- ◆ Nous avons testé si des clones T V δ 2^{neg} injectés localement en s.c sur le site d'implantation de cellules tumorales coliques HT29 pouvaient avoir un effet sur la croissance des tumeurs solides.
- ◆ De plus, selon nous, le potentiel anti-tumoral de ces clones comprenait non seulement leur capacité à atteindre les cellules cibles mais aussi à les lyser. Ainsi, nous avons réalisé une étude approfondie du potentiel migratoire de ces cellules T $\gamma\delta$ *in vitro* qui avait pour objectif i) de caractériser les récepteurs à chimiokines exprimés par les clones T V δ 2^{neg} ii) d'identifier les chimiokines sécrétées par les cellules tumorales de la lignée d'adénocarcinome colique HT29 utilisées dans nos expériences iii) de tester la capacité des clones T V δ 2^{neg} à migrer vers des cellules HT29 *in vitro*.
- ◆ Enfin, nous avons voulu vérifier *in vivo*, si les clones T V δ 2^{neg} injectés à distance des cellules tumorales HT29 pouvaient migrer jusqu'à celles-ci et inhiber la croissance de tumeurs solides HT29 en s.c. Nous avons également testé l'implication d'un récepteur à chimiokines particulier identifié dans nos études *in vitro* (le CCR3) sur le phénomène de migration *in vivo*.

Les résultats de cette première partie de mon projet de thèse sont présentés et discutés dans l'article 1 (*Antitumor activity of $\gamma\delta$ t cells reactive against cytomegalovirus-infected cells in a mouse xenograft tumor model*). Dans la partie « Méthodologies » ci-après, nous nous proposons d'expliquer et justifier le choix du matériel et des techniques utilisées pour répondre aux questions des objectifs présentés précédemment.

2. Méthodologies

2.1. Lymphocytes T $\gamma\delta$ utilisés

Nous avons travaillé dans une première partie de projet avec un clone de lymphocytes T $\gamma\delta$ isolé à partir des cellules T V δ 2^{neg} augmentées en périphérie des patients transplantés infectés par le CMV. Notre intérêt s'est porté notamment sur un clone (nommé clone 4-29), exprimant les chaînes V δ 5 et V γ 4, représentant 21% des cellules T circulantes du patient duquel il était isolé (Lafarge, Pitard et al. 2005) et pouvant lyser *in vitro*, comme nous l'avons cité précédemment, des cellules infectées par le CMV et des cellules tumorales d'origine coliques. Dans l'étude faite au laboratoire, ce clone 4-29 s'était montré particulièrement cytotoxique contre les cellules HT29 mais pas contre des cellules épithéliales normales, lors d'une réponse indépendante du Fas Ligand ou du TNF α et dépendante des voies perforine/granzyme. De plus cette reconnaissance des HT29 par le clone 4-29 a été montré comme étant TCR dépendante et indépendante de la co-stimulation via NKG2D à l'aide de blocage avec des Ac anti-TCR ou anti-NKG2D (Halary, Pitard et al. 2005).

2.2. Utilisation de tests de migrations *in vitro* pour les lymphocytes TV δ 2^{neg}

Nous nous sommes intéressés de près aux caractéristiques migratoires des clones T V δ 2^{neg} 4-29 vers des cellules tumorales d'intérêts, les HT29. Nous avons pu tester la capacité de facteurs sécrétés par les cellules tumorales à être chimioattractants pour des lymphocytes T V δ 2^{neg} *in vitro*, notamment pour le clone 4-29, grâce à un système de chambre-double insert/puits ou système de *Transwell* (figure 19). Les capacités migratoires des lymphocytes T $\gamma\delta$ ont déjà été étudiées *in vitro* en utilisant le système de *Transwell* (Brandes, Willimann et al. 2003; Ferrero, Biswas et al. 2003) notamment pour tester l'effet de chimiokines particulières sur la mobilité des ces cellules (Roth, Diacovo et al. 1998).

L'implication de certains couples récepteurs à chimiokines/ chimiokines dans la mobilité de ces lymphocytes T peut être vérifiée lors des tests de migration *in vitro* par différentes méthodes. En effet, il est possible par exemple de saturer les récepteurs à chimiokines en pré-incubant les lymphocytes avec des chimiokines recombinantes (Gafa, Remoli et al. 2007) ou d'utiliser des petites molécules antagonistes des récepteurs, comme il a été fait récemment pour l'étude du CXCR3 (Heise, Pahuja et al. 2005; Mueller, Meiser et al. 2008). Il est également envisageable d'utiliser des Ac neutralisants dirigés contre les chimiokines dans du surnageant de culture cellulaire (Hara, Katakai et al. 2006) ou contre les récepteurs à chimiokines (Cockwell, Calderwood et al. 2002). Nous avons choisi de bloquer les récepteurs en surface de lymphocytes T V δ 2^{neg} à l'aide d'Ac dans nos tests *in vitro*.

Enfin, comme nous l'avons décrit précédemment, la migration faisant intervenir des récepteurs à chimiokines est dépendante des protéines Gi (Cotton and Claing 2009). Nous avons traité les cellules T $\gamma\delta$ avec de la PTX, qui avait déjà été utilisée dans d'autres études (Lasagni, Francalanci et al. 2003; Phan, Yang et al. 2003), afin d'inactiver les fonctions des protéines Gi et ainsi d'inhiber la migration spécifiquement due au système chimiokines/récepteurs à chimiokines.

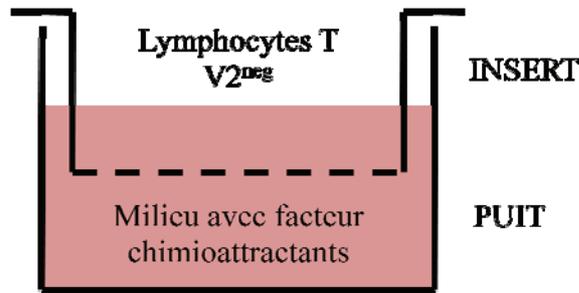


Figure 19 : Système de chambre double pour les tests de migration *in vitro*. On distingue un insert percé par des pores de $3\mu\text{m}$ placé au dessus d'un puits. Les lymphocytes T $V\delta 2^{\text{neg}}$ sont placés dans l'insert et peuvent passer dans le puits à travers les pores de manière active sous l'effet des facteurs chimioattractants.

2.3. Modèle murin pour l'étude *in vivo* de la réactivité anti-tumorale des lymphocytes $TV\delta 2^{\text{neg}}$

a. Les souris utilisées

Pour nos études *in vivo*, nous avons utilisé un modèle de souris immunodéficientes $RAG^{-/-}$ $\gamma(c)^{-/-}$, disponibles dans les animaleries de l'Université Bordeaux 2, dans lesquelles nous avons pu implanter des cellules humaines sans aucun rejet de greffe. Ces souris produites par l'équipe de Goldman JP (Goldman, Blundell et al. 1998) proviennent d'un croisement entre des souris dépourvues de la chaîne γ , commune aux récepteurs des interleukines IL2, IL4, IL7, IL9 et IL15 (Cao, Shores et al. 1995; DiSanto, Muller et al. 1995) et des souris dont le gène $RAG2$ (*recombinaison activating gene*), a été disrupté (Shinkai, Rathbun et al. 1992). Ces souris sont connues comme étant particulièrement immunodéficientes et tolèrent l'implant de cellules humaines (van Rijn, Simonetti et al. 2003). En effet, l'inactivation d'un gène RAG les prive complètement de lymphocytes T dérivant du thymus, ainsi que de lymphocytes B périphériques (Mombaerts, Iacomini et al. 1992). De plus, elles ont l'avantage d'être déficientes en cellules innées NK qui nécessitent pour leur développement la chaîne gamma (Lantz, Sharara et al. 1997) du récepteur à l'IL15 absente chez ces souris (DiSanto 1997).

b. Les expériences de xénogreffe tumorale en sous-cutané

Comme nous l'avons souligné, la lignée humaine d'adénocarcinome colique HT29 que nous avons utilisé est particulièrement sensible *in vitro* à la lyse par le clone $V\delta 5$ 4-29. Cette lignée HT29 a été largement exploitée pour le développement de modèles d'études du cancer colorectal humain dans de nombreux modèles murins, comme les souris SCID (Tanaka, Wu et al. 1994) ou *Nude* (Kline, Shanmugavelandy et al. 2009). Les souris $RAG^{-/-}$ / $\gamma(c)^{-/-}$ semblent avoir été très peu adoptées dans des modèles d'étude de cancer, mis à part pour quelques études de tumeurs murines (Apte, Baz et al. 2008) ou humaines (Odox, Fohrer et al. 2008; Raggi, Djafarzadeh et al. 2009).

Les travaux utilisant cette lignée HT29 proposent différents sites d'implantations pour l'étude de la réponse immunitaire vis-à-vis de tumeurs coliques. Par exemple, Murphy et al les ont implantées en i.p dans des souris SCID et ont démontré des prolongements de survies de souris traitées avec des PBL humains (Murphy, Conlon et al. 1993) (Murphy, Back et al. 1993). Cependant, le site d'implantation le plus fréquent pour les cellules HT29 à l'heure actuelle demeure sous la peau notamment chez des souris *Nude* (Kolinsky, Zhang et al. 2009;

Silberhumer, Zakian et al. 2009) et SCID (Gao, Saha et al. 2009). Les cellules HT29 ainsi injectées en sous cutané (s.c) dans des souris immunodéficientes forment des masses tumorales solides (figure 20) dont on peut suivre facilement la croissance par des mesures régulières. Nous avons donc choisi dans la première partie de mon projet d'implanter les cellules HT29 en s.c dans des souris $RAG^{-/-} / \gamma(c)^{-/-}$, dans lesquelles nous avons pu observer l'effet isolé des lymphocytes T $V\delta^{neg}$ humains sur la tumeur. En effet, nous n'avons pas utilisé des souris *Nude* ou SCID, dont la plupart des études d'implantations s.c de lignée tumorales humaines tirent profit, car les cellules NK murines (encore présentes dans ces souris) pouvaient potentiellement exercer une activité anti-tumorale (Sabzevari and Reisfeld 1993). Par la suite, nous avons pu facilement comparer les tailles de tumeurs s.c obtenues dans les animaux traités ou non avec les clones 4-29. Il est intéressant de noter que nous injectons en s.c un nombre de cellules (1.10^5) largement inférieur à la quantité de cellules généralement injectées en s.c dans la plupart des études publiées (environ 1.10^6 à 1.10^7 le plus souvent). En effet, l'agressivité de la lignée dont nous disposons au laboratoire nous permettait de l'injecter en petite quantité et de commencer à observer un développement en s.c dès le 7^{ème} jour post-implantation.

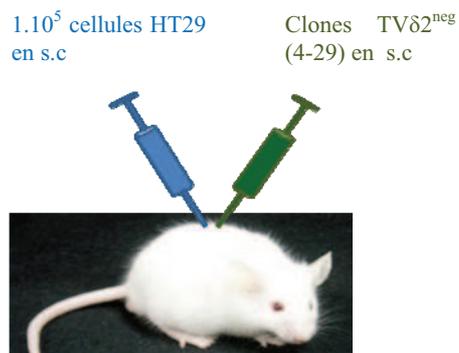


Figure 20 : Tumeur solide HT29 sur le flanc d'une souris $RAG^{-/-} / \gamma(c)^{-/-}$

Les traitements des souris implantées en s.c avec des cellules HT29 ont été effectués par des co-injections locales de clones 4-29 (figure 21a) comme l'avait fait par exemple Lozupone F et al qui ont montré que des co-injections s.c de clones T $CD8^+$ humains avec des cellules tumorales de mélanomes autologues pouvaient totalement inhiber la croissance tumorale dans des souris SCID (Lozupone, Rivoltini et al. 2003).

Par ailleurs, nous avons effectué un traitement systémique des animaux par des injections de clones 4-29 à distance du site tumoral s.c. La majorité des transferts adoptifs de lymphocytes humains dans le modèle murin sont effectués par voie intraveineuse (i.v). On peut citer par exemple cette étude où une lignée humaine de mélanome injectée en s.c dans des souris SCID est traitée par des injections de clones de lymphocytes T cytotoxiques humains en i.v (Stenholm, Kirkin et al. 1998) ou encore l'étude de Zheng BJ et al où des souris *Nude* inoculées en s.c avec des cellules de lignée de carcinome nasopharyngial sont traitées par une injection de lymphocytes T $\gamma\delta$ humains (Zheng, Chan et al. 2001). Nous avons plutôt choisi d'injecter les clones $TV\delta^{neg}$ à distance du site tumoral en i.p (figure 21b) par facilité de manipulation et surtout car nous savions que des lymphocytes T injectés en i.p pouvaient atteindre la peau de souris immunodéficientes. Nous nous sommes référés à l'étude de Taub DD et al qui avaient montré que des PBL (*peripheral blood lymphocytes*), inoculés en i.p, peuvent migrer jusqu'à un site s.c injecté avec la chimiokine IP10 dans des souris SCID (Taub, Longo et al. 1996). De même, Rosenblatt-Velin N et son équipe ont montré que des lymphocytes humains allogéniques injectés en i.p dans des souris SCID pouvaient atteindre des greffons de peau humaines injectés en s.c (Rosenblatt-Velin, Arrighi et al. 1997).

a



b

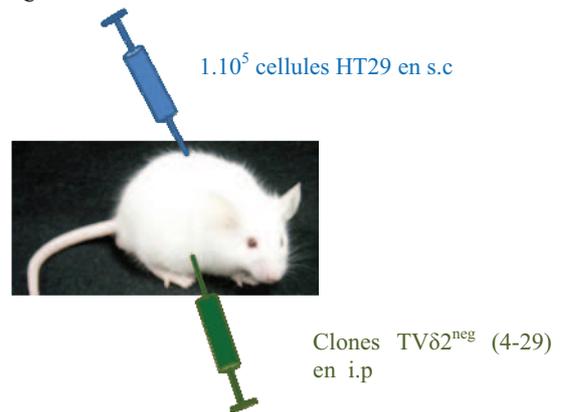


Figure 21 : Implantation de cellules dans le modèle murin $RAG^{-/-} / \gamma (c)^{-/-}$ dans la 1^{ère} partie de mon projet de thèse.

Article 1:

*Anti-tumor activity of $\gamma\delta$ T cells reactive against
cytomegalovirus-infected cells in a mouse xenograft tumor
model*

*Christel Devaud, Benoît Rousseau, Sonia Netzer, Vincent
Pitard, Pierre Costet, Jean-François Moreau, Franck Couissaud,
Julie Dechanet-Merville, and Myriam Capone*

Antitumor Activity of $\gamma\delta$ T Cells Reactive against Cytomegalovirus-Infected Cells in a Mouse Xenograft Tumor Model

Christel Devaud,^{1,2} Eric Bilhere,^{1,2} Séverine Loizon,^{1,2} Vincent Pitard,^{1,2} Charlotte Behr,^{1,2} Jean-François Moreau,^{1,2,3} Julie Dechanet-Merville,^{1,2} and Myriam Capone^{1,2}

¹Université Bordeaux 2 and ²Centre National de la Recherche Scientifique UMR 5164, and ³Laboratoire d'Immunologie et d'Immunogénétique, CHU Bordeaux, Bordeaux, France

Abstract

$\gamma\delta$ T cells recognize stress-induced autoantigens and contribute to immunity against infections and cancer. Our previous study revealed that V δ 2-negative (^{neg}) $\gamma\delta$ T lymphocytes isolated from transplant recipients infected by cytomegalovirus (CMV) killed both CMV-infected cells and HT29 colon cancer cells *in vitro*. To investigate the antitumor effects of V δ 2^{neg} clones *in vivo*, we generated hypodermal HT29 tumors in immunodeficient mice. Concomitant injections of V δ 2^{neg} clones, in contrast to V δ 2⁺ cells, prevented the development of HT29 tumors. V δ 2^{neg} clones expressed chemokine C-C motif receptor 3 (CCR3) and migrated *in vitro* in response to chemokines secreted by HT29 cells, among which were the CCR3 ligands macrophage inflammatory protein-1 δ and monocyte chemoattractant protein-4. More importantly, a systemic *i.p.* treatment with V δ 2^{neg} clones delayed the growth of HT29 s.c. tumors. The effect of *in vivo* $\gamma\delta$ T-cell passive immunotherapy on tumor growth could be reverted by addition of a blocking anti-CCR3 antibody. $\gamma\delta$ T-cell passive immunotherapy was dependent on the cytotoxic activity of the $\gamma\delta$ effectors toward their targets because V δ 2^{neg} clones were not able to inhibit the growth of A431 hypodermal tumors. Our findings suggest that CMV-specific V δ 2^{neg} cells could target *in vivo* cancer cells, making them an attractive candidate for antitumor immunotherapy. [Cancer Res 2009;69(9):3971–8]

Introduction

The crucial role of T lymphocytes bearing T-cell receptor (TCR) γ and δ chains (i.e., $\gamma\delta$ T cells) in protection of the host against viral infections and tumors is increasingly being recognized. $\gamma\delta$ T cells account for 1% to 5% of CD3⁺ peripheral T lymphocytes but constitute a substantial fraction (>30%) of T cells in intestinal epithelia. In humans, most of the peripheral blood $\gamma\delta$ T cells express V δ 2/V γ 9 TCRs. In contrast, intraepithelial $\gamma\delta$ T cells use V δ 2^{neg} segments that can associate with various V γ elements. V δ 2V γ 9 T cells recognize phosphoantigens that were characterized recently (1). The antigen specificity of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells was less explored, although it was shown that V δ 1⁺ intraepithelial lymphocytes recognize the stress-inducible major histocompatibility complex class I-related proteins A and B (MICA and MICB) on epithelial cells (2). $\gamma\delta$ T cells do not require major histocompat-

ibility complex-presenting molecules in the antigen recognition process, making them complementary immune candidates for new protocols of immunotherapy (3, 4).

The concept for a protective role of $\gamma\delta$ T lymphocytes against cancer was highlighted in TCR $\delta^{-/-}$ mice that displayed an increased susceptibility to cutaneous malignancy (5). In a separate study, chimeric mice in which $\gamma\delta$ T cells could not produce IFN γ had a higher tumor incidence after skin exposure to methylcholanthrene (6).

In humans, the potential contribution of $\gamma\delta$ T cells to antitumor immune responses was investigated through the analysis of tumor infiltrating lymphocytes. Antitumor $\gamma\delta$ tumor infiltrating lymphocytes from epithelial tumors can belong to the resident V δ 1 population (7–10) but also to the V δ 2V γ 9 subset (11, 12). Activated $\gamma\delta$ T cells isolated from peripheral blood mononuclear cells of healthy donors display a potent cytotoxic activity toward different cancer cells *in vitro* (13). In agreement with their potential role in tumor host defense *in vivo*, $\gamma\delta$ T cells have been found with an increased frequency in peripheral blood mononuclear cells from disease-free survivors of leukemia after allogeneic bone marrow transplantation (14, 15). It was also reported that the reactivity of peripheral $\gamma\delta$ T cells against nasopharyngeal carcinoma was impaired in cancer patients, whereas the deficit was restored among survivors after successful treatment (16).

Immune-suppressed transplant recipients are at high-risk for cancer development (17, 18). At the same time, these individuals have weaker defenses against infectious agents such as cytomegalovirus (CMV). A few years ago, we showed an increase of peripheral blood $\gamma\delta$ T lymphocytes in allograft recipients infected by CMV (19). A protective anti-CMV role for $\gamma\delta$ T cells was suggested by the concomitant resolution of viral infection (20). Among the increased $\gamma\delta$ T cells, V δ 1⁺, V δ 3⁺, and V δ 5⁺ cells were predominantly found, conversely to V δ 2V γ 9 cells (21). Interestingly, V δ 2^{neg} lines and clones specifically killed CMV-infected fibroblasts as well as epithelial tumor cells. In particular, anti-CMV V δ 2^{neg} clones 4-13 and 4-29 showed a perforin-dependent cytotoxic activity against colon cancer cells (Caco2 and HT29) in contrast to normal epithelial cells. When cocultured with HT29 and Caco2, anti-CMV V δ 2^{neg} clones produced tumor necrosis factor α and IFN γ . Cancer cell killing and cytokine release by V δ 2^{neg} clones involved TCR engagement that was independent of major histocompatibility complex molecules recognition (22).

The present study was undertaken to evaluate the *in vivo* antitumor reactivity of anti-CMV V δ 2^{neg} clones, including their ability to inhibit tumor growth as well as their migratory potential toward cancer cells. To this aim, we used immunodeficient Rag^{-/-} γ c^{-/-} mice and xenografted HT29 cells under the skin. First, we show that local treatment with V δ 2^{neg} clones is able to arrest tumor growth. Next, we show a C-C motif receptor 3 (CCR3)-dependent migration of 4-29 clones *in vitro* and identify MIP-1 δ

Requests for reprints: Myriam Capone, UMR-Centre National de la Recherche Scientifique 5164, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France. Phone: 33-05-57-57-14-71; Fax: 33-05-57-57-14-72; E-mail: myriam.capone@u-bordeaux2.fr.

©2009 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3037

and monocyte chemoattractant protein-4 as putative ligands involved in this process. Finally, 4-29 clones injected at distance from the tumor site were able to delay HT29 tumor growth and addition of a blocking anti-CCR3 antibody revert this effect. These findings establish a pivotal role for $\gamma\delta$ T cells at the boundaries between anticancer and anti-infectious situations, and help to understand the *in vivo* antitumor reactivity of $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells, which can be of significant relevance for transplant recipients who are more susceptible to develop malignancies than normal individuals.

Materials and Methods

Animals and human cells. $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}$ mice were a gift from Dr. James Di Santo (INSERM U 668, Institut Pasteur, Paris, France; ref. 23). They were used at age 7 to 10 wk, housed in an appropriate animal facility (Université de Bordeaux 2), and kept under pathogen-free conditions.

The colon carcinoma (HT29) and skin carcinoma (A431) cell lines were from the American Type Culture Collection. They were cultured in DMEM (Life Technologies) supplemented with 8% heat-inactivated fetal bovine serum (PAA Laboratories GmbH). $V\delta 2^{neg}$ clones 4-29 and 4-13 expressed the same $V\gamma 9V\delta 5$ TCR (22). The $V\delta 2$ cell line was established from a healthy donor in our laboratory. Human $\gamma\delta$ T cells were expanded with phytohemagglutinin and irradiated allogeneic peripheral blood mononuclear cell as described previously (22). $\gamma\delta$ T cells were cultured 2 to 3 wk before

use in RPMI 1640 (Life Technologies), 10% human serum, and 1,000 IU/mL recombinant human interleukin-2 (rhIL2; Chiron) at 37°C in 5% CO₂. They were tested negative for *Mycoplasma* contamination.

Flow cytometry. $\gamma\delta$ cells were incubated with the following monoclonal antibodies (mAb) against human chemokine receptors: phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CXCR1 (clone 5A12), PE anti-CXCR4 (clone 12G5), PE anti-CCR5 (clone 2D7), PE anti-CXCR3 (clone 1C6), or PE anti-CCR6 (clone 11A9; BD Biosciences), or PE anti-CXCR2 (clone 242216), PE anti-CCR2 (clone 48616), or PE anti-CCR7 (clone 150703; Beckman Coulter). Additional staining was performed by incubation with anti-CCR1 (clone 53504), anti-CCR3 (clone 61828), or anti-CCR9 (clone 112509), anti-MICA (clone 159227), anti-MICB (clone 236511), anti-ULBP1 (clone 170818), anti-ULBP2 (clone 165903), anti-ULBP3 (clone 166510; R&D Systems), anti-HLA-ABC (clone W6/32; Dako) followed by incubation with PE or FITC anti-mouse IgG (Beckman Coulter). Appropriate isotype-matched control mAbs were included and the samples were analyzed on a FACSCalibur or a FACSCanto apparatus (BD Biosciences).

Cellular cytotoxicity assay. The cytolytic potential of $V\delta 2^{neg}$ and $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T cells was measured by using the flow cytometry-based CD107a assay (24). Six-hour cocultures of 5×10^4 $\gamma\delta$ T cells and 5×10^4 HT29 were carried out in the presence of PE anti-CD107a mAb (clone H4A3; BD Biosciences). After 1 h of coculture, brefeldin A was added. Cells were harvested, stained with PC5 anti-TCR pan- $\gamma\delta$ (clone IMMU 510; Beckman Coulter), and analyzed by flow cytometry.

Detection of chemokines from tumor lysates and culture supernatants. HT29 cells (1×10^5) were injected s.c. into the right flank of a

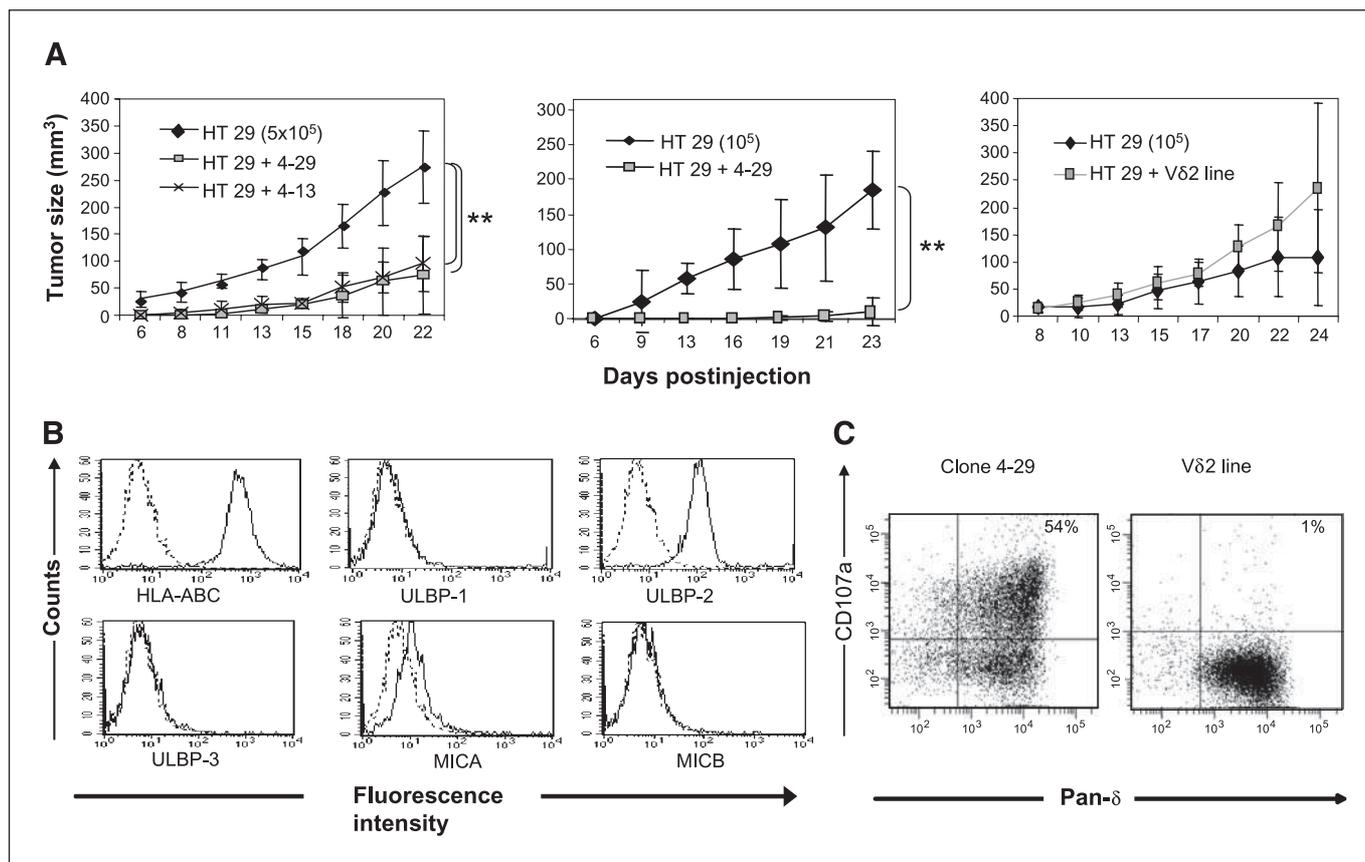


Figure 1. Local antitumor effects of anti-CMV $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells *in vivo*. (A, left) Tumor growth in 4 to 10 mice receiving s.c. injections of 5×10^5 HT29 cells in the absence (HT29) or presence of 2×10^6 4-29 (HT29 + 4-29) or 4-13 (HT29 + 4-13) $V\delta 2^{neg}$ T lymphocytes. (A, middle and right) Tumor growth in 4 to 6 mice receiving s.c. injections of 1×10^5 HT29 cells in the absence or presence of 2×10^6 4-29 T cells (middle) or $V\delta 2^+$ T cells (right). Tumor volumes are expressed in cubic millimeters; points, mean; bars, SD. **, $P < 0.003$. B, HT29 cell surface expression of HLA A, B, and C, ULBP-1, ULBP-2, ULBP-3, MICA, and MICB (bold lines) measured by flow cytometry compared with control isotypic antibody (dotted lines). C, cytolytic activity of 4-29 T cells (left) and $V\delta 2^+$ T-cells (right) measured using the CD107a flow cytometry assay. Data are representative of experiments repeated twice to thrice.

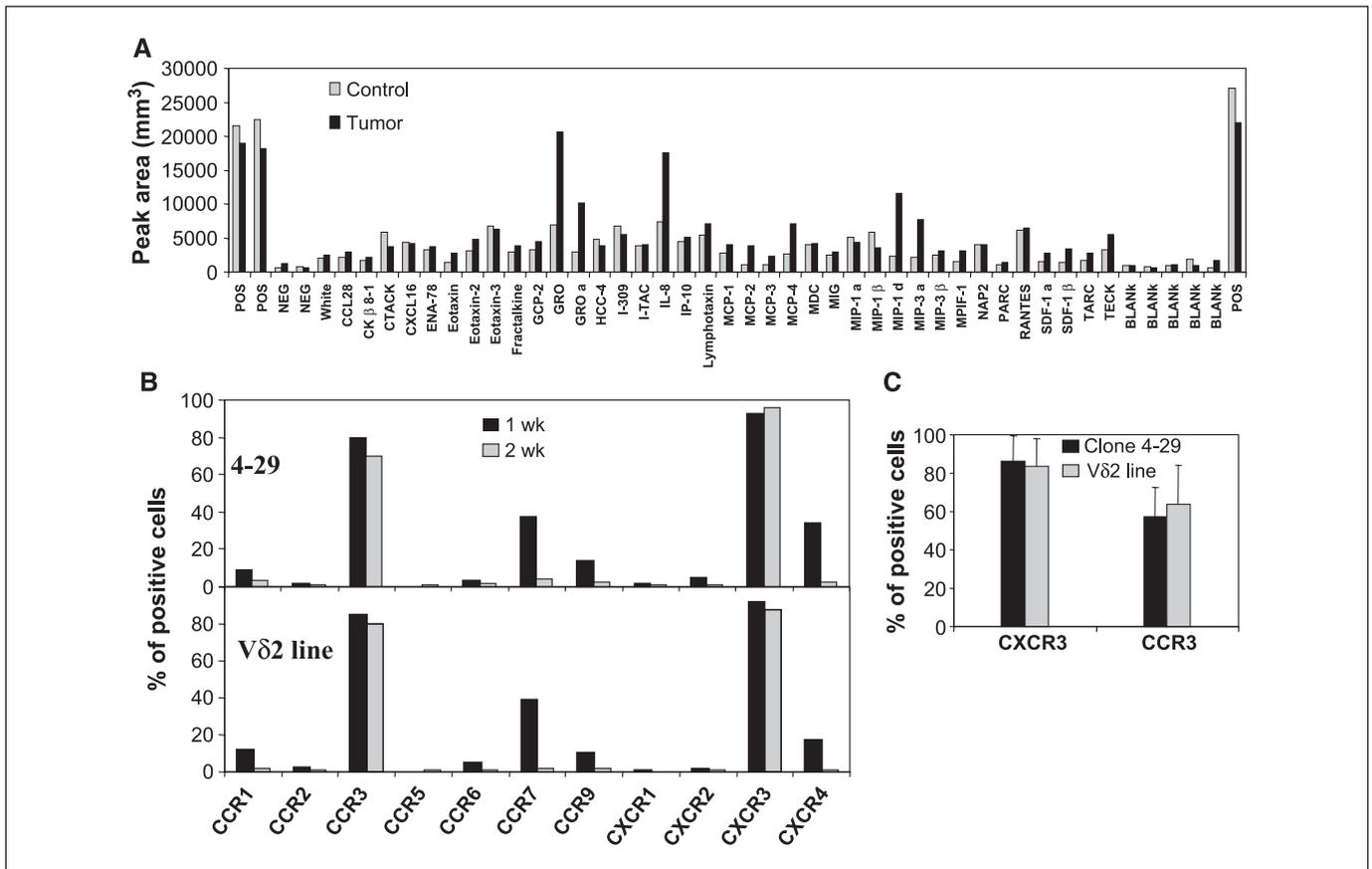


Figure 2. Chemokines secreted by HT29 solid tumors and chemokine receptors expressed on anti-CMV Vδ2^{neg} γδ T cells. **A**, chemokine microarrays were incubated with HT29 solid tumor (*tumor*) or healthy skin (*control*) extracts excised from mice. The spots on the membranes were scanned and the peak areas (*histograms*) obtained for each chemokine are shown. Experiments were repeated twice. **B** and **C**, expression of chemokine receptors on Vδ2^{neg} and Vδ2⁺ T cells were analyzed as described in Materials and Methods. **B**, one example of chemokine receptor expression at 1 (*black bars*) and 2 wk (*gray bars*) poststimulation of 4-29 T cells (*top*) and Vδ2⁺ T cells (*bottom*). The kinetic was carried out twice. **C**, cells were stained with anti-CXCR3-PE or anti-CCR3-PE antibodies. *Columns*, mean percentages of positive cells obtained from 5 to 12 different analyses performed 1 to 3 wk postactivation; *bars*, SM.

mouse. After 5 wk, the solid tumor was excised and minced in 1 × lysis buffer (RayBiotech). Protein levels were quantified using BCA Protein Assay kit (Pierce). HT29 supernatants were isolated after 1 wk of culture in DMEM supplemented with 8% fetal bovine serum. Detection of chemokines was performed using the RayBio Human Chemokine Antibody Array 1 (RayBiotech) according to the manufacturer’s instructions. Images were processed with ImageJ 1.39a software (NIH). Briefly, each point on the dot plot is a grayscale (8 bit) image (0–255, where 0 is black, 255 is white). Background gray levels were subtracted, and a box was drawn onto the first lane and used as a frame for the other lanes to obtain densitometric data from equal areas. The area of the peak (“peak area”) was outlined and calculated.

In vitro chemotactic assay. The chemotactic potential of 4-29 clones and Vδ2⁺ γδ T cells was assayed using a double-chamber system (BD Falcon). γδ Cells (5 × 10⁵) in their culture medium (RPMI, 10% human serum, 1,000 U/mL rhIL2) were added to the upper inserts (3-μm pore size) of a 24-well transwell plate. HT29 or A431 supernatants were isolated after 1 wk of culture and added into the lower well. To test MIP-1δ–dependent migration, the lower wells were filled with DMEM 8% fetal bovine serum containing MIP-1δ (R&D Systems) at different concentrations. Where indicated, 4-29 clones were preincubated at 37°C for 90 min or overnight, in RPMI 1% FCS supplemented with 1,000 IU/mL rhIL2, in the absence or presence of pertussis toxin (SigmaAldrich) at 500 ng/mL. For blocking experiments, 4-29 clones were preincubated with either anti-CCR3 mAb (10 μg/mL) or isotype-matched control (IgG_{2a}) mAb (10 μg/mL, clone 20102; R&D Systems). Migration was allowed to proceed for 6 h at 37°C. Cells that migrated into the lower wells were counted microscopically. All assays were performed in triplicate.

Transplantation and growth of human tumors in mice. Mice received 100 μL of different inocula of HT29 cells s.c. into the right flank. Local s.c. injections of γδ cells were performed by the simultaneous inoculation of 100 μL of culture medium (RPMI, 10% human serum, and 1,000 IU/mL rhIL2) containing 4-29 Vδ2^{neg} cells or Vδ2⁺ cells. When a systemic treatment was applied, mice received HT29 cells s.c., and 4 i.p. injections of 4-29 T cells or Vδ2⁺ cells in 100 μL of culture medium at day 0, 2, 4, and 7. When mice received increased amounts of rhIL2, they were given daily from day 0 to day 7, 5,000 IU of rhIL2 i.p. alone, or in combination with 4-29 T cells that were injected at day 0, 2, 4, and 7. For blocking migration experiments, mice received 4 injections of 4-29 T cells in 100 μL of culture medium containing 100 μg/mL of anti-CCR3 or control IgG_{2a} mAb (R&D Systems). In experiments where i.p. γδ T-cell injections were delayed, mice received 4 injections of 4-29 T cells at day 7, 9, 11, and 14. In other control experiments, mice were inoculated with A431 epithelial tumor cells and given 4 injections of 4-29 T cells i.p. at day 0, 2, 4, and 7. Tumor growth was monitored by measuring the maximal and minimal diameters with a caliper thrice a week. Tumor volume was estimated using the formula: tumor volume (mm³) = [length (mm) × width² (mm)]/2.

Histologic analysis. HT29 solid tumors excised from mice were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Serial tissue sections (4-μm thick) were mounted on glass slides and dried at 56°C before dewaxing in xylene and rehydration in alcohols. Sections were stained with hematoxylin eosin saffranin according to standard histologic procedures. Photographs were taken with the Coolscope (Nikon) with a ×2 objective.

Statistical analysis. Data were analyzed with STAT Xact-8 with Cytel Studio (Cytel Statistical Software). For *in vivo* studies, we applied a

nonparametric permutation exact test described in detail in Siegel S. and Castellan NJ., 1988, *Nonparametric statistics for the behavioral sciences* (second edition McGraw-Hill, New York). This test is adapted for a finite data sample (<30 mice per group). For *in vitro* studies, we applied the Kruskal-Wallis test. For all experiments, a *P* value of <0.05 was considered significant.

Results

Concomitant s.c. inoculation of anti-CMV Vδ2^{neg} γδ T cells and HT29 colon carcinoma cells delays the development of hypodermal HT29 tumors. To test the antitumor activity of anti-CMV Vδ2^{neg} γδ T cells *in vivo*, γδ T-cell clone 4-29 was inoculated s.c. concomitantly with HT29 cells. As shown in Fig. 1A (left), a focal coinjection of both tumor and 2 × 10⁶ 4-29 T cells significantly (*P* = 0.002) delayed the appearance of the solid tumors that developed from 5 × 10⁵ HT29 cells (effector/target ratio of 4:1). Similar results were obtained with clone 4-13 (*P* = 0.003; Fig. 1A, left). The consequence of local treatment with 2 × 10⁶ 4-29 T cells was proportional to the effector/target ratio, and no detectable tumors were found after 3 weeks when mice received 10⁵ HT29 cells (*P* = 0.002; effector/target ratio of 20:1; Fig. 1A, middle). Tumor growth was not significantly affected (*P* > 0.5) by local coinjection of a Vδ2⁺ T cell line (Fig. 1A, right). Respectively, 92% and 75% of Vδ2^{neg} and Vδ2⁺ γδ T cells expressed NKG2D (data not shown), whose binding to specific ligands could be involved in cancer cells killing (25). NKG2D ligands, ULBP-2, and to a lesser extent, MICA, were found expressed on HT29 cells (Fig. 1B). However, in contrast to Vδ2^{neg} T cells, Vδ2⁺ T cells did not show any cytotoxic activity against HT29 cells, as measured by the induced membrane expression of CD107a only on 4-29 T cells (Fig. 1C). These results

suggest that, as we have previously observed *in vitro* (22), anti-CMV γδ Vδ2^{neg} T cells display TCR-dependent cytotoxic activity toward HT29 cells *in situ*, leading to the consequent inhibition of HT29 tumor growth.

HT29 tumors produce high amounts of inflammatory chemokines. To investigate whether HT29 cells were able to attract γδ T lymphocytes, we determined the pattern of chemokines produced by HT29 solid tumors isolated from Rag^{-/-}γc^{-/-} mice. Figure 2A shows the results of a representative experiment. Groα (as well as other Gro family members) and IL-8 were the most abundantly expressed of the 38 chemokines analyzed, as was the case for the *in vitro* cultured counterpart (data not shown; Fig. 2A). MIP-3α, monocyte chemoattractant protein-4, and MIP-1δ were also easily detected, whereas other chemokines were found in much lower proportions (Fig. 2A). Thus, HT29 cells are able to produce inflammatory chemokines, and this production is only slightly affected by the mouse environment.

Preferential expression of CXCR3 and CCR3 by anti-CMV Vδ2^{neg} clones. We then examined which chemokine receptors were expressed by the Vδ2^{neg} 4-29 clone after 2 weeks of *in vitro* activation and culture (at which time they were used for *in vivo* experiments). Figure 2B depicts the results of one kinetic study conducted concomitantly on Vδ2^{neg} and Vδ2⁺ T cells. At each time point, <10% of γδ (Vδ2^{neg} and Vδ2⁺) T cells expressed CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1, and CXCR2 (Fig. 2B). At 1 week postactivation, CCR7 was found on 37% of 4-29 cells and 39% of Vδ2⁺ cells, CXCR4 was found on 34% of 4-29 cells and 18% of Vδ2⁺ cells, and CCR9 was expressed by 14% of 4-29 cells and 11% of Vδ2⁺ cells. At 2 weeks postactivation, however, CCR7, CXCR4, and CCR9 were found on <15% of Vδ2^{neg} and Vδ2⁺ cells (Fig. 2B). On the other hand, CXCR3

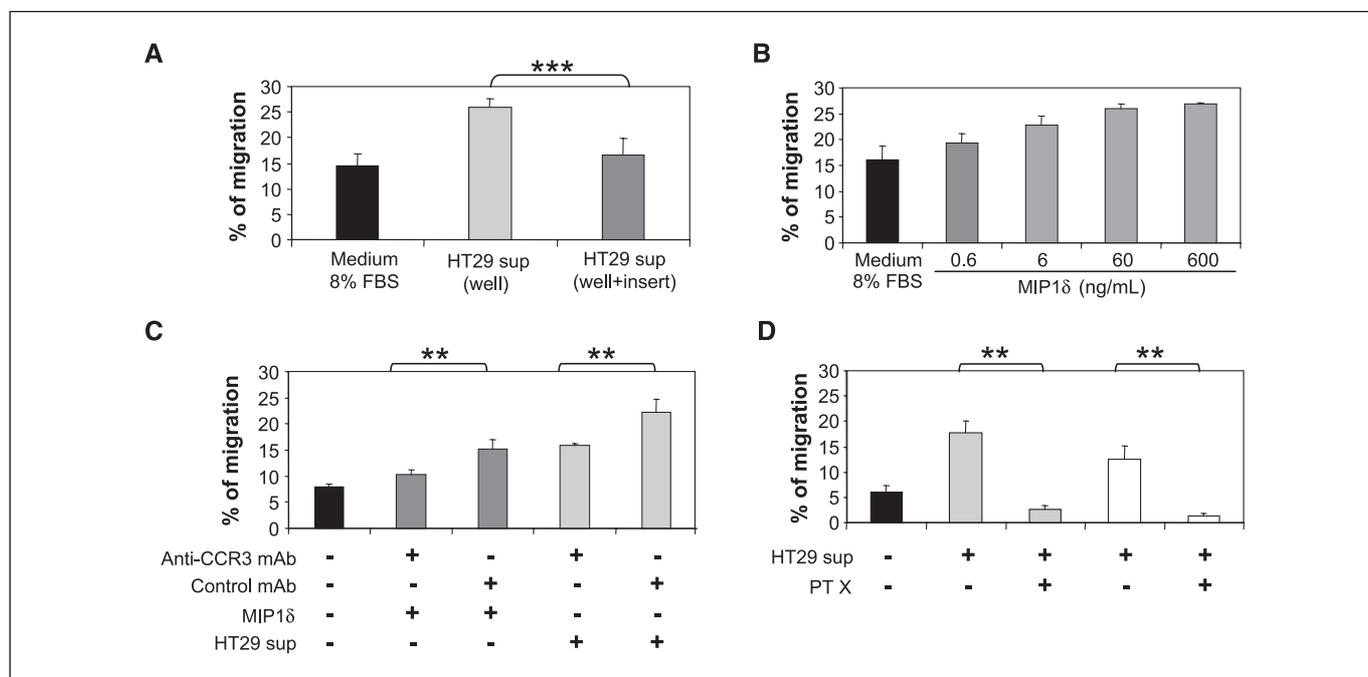


Figure 3. Migration potential of anti-CMV Vδ2^{neg} γδ T cells. Columns, percentages of cells that have migrated from the upper well (*n* = 3 wells) from one representative experiment of three; bars, SD. A, 4-29 T cells were assayed for their chemotactic response to HT29 supernatant (Materials and Methods). Background migration was measured with medium containing 8% fetal bovine serum in the lower well, whereas HT29 supernatant placed in the lower and upper wells (*well+insert*) reflected chemokinesis. B, MIP-1δ dose-dependent migration of 4-29 T cells. C, 4-29 T cells were preincubated with anti-CCR3 or isotype control mAb as described in Materials and Methods, and placed in the upper well. MIP-1δ (60 ng/mL) or HT29 supernatant (*HT29 sup*) was added (+) or not (-) into the lower well. D, 4-29 T cells were preincubated or not with pertussis toxin (*PTX*) overnight (*gray bars*) or for 90 min (*open bars*). **, *P* < 0.005; ***, *P* < 0.0005.

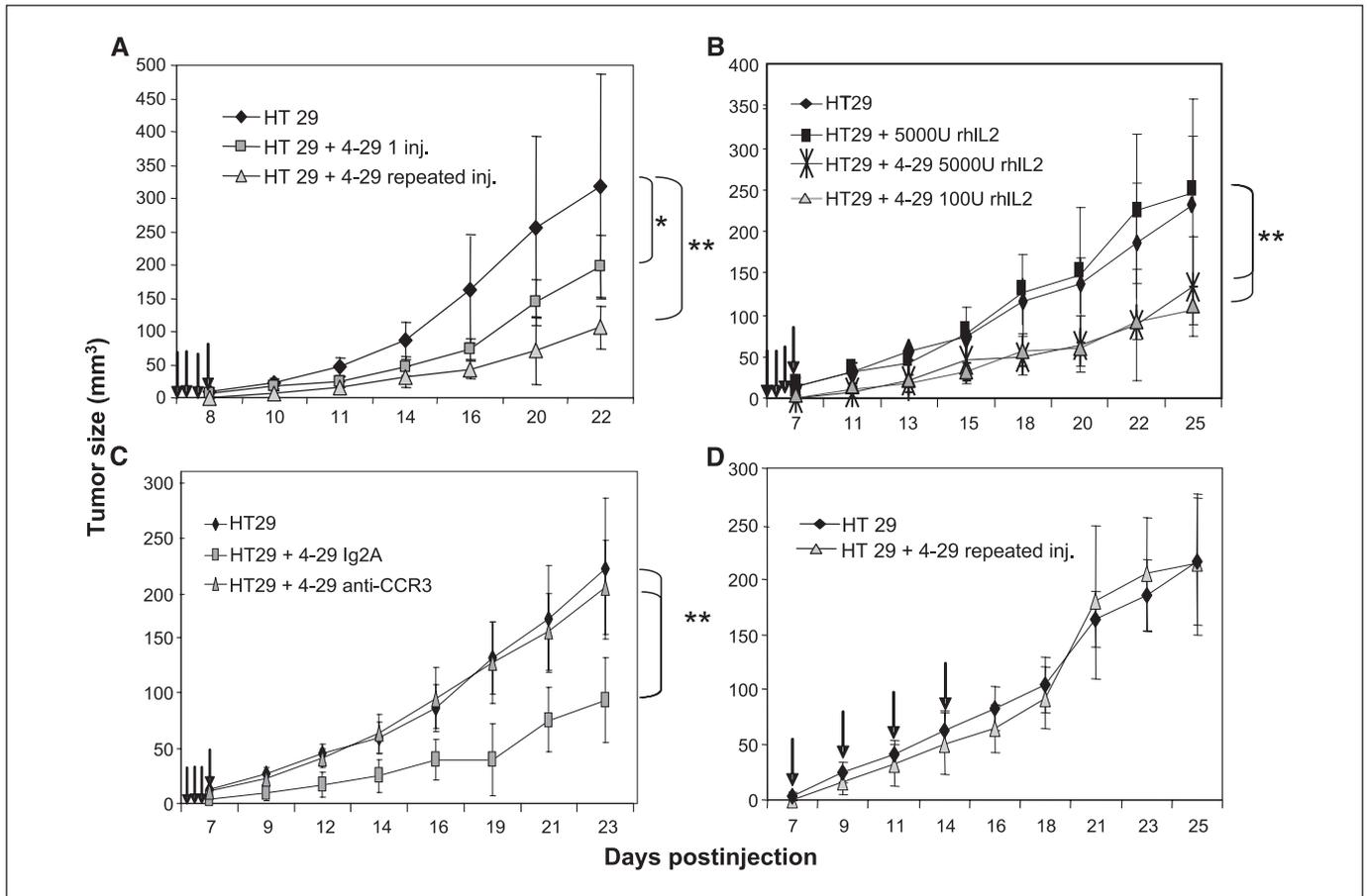


Figure 4. Repeated i.p. injections of anti-CMV $V\delta^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells delay the development of HT29 tumors. Tumor growth in mice receiving s.c. injections of 1×10^5 HT29 cells in the absence or presence of single (at day 0; 1 inj.) or repeated (repeated inj.) i.p. injections of 2×10^6 4-29 T cells. Arrows, the 4-29 T cells were given 4 times every 2 d from day 0 to day 7 (A, B, and C), or day 7 to day 14 (D). B, when indicated, mice were given daily from day 0 to day 7, 5,000 IU of rhIL2 i.p. alone (HT29 + 5,000 IU rhIL2) or in combination with 2×10^6 4-29 cells (HT29 + 4-29 5,000 IU rhIL2) that were injected at day 0, 2, 4, and 7. C, mice receiving 4 repeated i.p. injections of 2×10^6 4-29 T cells preincubated with anti-CCR3 or control IgG2_a mAbs. Experiments were done twice; points, mean tumor size of 7 to 10 mice (bars, SD; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.003$).

and CCR3 were found on a large fraction of 4-29 and $V\delta^+$ cells whenever the analysis was performed (1–3 weeks poststimulation; Fig. 2B and C). Thus, after *in vitro* expansion, anti-CMV $V\delta^{neg}$ and $V\delta^+$ T cells express a comparable pattern of chemokine receptors among which CCR3, and are therefore potentially able to respond to monocyte chemoattractant protein-4 and macrophage inflammatory protein (MIP)-1 δ , two CCR3-ligands produced by HT29 cells.

The chemokines secreted by HT29 cells induce *in vitro* migration of anti-CMV $V\delta^{neg}$ clones. To discover whether the chemokines secreted by HT29 cells were able to attract anti-CMV $V\delta^{neg}$ clones, we used a transwell assay. We found that HT29 culture supernatant significantly induced the motility of $\sim 10\%$ of 4-29 T cells ($P = 0.0001$; Fig. 3A). This effect was not simply due to chemokinesis because it was not observed when HT29 supernatant was added to both the upper and lower wells. Exogenous MIP-1 δ triggered a dose-dependent migration of 4-29 cells (Fig. 3B). A blocking anti-CCR3 mAb abrogated MIP-1 δ -dependent migration of $V\delta^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells ($P = 0.004$) and partially inhibited HT29 supernatant-mediated migration when compared with an isotype control mAb ($P = 0.008$; Fig. 3C). For this reason, we then tested the effect of the addition of pertussis toxin to the assay on HT29

supernatant-induced migration, which is intended to block the chemokine-mediated migration nonspecifically. As shown in Fig. 3D, HT29 supernatant-dependent migration was abrogated by pertussis toxin ($P = 0.004$). In conclusion, anti-CMV $V\delta^{neg}$ clones are able to migrate in response to a set of chemokines secreted by HT29 cells, among which CCR3-binding ligands may play a major role.

Distant and repeated injections of anti-CMV $V\delta^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells significantly delay the development of HT29 hypodermal tumors. Because anti-CMV $V\delta^{neg}$ cells migrated *in vitro* in response to chemokines secreted by HT29 cells, we tested whether distant (i.p.) injections of 4-29 clones could influence the growth of HT29 hypodermal tumors. As shown in Fig. 4A, a single i.p. injection of 2.10^6 4-29 T cells had a small but significant ($P = 0.045$) consequence on tumor growth. Notably, repeated i.p. injections of 4-29 T cells every other day for 1 week significantly ($P = 0.003$) improved the efficiency of the systemic immunotherapy. In treated mice, the appearance of the tumors was delayed, and the tumors were smaller throughout the experiment. The difference in tumor size between control and treated mice was obvious on hematoxylin eosin safranin-stained tumor sections (Fig. 5); $\gamma\delta$ -treated mice showed small and disorganized tumors 4 hours after the last inoculation of $\gamma\delta$

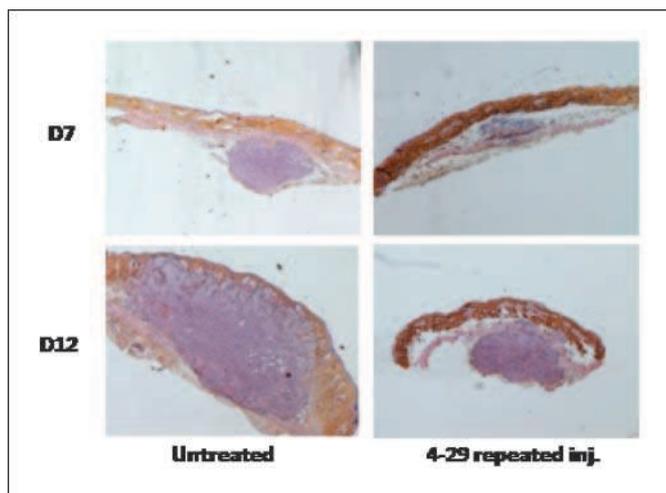


Figure 5. Mice treated with $V\delta 2^{neg}$ 4-29 T-cells show small and disorganized tumors. Histologic examination of HT29 tumors from untreated mice or mice treated as described in Fig. 4A, by repeated injections of 4-29 T-cells. Tumors were excised at day 7 (4 h after the last injection) or day 12 postinoculation of HT29 cells.

cells (Fig. 5, top). Supplementation with higher doses of rhIL2 did not enhance the antitumor activity of 4-29 clones (Fig. 4B). Preincubation of 4-29 clones with blocking anti-CCR3 mAb abrogated their inhibitory effect on tumor growth ($P < 0.003$; Fig. 4C). Figure 4D shows

the results obtained with one group of mice given 4 i.p. injections of 2×10^6 4-29 T cells every 2 days, beginning when the tumor mass was measurable. Infusion of $\gamma\delta$ T cells did not have any effect on subsequent tumor growth, which was similar to that of control mice. Thus, in our xenograft tumor model, anti-CMV $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ cells could influence tumor growth by efficiently limiting the initial tumor cell load.

The inhibitory effect of systemic $\gamma\delta$ T-cell infusion on tumor growth correlates with the cytotoxic potential of anti-CMV $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells. To test whether the inhibitory effect on HT29 tumor growth was specific to anti-CMV $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ cells, similar experiments were performed with $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T lymphocytes. As observed in Fig. 6A, repeated i.p. injections of $V\delta 2^+$ cells did not affect the growth of HT29 hypodermal tumors. This might be due to their inability to migrate toward the tumor cells, although *in vitro* expanded $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T cells also expressed CCR3 (Fig. 2C). To test whether HT29 culture supernatant could induce the migration of $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ cells, we used the *in vitro* transwell assay. Approximately 4% of $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ cells were able to migrate in response to chemokines secreted by HT29 cells (Fig. 6B).

We next wondered whether i.p. injection of anti-CMV $V\delta 2^{neg}$ clones could be cytostatic on cancer cells without being cytotoxic against them. We used A431 skin cancer cells against which 4-29 T cells did not display any significant cytotoxic activity (data not shown). As depicted in Fig. 6C, 4-29 clones were not able to inhibit the growth of A431 hypodermal tumors. However, such as HT29

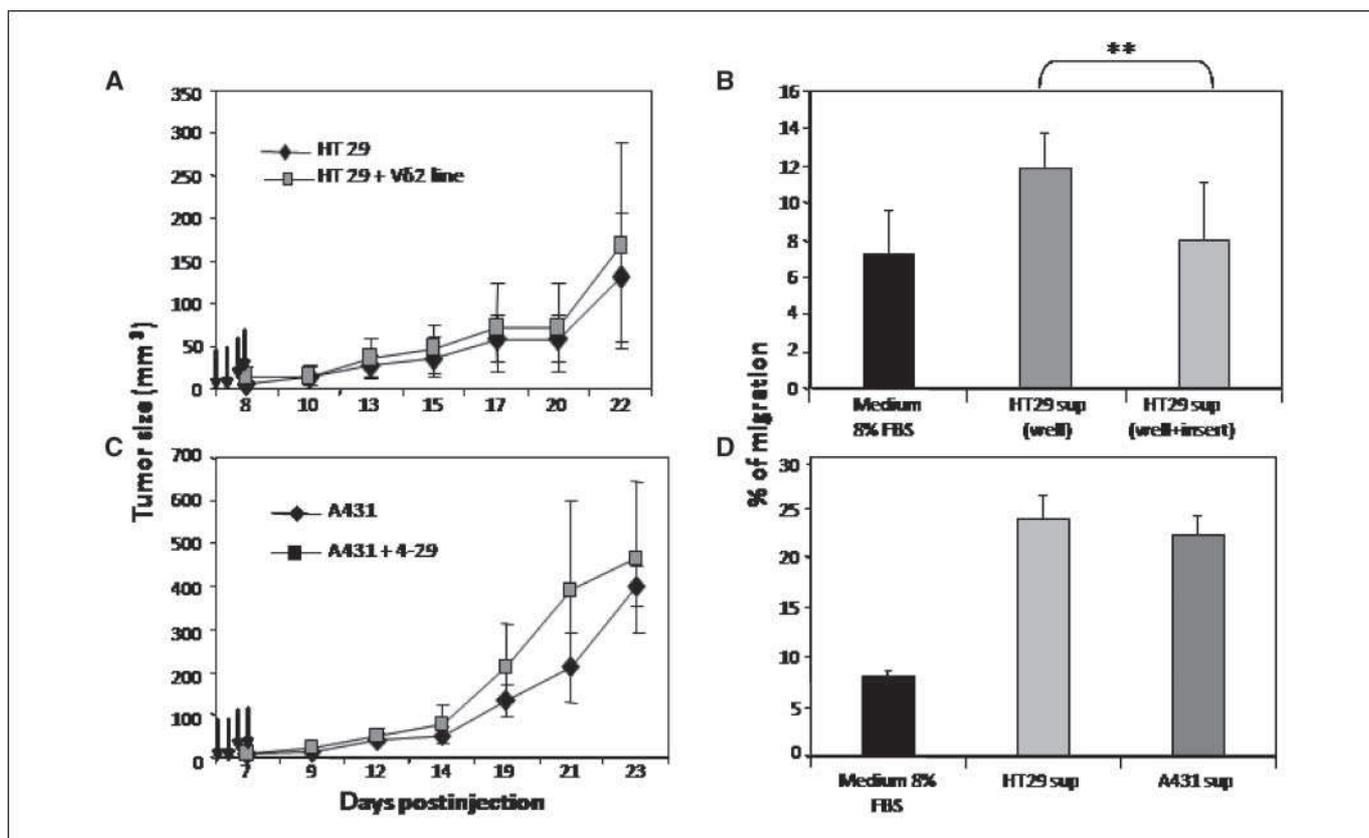


Figure 6. The inhibitory effects of $\gamma\delta$ T-cell treatment on tumor growth correlates with the cytotoxic potential of anti-CMV $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells. **A**, HT29 cells (1×10^5) were inoculated s.c. in mice in the absence or presence of repeated i.p. injections of $V\delta 2^+$ T cells. **B**, migration of noncytolytic $V\delta 2^+$ T cells using the transwell assay. **C**, mice received 1×10^5 A431 tumor cells s.c. in the absence or presence of repeated i.p. injections of 4-29 T cells. **D**, A431 tumor cells' supernatant-dependent migration of 4-29 T cells. Points, mean of tumor sizes; bars, SD (A and C). The experiments were reproduced twice on groups of five mice, and representative data from one experiment are shown. Differences between control and $\gamma\delta$ -treated mice were not significant. Columns, percentages of migrating cells are represented ($n = 3$); bars, SD (B and D). Migration tests were done twice. **, $P < 0.005$.

cells, A431 cancer cells produced chemotactic factors that attracted 4-29 clones *in vitro* using the transwell assay (Fig. 6D). From all these analyses, we inferred that the effects of systemic *in vivo* $\gamma\delta$ T-cell passive immunotherapy on tumor growth is dependent on the cytotoxic activity of the $\gamma\delta$ effectors toward their targets, and that their migratory potential is probably necessary but not sufficient for their antitumor activity to be effective.

Discussion

Because severe combined immunodeficient mice can be successfully engrafted with human cells, they were used to evaluate $\gamma\delta$ T-cell-based immunotherapy of cancer. Zheng and colleagues (26) described a partial arrest of the growth of hypodermal nasopharyngeal carcinomas when mice received i.v. injections of V δ 2V γ 9 T cells. V δ 2V γ 9 T cells transferred i.p. into severe combined immunodeficient mice induced increased survival after i.p. injections of various cancer cell lines (3, 27). Whereas most of these studies analyzed the antitumor potential of human V δ 2V γ 9 T cells from healthy donors, Lozupone and colleagues (28) showed that both V δ 2V γ 9 and V δ 1⁺ cells expanded *ex vivo* from peripheral blood mononuclear cells of melanoma patients could prevent the growth of autologous tumors when coinoculated s.c. with cancer cells into severe combined immunodeficient mice. When $\gamma\delta$ T cells were infused i.v., however, only V δ 1 cells could migrate toward s.c. implanted cancer cells and inhibit tumor growth (28).

The present study was carried out to evaluate the antitumor potential of CMV-induced V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells *in vivo*, including their capacity to migrate in response to chemokines secreted by colon cancer cells as well as their ability to inhibit tumor growth. A complete analysis of the chemokines produced by HT29 cells had not been done previously. Here, we showed preferential production of inflammatory chemokines by HT29 cells, including the CCR3 ligands MIP-1 δ and monocyte chemoattractant protein-4. In parallel, we provided evidence for CCR3-dependent migration of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells *in vitro* and *in vivo*. More importantly, we showed for the first time that virally induced V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells can delay the growth of colon cancer cells *in vivo*, and that the antitumor effect is dependent on the specific activity of the $\gamma\delta$ effectors toward their targets.

We showed that most of the *in vitro* expanded V δ 2^{neg} and V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cells expressed CXCR3 and CCR3, and that their expression was stable postcellular activation. CXCR4, CCR7, and CCR9 were also found on V δ 2^{neg} and V δ 2⁺ $\gamma\delta$ cells, but their presence was transient in culture. Our results are in line with those of Glatzel and colleagues (29) who showed that CXCR4, in contrast to CXCR3, was down-regulated on phytohemagglutinin-activated V δ 2V γ 9 T cells. Although the physiologic relevance of CXCR3/CCR3 steady-state expression during $\gamma\delta$ T-cell expansion is unclear at present, it is worth noting that those receptors bind so-called inflammatory chemokines, and thus could trigger $\gamma\delta$ T-cell migration toward CMV-infected cells, as was recently reported for CXCR3⁺ CMV-specific CD8⁺ T cell (30), and colon cancer cells (the present study).

We showed that a systemic i.p. treatment with V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells inhibited the growth of HT29 hypodermal tumors xenografted into immunodeficient mice. Repeated injections of $\gamma\delta$ T cells increased the antitumor activity, as was shown in other xenograft models (26, 28). V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells preincubated with anti-CCR3 mAb lost their ability to delay tumor growth, suggesting that CCR3-mediated

migration is required for $\gamma\delta$ antitumor activity; thus, even though some 4-29 clones had reached the tumor site in response to other chemokines than the CCR3 ligands, they were likely to be not sufficient to delay tumor growth.

The antitumor effect was short lived because once formed, the tumors developed with equivalent rates in untreated and $\gamma\delta$ -treated mice. *In vitro*, HT29 cells were not sufficient per se to induce the proliferation of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells.⁴ Moreover, the Rag^{-/-} γ c^{-/-} mouse environment is depleted of human growth factors important for the maintenance of human $\gamma\delta$ T cells. Our attempt to improve $\gamma\delta$ immunotherapy by increasing the concentration of rhIL2 was unsuccessful; this was probably not sufficient for long term maintenance of human $\gamma\delta$ cells as already reported for peripheral V δ 2V γ 9 T cells in monkeys (31). This could clarify why 4-29 T cells only act at the initial steps of tumor development, when the effector/target cell ratio was in their favor. Indeed, systemic treatment with V δ 2^{neg} T cells had no effect on tumor growth when repeated injections were applied once the tumor formed.

Importantly, the antitumor activity was specific to anti-CMV V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ cells because V δ 2⁺ had no effect on HT29 tumor growth. Moreover, 4-29 T cells could not inhibit A431 tumor growth, suggesting that the antitumor potential of anti-CMV V δ 2^{neg} T cells depends on their capacity to recognize their targets. The fact that V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells exert their antitumor activity soon after the injection of HT29 cells makes it difficult to find V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells within hypodermal tumors in the mouse model. We were not able to show unequivocally the presence of human CD3⁺ cells by immunohistochemistry from day 3 and day 7 tumors (data not shown). Nevertheless, it seems very likely that 4-29 T cells had reached the s.c. tumor for the following reasons: (a) the mouse environment had little influence on the pattern of chemokine production by HT29 cells, which were shown to attract 4-29 clones *in vitro*, (b) the antitumor activity of 4-29 T cells was abrogated *in vivo* by addition of a blocking anti-CCR3 mAb, and (c) the inhibitory effect on tumor growth correlated with the capacity of $\gamma\delta$ cells to recognize their target and be cytolytic against it.

Finally, our findings that CMV-reactive V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ cells are able to inhibit the growth of colon adenocarcinomas *in vivo* might be of relevance for transplant recipients. Indeed, these patients are at high risk for CMV reactivation soon after transplantation and often develop cancer. Effector memory CMV-reactive V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells could then target the gut and exert their antitumor potential through their dual recognition ability. This might be relevant for different organs because we showed recently that epithelial cancer cells from different origins could be killed by CMV-reactive V δ 2^{neg} clones.⁵ V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ cells recognize both CMV-infected cells and tumor cells in a TCR-dependent manner, which suggests the recognition of common antigens. Systemic treatment via autologous injections of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells might be tricky to envisage in humans. Once specific V δ 2^{neg} TCR ligands are identified, one could think of a way to activate V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells *in vivo* as was recently shown with V γ 9V δ 2 cells (15, 32, 33).

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

⁴ Unpublished results.

⁵ Unpublished results.

Acknowledgments

Received 8/12/08; revised 2/13/09; accepted 2/27/09; published OnlineFirst 4/21/09.

Grant support: Association pour la Recherche sur le Cancer, Ligue Contre le Cancer comité départemental de la Gironde, Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM), Agence Nationale de la Recherche (ANR-05-JCJC-0129-01).

References

- Thedrez A, Sabourin C, Gertner J, et al. Self/non-self discrimination by human $\gamma\delta$ T cells: simple solutions for a complex issue? *Immunol Rev* 2007;215:123–35.
- Wu J, Groh V, Spies T. T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial $\gamma\delta$ T cells. *J Immunol* 2002;169:1236–40.
- Kabelitz D, Wesch D, Pitters E, Zoller M. Characterization of tumor reactivity of human V γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ T cells *in vitro* and in SCID mice *in vivo*. *J Immunol* 2004;173:6767–76.
- Kabelitz D, Wesch D, He W. Perspectives of $\gamma\delta$ T cells in tumor immunology. *Cancer Res* 2007;67:5–8.
- Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, et al. Regulation of cutaneous malignancy by $\gamma\delta$ T cells. *Science* 2001;294:605–9.
- Gao Y, Yang W, Pan M, et al. $\gamma\delta$ T cells provide an early source of interferon γ in tumor immunity. *J Exp Med* 2003;198:433–42.
- Maeurer MJ, Martin D, Walter W, et al. Human intestinal V δ 1+ lymphocytes recognize tumor cells of epithelial origin. *J Exp Med* 1996;183:1681–96.
- Ferrarini M, Heltai S, Pupa SM, Mernard S, Zocchi R. Killing of laminin receptor-positive human lung cancers by tumor infiltrating lymphocytes bearing $\gamma\delta$ (+) t-cell receptors. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:436–41.
- Choudhary A, Davodeau F, Moreau A, Peyrat MA, Bonneville M, Jotereau F. Selective lysis of autologous tumor cells by recurrent $\gamma\delta$ tumor-infiltrating lymphocytes from renal carcinoma. *J Immunol* 1995;154:3932–40.
- Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:6879–84.
- Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, Toma H, Uchiyama T. $\gamma\delta$ T cells provide innate immunity against renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2001;50:115–24.
- Corvaisier M, Moreau-Aubry A, Diez E, et al. V γ 9V δ 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J Immunol* 2005;175:5481–8.
- Sicard H, Al Saati T, Delsol G, Fournie JJ. Synthetic phosphoantigens enhance human V γ 9V δ 2 T lymphocytes killing of non-Hodgkin's B lymphoma. *Mol Med* 2001;7:711–22.
- Lamb LS, Jr, Musk P, Ye Z, et al. Human $\gamma\delta$ (+) T lymphocytes have *in vitro* graft vs leukemia activity in the absence of an allogeneic response. *Bone Marrow Transplant* 2001;27:601–6.
- Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, et al. $\gamma\delta$ T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 2003;102:200–6.
- Zheng BJ, Ng SP, Chua DT, et al. Peripheral $\gamma\delta$ T-cell deficit in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 2002;99:213–7.
- Penn I. Tumors in allograft recipients. *N Engl J Med* 1979;301:385.
- Birkeland SA, Storm HH, Lamm LU, et al. Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964–1986. *Int J Cancer* 1995;60:183–9.
- Dechanet J, Merville P, Berge F, et al. Major expansion of $\gamma\delta$ T lymphocytes following cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients. *J Infect Dis* 1999;179:1–8.
- Lafarge X, Merville P, Cazin MC, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating $\gamma\delta$ T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis* 2001;184:533–41.
- Dechanet J, Merville P, Lim A, et al. Implication of $\gamma\delta$ T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest* 1999;103:1437–49.
- Halary F, Pitard V, Dlubek D, et al. Shared reactivity of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 2005;201:1567–78.
- Goldman JP, Blundell MP, Lopes L, Kinnon C, Di Santo JP, Thrasher AJ. Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor γ chain. *Br J Haematol* 1998;103:335–42.
- Betts MR, Brenchley JM, Price DA, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 2003;281:65–78.
- Rincon-Orozco B, Kunzmann V, Wrobel P, Kabelitz D, Steinle A, Herrmann T. Activation of V γ 9V δ 2 T cells by NKG2D. *J Immunol* 2005;175:2144–51.
- Zheng BJ, Chan KW, Im S, et al. Anti-tumor effects of human peripheral $\gamma\delta$ T cells in a mouse tumor model. *Int J Cancer* 2001;92:421–5.
- Malkovska V, Cigel FK, Armstrong N, Storer BE, Hong R. Antilymphoma activity of human $\gamma\delta$ T-cells in mice with severe combined immune deficiency. *Cancer Res* 1992;52:5610–6.
- Lozupone F, Pende D, Burgio VL, et al. Effect of human natural killer and $\gamma\delta$ T cells on the growth of human autologous melanoma xenografts in SCID mice. *Cancer Res* 2004;64:378–85.
- Glatzel A, Wesch D, Schiemann F, Brandt E, Janssen O, Kabelitz D. Patterns of chemokine receptor expression on peripheral blood $\gamma\delta$ T lymphocytes: strong expression of CCR5 is a selective feature of V δ 2/V γ 9 $\gamma\delta$ T cells. *J Immunol* 2002;168:4920–9.
- Hokeness KL, Deweerd ES, Munks MW, Lewis CA, Gladue RP, Salazar-Mather TP. CXCR3-dependent recruitment of antigen-specific T lymphocytes to the liver during murine cytomegalovirus infection. *J Virol* 2007;81:1241–50.
- Sicard H, Ingoure S, Luciani B, et al. *In vivo* immunomanipulation of V γ 9V δ 2 T cells with a synthetic phosphoantigen in a preclinical nonhuman primate model. *J Immunol* 2005;175:5471–80.
- Dieli F, Vermijlen D, Fulfaro F, et al. Targeting human $\gamma\delta$ T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2007;67:7450–7.
- Sato K, Kimura S, Segawa H, et al. Cytotoxic effects of $\gamma\delta$ T cells expanded *ex vivo* by a third generation bisphosphonate for cancer immunotherapy. *Int J Cancer* 2005;116:94–9.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank Marina Juzan and Sophie Daburon for technical support, Franck Halary for his help in statistical analysis, Benoit Rousseau and Pierre Costet in the animal facility (Laboratoire de transgénése, Service Commun de l'Université de Bordeaux 2) for assistance in the *in vivo* experiments.

Conclusions de l'article 1

Des études préliminaires au laboratoire démontraient *in vitro* une double réactivité anti-virale et anti-tumorale de cellules T V $\delta 2^{neg}$ issues de patients transplantés infectés par le CMV (Halary, Pitard et al. 2005). Les objectifs de cette première partie de mon projet étaient d'étudier dans un contexte *in vivo*, le potentiel cytotoxique de clones T V $\delta 2^{neg}$ humains réactifs contre le CMV, contre des tumeurs solides humaines d'origine colique (HT29). Nous proposons ci-après de traiter des points qui n'ont pas été approfondis dans la discussion de l'article 1.

Nous avons démontré que des lymphocytes T V $\delta 5^+$ injectés en i.p dans des souris immunodéficientes ont la capacité **1) d'atteindre une tumeur** solide d'origine colique implantée en s.c et **2) de retarder sa croissance**.

1) La migration des lymphocytes T $\gamma\delta$ vers un site tumoral étant une étape essentielle au développement de leur réponse effectrice, elle faisait selon nous partie intégrante du potentiel anti-cancéreux des cellules T V $\delta 2^{neg}$. En concordance avec le contexte inflammatoire que représente un site tumoral nous avons démontré que des tumeurs solides HT29 produisent des chimiokines pro-inflammatoires en s.c chez la souris immunodéficiente. Peu d'études se sont intéressées au potentiel migratoire des lymphocytes T $\gamma\delta$, cependant il avait déjà été démontré *in vitro*, comme dans notre étude, que ces cellules T $\gamma\delta$ migraient sous l'effet de chimiokines pro-inflammatoires (Roth, Diacovo et al. 1998). De plus, nous avons détecté l'expression des récepteurs CXCR3 et CCR3 en surface des clones T V $\delta 5^+$ *in vitro*. L'expression du CXCR3 était déjà connue en particulier sur des lymphocytes T V $\delta 2^{neg}$ (V $\delta 1^+$) infiltrant des tumeurs pulmonaires (Sallusto, Lanzavecchia et al. 1998) en revanche le CCR3 n'avait pas encore été détecté sur les lymphocytes T $\gamma\delta$. Nous montrons que le CCR3 est impliqué dans la migration des clones T V $\delta 2^{neg}$ *in vitro*.

In vivo, nous observons qu'un blocage du CCR3 avec un Ac empêche l'activité anti-tumorale des clones T V $\delta 2^{neg}$ injectés en i.p. L'inhibition d'activité anti-tumorale observée *in vivo* est très probablement due au blocage de la migration des clones T V $\delta 2^{neg}$ *in vivo* du péritoine vers le site tumoral s.c et non pas à l'élimination des clones T V $\delta 2^{neg}$ par l'intermédiaire de l'Ac anti-CCR3. En effet, la fixation d'un Ac en surface d'une cellule peut conduire à sa destruction par différentes voies. i) Par une toxicité directe de l'Ac et nous avons vérifié *in vitro* que la fixation de l'Ac bloquant anti-CCR3 n'est pas toxique pour les clones T V $\delta 2^{neg}$, ii) Par une action du complément : nous avons observé dans des tests *in vitro* que la quantité d'Ac fixée en surface des clones T V $\delta 2^{neg}$ ne semble pas suffisante pour déclencher la réponse au complément murin. iii) Par une activation d'autres cellules du système immunitaire par l'intermédiaire des Fc gamma récepteurs (ADCC) (Sulica, Morel et al. 2001) mais l'absence de NK, dans les souris immunodéficientes utilisées, élimine leur implication dans une potentielle ADCC sur les clones T V $\delta 2^{neg}$. De plus, même si nous n'en avons pas de preuve directe, compte tenu de la quantité probablement insuffisante d'Ac fixé en surface des clones T V $\delta 2^{neg}$, nous ne pensons pas qu'une ADCC médiée par des monocytes et macrophages murins (ou même encore des neutrophiles (Desjarlais, Lazar et al. 2007)) soit la cause principale de la « reprise » de croissance tumorale observée en présence d'Ac. Ainsi **nous avons démontré que les clones T V $\delta 2^{neg}$ peuvent atteindre une tumeur par un phénomène de migration dans lequel CCR3 est probablement impliqué.**

2) Nous avons démontré que **les clones T V $\delta 2^{neg}$, réactifs contre le CMV**, administrés aux souris par des injections répétées en i.p, pouvaient spécifiquement **retarder la croissance de tumeurs HT29 sous la peau**. Le potentiel cytotoxique avéré de ces lymphocytes contre les HT29 *in vitro* de même qu'un effet inhibiteur *in vivo* dépendant du rapport

effecteurs/cibles est en faveur d'une lyse des cellules tumorales *in vivo*. Cette cytotoxicité exercée par les clones T V δ 2^{neg} pourrait potentiellement être dépendante de la perforine et d'un relarguage d'IFN γ mais indépendante du Fas selon des données obtenues préalablement au laboratoire *in vitro* (Halary, Pitard et al. 2005). Dans la mesure où nous ne disposons pas de données *in vivo*, aucun mécanisme d'action cytotoxique ne peut être exclu à priori (les voies apoptotiques Fas ou TRAIL pourraient être impliquées).

Les études menées au laboratoire supportent l'idée que chez les individus transplantés, les lymphocytes T V δ 2^{neg} sont impliqués dans la réponse immunitaire anti-CMV (Dechanet, Merville et al. 1999; Halary, Pitard et al. 2005). Nos résultats soulignant le potentiel anti-tumoral *in vivo* des clones T V δ 2^{neg} réactifs contre le CMV (Devaud, Bilhere et al. 2009) ainsi qu'une autre étude au laboratoire qui montre une incidence de cancer moins élevée chez des patients transplantés séropositifs pour le CMV (CMV-séropositifs) (Couzi, Levaillant et al. 2009), étayent la notion que les cellules T V δ 2^{neg} activées lors de l'infection à CMV pourraient être impliquées dans l'immunosurveillance anti-tumorale. Ainsi chez les transplantés immunosupprimés, potentiellement plus sensibles que des personnes immunocompétentes à l'apparition de cancers (Webster, Craig et al. 2007), l'activation des lymphocytes T V δ 2^{neg} par le CMV pourrait conférer une protection vis-à-vis des tumeurs. Cette protection pourrait s'étendre à des individus sains séropositifs pour le CMV puisqu'ils présentent également une expansion périphérique de cellules T V δ 2^{neg} (Pitard, Roumanes et al. 2008), mais aucune étude n'en a encore amené la preuve. Cette double-réactivité des lymphocytes T V δ 2^{neg} contre des cellules infectées par le CMV d'une part, et tumorales d'autre part, proviendrait de la reconnaissance d'un ligand commun qui pourrait être induit en surface de cellules stressées. Cette idée d'un antigène commun aux pathologies infectieuses et tumorales reconnu par les sous-populations T V δ 2^{neg} est déjà admise concernant les sous-populations T V δ 2⁺ activées par des phosphoantigènes (Thedrez, Sabourin et al. 2007).

Ainsi notre étude démontre le potentiel anti-tumoral *in vivo* vis-à-vis de cellules tumorales de cancers coliques de lymphocytes T V δ 2^{neg} possédant également un potentiel anti-viral. Cependant, malgré le retard de croissance tumorale observé lors d'injections systémiques en i.p. de lymphocytes T V δ 2^{neg}, l'effet inhibiteur n'est pas total. Ce résultat pourrait traduire une diminution de la charge tumorale dans des temps précoces, probablement dès l'injection des lymphocytes T V δ 2^{neg}. La vitesse de développement tumoral semble identique entre le groupe contrôle de souris et le groupe traité avec les lymphocytes TV δ 2^{neg}. Il se peut que, comme nous l'avons cité dans la discussion, l'absence de facteurs de survie des lymphocytes humains dans l'environnement murin, limite la durée de vie et d'action des clones T V δ 2^{neg} dans la souris. De même, le pourcentage de lymphocytes capables de migrer jusqu'à la tumeur pourrait être insuffisant pour inhiber totalement sa croissance. De plus, le ratio effecteurs / cibles favorable aux cellules T $\gamma\delta$ dans les premiers jours du développement tumoral est rapidement inversé dès que les cellules tumorales prolifèrent et forment une masse tumorale solide. Il semblerait que les clones T V δ 2^{neg} n'aient plus d'effet sur la croissance tumorale une fois qu'une masse tumorale solide (dès le jour 7 (J7)) est formée. En effet, aucun retard de croissance tumorale n'est observé quand le traitement par les cellules T V δ 2^{neg} débute à J7.

Comme nous l'avons vu en introduction, le rôle des lymphocytes T $\gamma\delta$ pourrait être plus limité dans un stade avancé du cancer ; par exemple, ils peuvent supprimer l'incidence de papillome dans un modèle de souris TCR δ ^{-/-} induites par un carcinogène, mais ils ne peuvent pas empêcher la progression d'un papillome vers un carcinome (Strid, Roberts et al. 2008). En effet, les lymphocytes T $\gamma\delta$ seraient des acteurs précoces de l'immunité anti-tumorale (Gao, Yang et al. 2003), participant à l'immunosurveillance anti-tumorale et intervenant dès l'apparition de cellules malignes. De nombreuses données proposent une intervention rapide de ces cellules T $\gamma\delta$, probablement dès l'initiation d'un cancer (Hayday 2009). Durant cette phase, elles seraient parmi les premières cellules à agir sur un site tumoral et coordonneraient

la réponse immunitaire anti-tumorale, notamment en relarguant des facteurs comme l'IL4 ou l'IFN γ (Mak and Ferrick 1998). Ainsi, dans l'idée de ce rôle non redondant avec les autres types de lymphocytes T $\alpha\beta$ (Girardi, Oppenheim et al. 2001), les lymphocytes T $\gamma\delta$ pourraient potentiellement contrôler l'échappement de cellules cancéreuses d'une tumeur primaire et prévenir l'apparition de tumeurs secondaires métastatiques. Nous avons testé cette hypothèse dans le contexte des cancers coliques métastatiques.

Résultats
2^{ème} Partie

II. 2^{ème} partie du projet : ETUDE DU POTENTIEL ANTI-METASTATIQUE DE LYMPHOCYTES T $\gamma\delta$ HUMAINS DANS UN MODELE ORTHOTOPIQUE DE CARCINOME COLIQUE

1. Objectifs de l'étude

Dans une seconde partie de mon projet de thèse, nous avons voulu élargir l'étude du potentiel anti-tumoral des lymphocytes T $V\delta^{neg}$ non seulement contre des tumeurs coliques solides mais aussi dans le contrôle des métastases s'échappant des tumeurs primaires qui représentent le stade létal d'un cancer. Les résultats de notre première étude confortent l'idée que les lymphocytes T $\gamma\delta$ joueraient un rôle précoce dans la réponse antitumorale. Ils pourraient ainsi intervenir très rapidement notamment au moment où les cellules tumorales s'échappent individuellement de la tumeur primaire pour former des métastases et sont plus vulnérables.

De plus, on peut noter que, le rôle des lymphocytes T $V\delta^{neg}$ sur des cellules métastatiques s'échappant d'une tumeur primaire ne semblait pas avoir été décrit dans les travaux publiés dans la littérature.

Nos objectifs lors de cette étude étaient :

- ◆ de développer un modèle murin d'implantation orthotopique intra-caecale de tumeurs colorectales et de métastases d'origines coliques.
- ◆ de mettre au point une méthode de suivi du développement des tumeurs solides et de leurs métastases en profondeur chez l'animal grâce à une technique d'imagerie *in vivo* que nous décrirons plus tard.
- ◆ de tester si le transfert de lymphocytes T $V\delta^{neg}$, pouvait avoir un effet inhibiteur aussi bien sur la tumeur primaire HT29 implantée au niveau de caecum que sur l'apparition des métastases à distance dans ce modèle murin.

Les résultats de la seconde partie de mon projet de thèse sont présentés dans l'article 2 qui est en préparation (*Antimetastatic potential of human $\gamma\delta$ T cells in an orthotopic mouse model of colon carcinoma*). Les conclusions sont proposées dans une discussion en français à la fin de l'article. Une partie « Méthodologies » est présentée ci-après comme pour la première partie de mon projet de thèse.

2. Méthodologies

2.1. Lymphocytes T $\gamma\delta$ utilisés

La deuxième partie de mon projet de thèse consistait en une étude plus générale du rôle des lymphocytes T V δ 2^{neg} dans les cancers coliques. Nous avons travaillé avec une lignée de lymphocytes T V δ 1⁺, qui sont, comme nous l'avons décrit précédemment, les représentant majoritaires des lymphocytes T $\gamma\delta$ aux niveaux des épithéliums intestinaux. Cette lignée V δ 1⁺ a été générée au laboratoire à partir de cellules isolées du sang d'un enfant ayant développé un CMV néonatal.

2.2. Modèle murin pour l'étude *in vivo* de la réactivité anti-tumorale des lymphocytes TV δ 2^{neg}

a. Souris utilisées

Dans cette 2^{ème} partie de mon projet nous avons majoritairement travaillé avec les souris RAG^{-/-} / γ (c)^{-/-} utilisées précédemment. Nous avons également été amenés à manipuler des souris NOG (NOD/Shi-SCID γ (c)^{-/-}). Ces souris, produites par Ito et al (Ito, Hiramatsu et al. 2002) semblent être parmi les plus immunodéficientes existant à l'heure actuelle. En effet, tout comme les souris RAG^{-/-} / γ (c)^{-/-}, elles sont dépourvues de lymphocytes T et B ainsi que de NK et sont également altérées pour plusieurs éléments du système immunitaire inné. Elles ont des fonctions défectueuses pour leurs macrophages, leurs cellules dendritiques ainsi que le système du complément, apportées par les caractéristiques des souris NOD/Shi SCID (Shultz, Schweitzer et al. 1995).

b. Le modèle de cancer colorectal métastatique

Beaucoup de modèles murins permettant l'étude de cancers colorectaux et de leurs métastases sont décrits dans la littérature. Notre intérêt se concentrant sur les effets de lymphocytes T $\gamma\delta$ humain sur des tumeurs humaines et leur métastases, nous avons choisi d'utiliser un modèle d'implantation des cellules de lignée de carcinome colique humain HT29 dans les souris immunodéficientes RAG^{-/-} / γ (c)^{-/-} ou NOG. Plusieurs modèles existent pour générer des métastases à partir de cellules tumorales humaines mais généralement il a été montré que les cellules HT29 implantées en s.c ne métastasent pas à distance (Giavazzi, Campbell et al. 1986; Bresalier, Raper et al. 1987). Des équipes ont développé des modèles de métastases de cellules HT29 qu'on pourrait qualifier de « métastases provoquées ». Ces modèles consistent à générer des métastases rapidement, sans passer par un stade de tumeur primaire en injectant directement les cellules HT29 en i.v (Price, Daniels et al. 1989; Thalheimer, Otto et al. 2009), en intrasplénique (la rate étant largement irriguée par les voies sanguines) (Hamada, Monnai et al. 2008) ou même encore en injectant directement les cellules HT29 sur un site potentiellement cible pour les métastases comme le foie (Hamblin, Del Governatore et al. 2000).

Mais le modèle le plus proche de la physiologie selon nous restait la génération de métastases spontanées à partir d'une tumeur primaire formée en orthotopique chez la souris. Il est possible dans ce cas de générer une tumeur sur le caecum (partie du côlon) des souris par une chirurgie de ligation ou SOI (*Surgical orthotopic implantation*) avec de petits morceaux de biopsies de tumeurs coliques provenant directement de patients cancéreux (Fu, Besterman et al. 1991; Sun, Sasson et al. 1999) ou encore de morceaux de tumeurs solides HT29 par exemple préformées *in vivo* chez une autre souris (Guilbaud, Kraus-Berthier et al. 2001; Flatmark, Maelandsmo et al. 2004). Nous avons tenté de générer des tumeurs primaires au niveau du caecum ainsi que des métastases s'échappant de ces tumeurs en injectant directement les cellules HT29 en suspension au niveau de la tunique séreuse (membrane la plus externe) du caecum. En effet, d'autres équipes avaient montrées que des souris *Nude* implantées en orthotopique avec des cellules HT29 développaient des tumeurs primaires au niveau du caecum et des métastases dans différents organes dont le foie et les poumons (de Both, Vermeij et al. 1999; Gao, Sun et al. 2009).

2.3. Modèle d'imagerie bioluminescente pour suivre le développement de tumeurs primaires en quantitatif et l'apparition de métastases.

a. Choix de la technique d'imagerie par bioluminescence

Afin de suivre de manière continue le développement de la tumeur caecale en profondeur, et l'apparition des métastases à distance sur les souris vivantes nous avons choisi une technique d'imagerie en bioluminescence (BLI), basée sur une émission de lumière par les cellules tumorales (Sato, Klaunberg et al. 2004) et l'utilisation d'une caméra de détection spécialisée, que nous décrirons plus tard.

En effet, la BLI est de plus en plus utilisée pour visualiser et suivre le développement de tumeurs primaires exprimant la luciférase (*luc*) établies dans différents sites dans la souris comprenant par exemple: la peau suite à des injections *s.c* (Jenkins, Oei et al. 2003) (Brutkiewicz, Mendonca et al. 2007) mais aussi le crâne (Szentirmai, Baker et al. 2006) (Cui, Xu et al. 2008), le péritoine (Caceres, Zhu et al. 2003), les poumons (Matsumoto, Espey et al. 2008) ou les os (Gomes, Welling et al. 2007). La BLI permet aussi un suivi de l'apparition des « métastases provoquées » suite à des injections *iv* notamment dans les poumons et le foie (Jenkins, Oei et al. 2003; Saur, Seidler et al. 2005), les ganglions lymphatiques (Ji, Cheng et al. 2009) mais aussi des métastases osseuses (Wetterwald, van der Pluijm et al. 2002; Huang, Singh et al. 2009). Enfin, elle permet de suivre l'apparition de métastases spontanées générées à partir d'une tumeur primaire, par exemple au niveau des poumons et du foie (Li, Zhang et al. 2007). Cette technique non invasive d'imagerie par BLI présentait donc un intérêt certain pour les observations de la tumeur intra-caecale en profondeur et des métastases à distance que nous souhaitions réaliser. Comme nous le discuterons plus tard, cette technique semble avoir été peu utilisée dans l'étude du rôle des lymphocytes T $\gamma\delta$ vis-à-vis des tumeurs.

Cette technique d'imagerie est basée sur l'utilisation d'enzymes ; les luciférases (*luc*), qui catalysent l'oxydation d'un substrat relarguant ensuite des photons (Greer and Szalay 2002). Les tissus des organismes mammifères n'émettant pas naturellement de la bioluminescence (contrairement à la fluorescence), un des intérêts évidents de la BLI pour nous était la très faible quantité de bruit de fond lors de l'acquisition d'un signal. Nous avons utilisé pour notre étude la *luc firefly (fluc)*, la plus étudiée des *luc*, qui provient de la luciole nord-américaine (*Photinus pyralis*). En dégradant son substrat, la D-luciférine (luciférine), la *fluc* provoque une émission de lumière verte à 562 nm. L'enzyme nécessite la présence d'ATP, d'oxygène et de magnésium et ne permet pas de visualiser des zones nécrotiques ou en hypoxie au sein d'une tumeur *in vivo* (Sato, Klaunberg et al. 2004). D'autre part, l'imagerie BLI présente une grande sensibilité par rapport à une approche classique de mesure

de taille de tumeurs à l'aide d'un pied à coulisse. En effet, elle permet de détecter rapidement une tumeur primaire peu de temps après l'implantation des cellules (Sweeney, Mailander et al. 1999). Ainsi des mesures quantitatives peuvent être commencées avant l'apparition d'une tumeur palpable (nécessaire pour les mesures au pied à coulisse).

Afin que les cellules HT29 que nous utilisons dans nos expériences expriment la luc, nous les avons modifiés génétiquement par transduction lentivirale.

b. Utilisation du modèle

Une fois les cellules HT29 transduites et implantées dans les souris, nous avons suivi leur localisation et leur évolution (croissance de la masse tumorale formée, apparition des métastases) *in vivo* à l'aide d'une caméra spécialisée dans la détection de lumière. Dans un premier temps, la luciférine, administrée par voie i.p, va rapidement diffuser dans l'animal entier et pénétrer dans les cellules (Contag, Olomu et al. 1998). Les animaux sont maintenus immobiles sous anesthésie dans la caméra pendant la photo dans une position qui doit rester constante d'une photo à une autre, d'un jour de prise à un autre.

Les détecteurs de la caméra *charge-coupled device* (CCD), utilisée pour photographier les souris, vont mesurer un nombre de photons émis sur une aire donnée au niveau de la souris. Ces caméras CCD amplifiées sont très sensibles et permettent de détecter de faibles quantité de lumière à des longueurs d'onde de 400 à 1000 nm, elles convertissent des photons lumineux, heurtant des petites gaufrettes en silice, en électrons. Un logiciel informatique peut ensuite convertir le signal d'électrons en images à deux dimensions (Spibey, Jackson et al. 2001). Lors de nos expériences, nous avons du prendre en compte les différents facteurs pouvant influencer la sensibilité de la BLI comme le nombre de cellules tumorales exprimant le gène luc, l'efficacité du promoteur devant le gène luc, la disponibilité des cofacteurs (ATP, oxygène) au sein de la tumeur, le temps entre injection de la luciférine en i.p et l'émission maximale de bioluminescence par la tumeur mais aussi la profondeur du tissus tumoraux. En effet, la lumière émise par le substrat traverse les tissus en profondeur jusqu'à la surface mais il semble que l'intensité des photons diminue de 10 fois par cm de tissus traversés (Contag, Contag et al. 1995). De ce fait, nous avons constitué des groupes d'au moins 8 à 10 souris pour les expériences compte tenu de la variabilité inter-souris.

La très grande majorité des études publiées utilisent ces caméras CCD comme la caméra IVIS-200® (Xenogen) (Jenkins, Oei et al. 2003; Ray, Tsien et al. 2007) ou encore le NightOwl LB 981® (Berthold Technologies) (Brutkiewicz, Mendonca et al. 2007) qui permettent de détecter des cellules tumorales exprimant la luc (luc^+) implantées dans des souris immunodéficientes pendant un temps d'acquisition limité. Nous avons utilisé une caméra permettant une acquisition d'image en temps réel pendant la durée de notre choix ; le photon Imager® (Biospace). De très rares études de suivi de développement de tumeurs luc^+ utilisent cette caméra Biospace. On peut citer une étude d'injection des cellules de rhabdosarcomes R1M luc^+ en s.c dans des souris *Nude* dont la croissance est suivie après injection i.v ou i.p de la luciférine (Keyaerts, Verschueren et al. 2008) ou encore l'injection d'une lignée mammaire murine luc^+ en s.c dans la région inguinale dont l'évolution est suivie avec la caméra Biospace ((Shibata, Morimoto et al. 2008).

Le logiciel associé à la caméra permet de quantifier l'intensité de lumière émise (nombre de photons frappant les détecteurs) et de convertir ces valeurs en graphiques « pseudo-couleur » qui permettent une interprétation visuelle rapide (figure 22a). Nous avons réalisé des mesures quantitatives au sein de régions d'intérêts (ROI) (figure 22a). Le logiciel peut représenter une courbe de la bioluminescence émise au sein d'une ROI avec une mesure de bioluminescence par seconde. Ce profil dynamique de l'émission de photons est important pour la quantification du signal. En effet l'intensité de l'émission de photons change avec le

temps, notamment en fonction de la disponibilité du substrat sur le site tumoral. Cette disponibilité est directement reliée à la cinétique d'administration du substrat qui varie d'un animal à l'autre (Paroo, Bollinger et al. 2004). La mesure de l'émission de photons en fonction du temps peut être effectuée en cumulant plusieurs images. Par la suite nous avons systématiquement extrait 30 sec de valeurs de bioluminescences émises par la tumeur au niveau du plateau (maximum) d'émission (figure 22b). De cette manière, nous avons pu comparer les valeurs de bioluminescences émises par une tumeur primaire d'une souris à une autre et d'un groupe ayant reçu les injections de lymphocytes T V δ 1⁺ ou non.

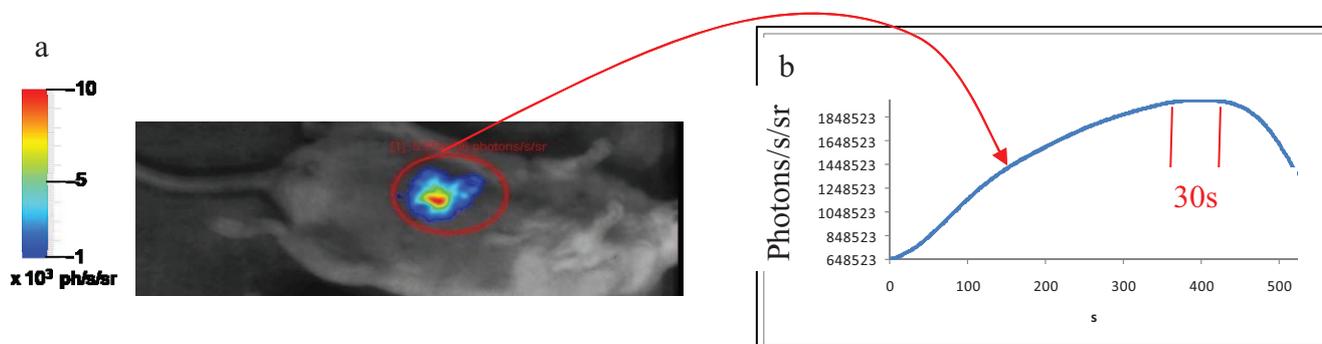


Figure 22 : Principe de l'analyse d'image après acquisition avec le photon Imager. Avec ph =photon, s =seconde, sr =steradian (angle). Le cercle rouge représente la ROI

Article 2:

Anti-metastatic potential of human $\gamma\delta$ T cells

in an orthotopic mouse xenograft model of colon

carcinoma

*Christel Devaud, Benoît Rousseau, Sonia Netzer, Vincent
Pitard, Pierre Costet, Jean-François Moreau, Franck Couissaud,
Julie Dechanet-Merville, and Myriam Capone*

Anti-metastatic potential of human $\gamma\delta$ T cells in an orthotopic mouse xenograft model of colon carcinoma

Christel Devaud,^{1,2} Benoît Rousseau, Sonia Netzer,^{1,2} Vincent Pitard ^{1,2}, Pierre Costet, Jean-François Moreau,^{1,2,3} Franck Couillaud,^{1,4} Julie Dechanet-Merville,^{1,2} and Myriam Capone^{1,2}

¹ Université Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France

² CNRS UMR 5164, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France

³ Laboratoire d'Immunologie et d'Immunogénétique, CHU Bordeaux, place Amélie Raba-Léon, 33076 Bordeaux, France

⁴ CNRS UMR 5231, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France

Running title:

Immunotherapy of invasive colon carcinoma with $\gamma\delta$ T cells

Key words: human colon carcinoma, metastases, human gamma delta T cells, orthotopic mouse xenograft model

Financial support: Ligue Contre le Cancer comité départemental de la Gironde, Fondation pour la Recherche Médicale, Agence Nationale de la Recherche (ANR-05-JCJC-0129-01), three grants.

Requests for reprints: Myriam Capone, UMR-CNRS 5164, Université Victor Segalen
Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France. E-mail: [myriam.capone@u-
bordeaux2.fr](mailto:myriam.capone@u-bordeaux2.fr). Phone number: 05.57.57.14.71, fax number: 05.57.57.14.72.

ABSTRACT

$\gamma\delta$ T cells contribute to host immune competence uniquely. In a stress surveillance response, they can kill malignantly transformed cells and are not necessarily restricted by major histocompatibility complex (MHC) molecules. Interestingly, T cell receptor (TCR) V δ 2 negative (^{neg}) cells, in particular the V δ 1⁺ subset, are enriched in the intestine mucosa and were found to infiltrate various epithelial tumors including colon carcinomas. Furthermore, V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T cells are known to be cytotoxic against various colon carcinoma cells *in vitro*. The objective of this study was to investigate the antitumor activity of V δ 1⁺ lymphocytes in a mouse xenograft model of metastatic colon carcinoma. We engineered stable human colon tumor cell lines expressing luciferase (HT29 luc). Using bioluminescence imaging (BLI) and standard caliper measurements, we showed that local treatment with V δ 1⁺ cells substantially inhibited the growth of subcutaneous HT29 luc tumors. Then, HT29 luc cells were implanted in the caecum of immunodeficient mice to set up a reliable model of metastatic colon cancer, what was proven by the detection of both primary colon tumors as well as lung and liver metastases. Mice treated with continuous (twice a week) intraperitoneal injections of V δ 1⁺ T lymphocytes had significantly smaller primary tumors and lower numbers of distant metastases than untreated control mice. These novel findings which suggest that V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T cells could have an inhibitory effect on metastatic colon cancer progression could support their value in immunotherapy.

INTRODUCTION

Colorectal carcinoma (CRC) remains one of the leading causes of cancer death worldwide. CRC develops slowly from colorectal hyperplasia to adenoma to invasive carcinoma, but progress rapidly to the metastatic phase. In colorectal carcinoma, the mesenteric circulation from the gut and the permissiveness of the liver capillary sinusoids are thought to favor liver metastasis. Following blood flow patterns from the liver or from primary tumors on the descending colon, the second most frequent sites of metastasis are the lungs. In addition, colon carcinoma cells preferentially adhere to the liver and lung endothelia, suggesting the existence of specific molecular interactions that favor the retention of tumor cells in these organs (Nguyen, Bos et al. 2009).

During the last decade, significant progresses were made in the treatments against metastatic colorectal carcinoma. Combination regimens with standard (5-fluorouracil (5-FU), leucovorin (LV)) and novel (irinotecan, oxaliplatin) chemotherapeutic agents have significantly extended patients' survival. Further investigation was centered on the development of targeted biological treatments and led to the outburst of monoclonal antibody (mAb)-based immune therapies. Bevacizumab (Avastin®) directed against the vascular endothelial growth factor (VEGF) was the first targeted agent to show clinical benefit in metastatic CRC. Subsequently, Cetuximab (ErbixTM) and Panitumumab directed against the epidermal growth factor receptor (EGFR or ErbB1 or HER1) were approved for treatment of metastatic CRC that was refractory to conventional chemotherapy (Ng and Zhu 2008). Moreover, mAbs that target cell surface molecules on tumors induce an antibody dependent cell-mediated cytotoxic mechanism (ADCC) by the innate immunity through Fc receptors. Success against CRC might rely on the combination of different strategies among which immune therapies put forward a novel area of investigation. One can think of a mean to manipulate own patients' immune effectors that can specifically eliminate colorectal cancer cells with limited side effects.

The existence of HLA-restricted T cells specific for colorectal cancer cells within tumor infiltrating lymphocytes (TIL) from patients with CRC was demonstrated in the 1990s. It was soon recognized that the immune composition of the tumor infiltrate is crucial, and rich of both adaptive and innate effectors. A very nice work from Galon et al. showed that the type, density and *in situ* location of immune cells could predict the clinical outcome of CRC patients (Galon, Costes et al. 2006; Galon, Fridman et al. 2007). In particular, the presence of high levels of memory CD45⁺ T cells correlated with the absence of early metastatic invasion (Pages, Berger et al. 2005). In CRC patients with high density of TILs, the presence of distant metastases was overall associated with altered immune responses (Camus, Tosolini et al. 2009).

The multifaceted crosstalk that exists between cancer and immune cells led to the recent cancer immunoediting concept. Thus, the immune system possess both the ability to detect and eliminate tumor cells (elimination phase) and, at term, to select tumor cell variants suppressing the anti-tumor response (escape phase). The transitional phase, of erratic extent, is defined by an equilibrium state where tumor growth is contained by immunity. Each of these processes, that function either independently or in sequence, rallies specialized elements of the immune system. Cytotoxic effectors are crucial for the elimination phase, as is the release of the anti-proliferative factor interferon γ (IFN γ). Regulatory T cells that trigger hypo-responsiveness of anti-tumor effectors participate to the escape phase. Finally, a very nice demonstration was recently carried out by the group of Schreiber in the mouse model, that shows that adaptive immunity can restrain cancer growth (equilibrium state) for extended time periods (Koebel, Vermi et al. 2007). Such ongoing progresses in tumor immunology are crucial to anticipate new protocols for cancer immunotherapy.

$\gamma\delta$ T lymphocytes are unconventional T cells that are essential contributors of the lymphoid response to cellular alterations which occur during infections and cancers. Once activated by target cells, $\gamma\delta$ T cells exert important functions such as cell killing activity and

cytokine production (such as IFN γ). $\gamma\delta$ T cell activation is a complex process involving T Cell Receptor (TCR)-dependent signals, as well as stimulatory signals delivered notably by the NKG2D receptor and its (stress-induced) ligands. Importantly, $\gamma\delta$ TCRs recognize specific antigens in a non-MHC-restricted fashion, a unique property that might circumvent the ability of cancer cells to evade detection (Hayday 2000; Hayday 2009).

In physiological context, $\gamma\delta$ T lymphocytes represent a minority white cell in the blood (0.5-5%); however, they colonize epithelial surfaces such as the intestinal wall where they might exert fast-acting immune responses (Hayday, Theodoridis et al. 2001). Nearly all human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells express a TCR composed by V γ 9 and V δ 2 chains, in contrast to intraepithelial $\gamma\delta$ T cells which are V δ 2^{neg} (V δ 1⁺ for most of them). In pathological contexts, V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells can represent a substantial fraction of circulating T lymphocytes. In accord with their anti-tumor potential *in vivo*, our recent work suggests that transplant recipients with high numbers of circulating V δ 2^{neg} (V δ 1⁺ and V δ 3⁺) lymphocytes in response to cytomegalovirus (CMV) infection are less prone to develop cancer (Couzi, Levailant et al. 2009). Increased frequencies of human peripheral blood V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T cells were also associated with a better prognosis in several cases of hemathologic malignancies (Lamb, Musk et al. 2001; Poggi, Venturino et al. 2004; Meeh, King et al. 2006; Catellani, Poggi et al. 2007). Furthermore, V δ 1⁺ lymphocytes were found to infiltrate various epithelial tumors including colon adenocarcinomas (Maeurer, Martin et al. 1996), suggesting that they participate to local anti-tumor immunity. It was shown that mice deficient in $\gamma\delta$ T lymphocytes display an enhanced formation of azoxymethane-induced colorectal adenocarcinoma (Matsuda, Kudoh et al. 2001). Yet, the implication of human V δ 1⁺ cells in the immune surveillance against CRC has not been reported so far, despite their reported capacity to kill colon cancer cell lines *in vitro* (Maeurer, Martin et al. 1996; Groh, Rhinehart et al. 1999).

In the present study, we sought to shed light on this question by means of an orthotopic mouse xenograft model of colon carcinoma. Using bioluminescence imaging (BLI) to follow the outcome of cancer cells, we showed that systemic treatment with human V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T cells could inhibit the growth of intracaecal HT29 tumors. More importantly, our results are the first arguing for a crucial role of $\gamma\delta$ T cells in preventing the dissemination of colon cancer cells, leading to a substantial reduction of distant (hepatic and pulmonary) metastases in $\gamma\delta$ -treated mice when compared to control mice. Considering that metastases represent a major cause of death in colorectal patients, our findings which extend our previous work (Devaud, Bilhere et al. 2009) put forward V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells as attractive candidates for novel anti-tumor immunotherapy protocols (Zocchi and Poggi 2004) (Kabelitz, Wesch et al. 2007).

MATERIALS AND METHODS

Animals and human cells

We used NOG (Jackson laboratories) and Rag^{-/-}γc^{-/-} (a gift from Dr. James Di Santo (Goldman, Blundell et al. 1998)) immunodeficient mice at 7-10 wks of age. All mice were housed in an appropriate animal facility (Animalerie A2, Université de Bordeaux 2), and kept under pathogen-free conditions. For all experiments (tumor implantations and imaging), animals were anesthetized with a mixture of oxygen/isofluoran using an inhalation anesthesia system (TEM-SEGA, Lormont, France) with 4% isofluoran for induction and 1% for maintenance.

The colon carcinoma (HT29) cell line was from the American Type Culture Collection (ATCC). It was cultured in DMEM (Gibco, Cergy Pontoise, France) supplemented with 8% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (PAA laboratories GmbH, Haidmannweg, Austria). The Vδ1⁺ γδ T cell line was established in the laboratory from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of a child with a neonatal cytomegalovirus (CMV) infection. Human γδ T cells were expanded with phytohemagglutinin (PHA) and irradiated allogeneic PBMC as described previously (Halary, Pitard et al. 2005). γδ T cells were cultured 2-3 weeks before use in RPMI 1640 (Gibco), 10% human serum (HS), and 1000 IU/ml recombinant human interleukin-2 (rhIL-2, Peprotech France, Neuilly-sur-Seine, France) at 37° C in 5 % CO₂. They were tested negative for mycoplasma contamination.

Generation of a *Firefly* luciferase-expressing HT29 cell line (HT29 luc)

To generate HT29 cells that stably express *Firefly* luciferase (*fluc*), *fluc* cDNA was amplified by PCR from pGL3 luciferase reporter vector (Promega, , Charbonnières les Bains, France). BamHI and Sall restriction sites were added on 5' end of primers for further cloning in pRRLSIN.cPPT.MNDU3.MCS.WPRE vector (vector 14, plateforme de vectorologie, Bordeaux2). The primers used were: LucBam5'AAAAAGGATCCAAGCCACC

ATGGAAGACGCC and LucSal3'TTTTTGTTCGACGACTTAGAATTACACGGCG. The *fluc* cDNA was under the control of the MND promoter (removed from a lentiviral vector provided by Dr Kohn DB) owing high expression *in vivo* (Halene, Wang et al. 1999). Lentiviral particles were produced by transient transfection of 293T cells as described previously (Geronimi, Richard et al. 2003). Appropriate enzyme-linked immunosorbent assays were used to determine the concentration of viral p24 protein in viral supernatants. HT29 cells ($2 \cdot 10^5$ per well) were seeded onto 24-well plates 24hr before transduction. Cells were then transduced at a multiplicity of infection (MOI) of 40 which allows maximal infection efficiency as determined by our preliminary analyses.

Luminometric analysis/ Luciferase assay

The expression level of luciferase in HT29 luc cultured cells and in total organs was determined *in vitro* using the Luciferase Assay System (las) (Promega) according to the manufacturer's instructions. For cultured cells, 50 μ l of 1X lysis buffer (Promega) were added to $3 \cdot 10^5$ PBS washed HT29 luc cells. For organ analysis, total organs were sat in 1ml of 1X lysis buffer and grounded using an Ultra Turax T25 (IKA, Staufen, Germany) at 13500 rpm, for 30s at 4°C. Cell lysis occurred during 15 min-incubation at room temperature. Then, 5 μ l of lysed samples (culture cells or organs) were mixed with 50 μ l of las (Promega) containing D-luciferin, and photon were counted (10 s) with a luminometer (LUMAT 9501, Berthold Technology, Bad Wildbad, Germany). The value of the temporal integration of light measured during the exposure time was quantified in Relative Light Unit (RLU).

Cellular cytotoxicity assay

The cytolytic potential of V δ 2^{neg} γ δ T cells was measured by using the flow cytometry-based CD107a assay (Betts, Brenchley et al. 2003). 6 h co-cultures of $5 \cdot 10^4$ γ δ T cells and $5 \cdot 10^4$ HT29 or HT29 luc cells were carried out in the presence of PE anti-CD107a mAb (clone

H4A3, BD Biosciences). A positive control was realized by co-incubation of 5×10^4 $\gamma\delta$ T cells with 15 $\mu\text{g/ml}$ of an activating anti-CD3 antibody (UCHT1, Beckman Coulter, Paris, France). Cells were harvested and analyzed by flow cytometry with a FACSCanto apparatus (BD Biosciences).

Photographs and Histopathology

Caecums, livers and lungs from control and tumor-bearing mice were photographed with a camera (Nikon, Paris, France) before excision from the mice at necropsy. After excision, tissues of interest were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Serial tissue sections (4 μm thick) were mounted on glass slides and dried at 56°C before dewaxing in xylene and alcohol rehydration. Sections were stained with Hematoxylin Eosin Saffranin (HES) according to standard histologic procedures. Photographs were taken with the x4 objective of a Coolscope microscope (Nikon).

Bioluminescent imaging (BLI)

BLI was performed using a high-sensitive charge coupled device (CCD) camera: the Photon Imager (Biospace, Paris, France) owing real time imaging. Analyses were done with the Photovision software (Biospace). For *in vitro* imaging, HT29 luc cells were diluted into PBS in 96-well plates. 100 μl of PBS with D-luciferin (Promega) at $4 \cdot 10^{-3}$ M (150 $\mu\text{g/ml}$) were added to each well 5 min prior imaging. For *in vivo* imaging, mice were anesthetized and were injected i.p with 100 μl of PBS containing D -luciferin at 150 mg/kg (about 3 mg per mouse). Mice were imaged immediately after. Photons emitted were acquired during 5 to 25 min and photographic images were recorded at the end of acquisition. Bioluminescent pseudocolor images displayed in the text are shown superimposed on gray-scale photographic images of the mice, with the most intense bioluminescent signal shown as red and the weakest signal shown as blue. For image analysis, an elliptical region of interest (ROI) was drawn over the tumor location. The surface area of the ROI was kept constant within all experiments.

A time-activity curve was obtained from ROI analysis using the Photovision software. In order to normalize the data, the mean of 30 sec of maximal emission was taken for each ROI. Results were expressed as photons/second/steradian (ph/s/sr) using the conversion factor (1cpm=28 ph/s/sr) provided by the camera manufacturer (Biospace). For *ex vivo* imaging, about 3mg of D-luciferin in 100µl of PBS were injected i.p into the mice 5 min just before necropsy. Tissues of interest were then rapidly excised, placed into 24-well tissue culture plates containing 500µl of D-luciferin at 2.5mg/ml and imaged for 5 min.

Implantations of human HT29 luc cells in mice and adoptive transfer of Vδ1⁺ γδ T cells

To produce subcutaneous tumors, mice received 1.10^5 HT29 luc cells in 100µl of DMEM 8% FBS into the right flank. Local s.c. injections of γδ T cells were performed by the simultaneous inoculation of 100 µl of culture medium (RPMI, 10% HS, 1000 IU/ml rhIL2) containing 10.10^6 Vδ1⁺ cells. Tumor growth was monitored by measuring the maximal and minimal diameters with a caliper three times a week. Tumor volume was estimated using the formula: tumor volume (mm³) = [length (mm) x width² (mm)]/2. In parallel, tumor growth was quantified by BLI.

The experimental metastasis assay was achieved with various inocula of HT29 luc cells, injected intravenously (i.v) in 100µl of DMEM 8% FBS into the retro-orbital plexus of mice.

To induce orthotopic colon tumors, mice were anesthetized, the abdomen was shaved off, sterilized with alcohol and a small incision was made on the lower left of the midline. Then, the caecum was gently exteriorized. The microsurgical procedures were performed under a binocular microscope (Nikon). 1.10^5 HT29 or HT29 luc cells in 50 µL of DMEM 8% FBS were carefully injected subserously in the cecum. After PBS washing, the caecum was replaced into the peritoneal cavity, and the abdominal wall and skin were stitched. When a systemic treatment was applied, mice received i.p injections of the Vδ1 cell line 3 times a week from day 0 until the end of the experiment at day 36.

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). Data were analysed with STAT Xat-8 with Cytel Studio (Cytel Statistical Software). For *in vivo* studies, we applied a non parametric permutation exact test described in detail in Siegel S. and Castellan NJ., 1988, *Nonparametric statistics for the behavioral sciences* (second edition McGraw-Hill, New York). This test is adapted for a finite data sample (less than 30 mice per group). Regression plots were used to describe the relationship between bioluminescence and tumor volume; R^2 value is reported to assess the quality of the regression model. For *in vitro* studies, we applied the Kruskal-Wallis test. For all experiments, a *P* value <0.05 was considered significant.

RESULTS

Generation of an HT29 luc colon cancer cell line

With the goal to follow the development of colon cancer cells *in vivo* by the sensitive BLI method, we sought to generate an HT29 cell line expressing intense bioluminescent signals. To do so, we took advantage of the high transduction efficiency of lentiviral vectors, and used appropriate promoter for strong expression of *Firefly* luciferase *in vivo* (described in “Material and Methods”). The new luciferase-transduced HT29 (HT29 luc) cell line was found to express 1.10^7 RLU/300000 cells by luminometric analysis, and luciferase expression was stable over time *in vitro* (not shown). HT29 luc cells were serially diluted and light emission was visualized with the imager (Figure 1A). The bioluminescence signal was saturated in wells containing more than 1000 cells (data not shown), and negligible in the absence of luciferin (well with cells alone). As few as 25-50 HT29 luc cells per well could be detected by BLI, a fairly low number when compared to previous findings (Jenkins, Oei et al. 2003). Importantly, lentiviral transduction didn't modify the sensitivity of HT29 cells toward the $V\delta 1^+$ cell line which, *in vitro*, exhibited relatively high cytolytic activity (30-35% of $CD107a^+$ cells) against both HT29 and HT29 luc cells (Figure 1B).

Local treatment with $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T lymphocytes delayed the development of HT29 luc hypodermal tumors

HT29 luc cells were injected into the flank of immunodeficient mice in a first attempt to monitor tumor growth using BLI (Figure 2A and 2D). Subcutaneous (s.c.) injections of tumor cells allowed concomitant volumetric measurements of tumor mass (Figure 2B). We first tested the effect of local $\gamma\delta$ -treatment on tumor growth, by simultaneous s.c. inoculation of $V\delta 1^+$ lymphocytes. The development of HT29 luc tumors was obviously delayed in $\gamma\delta$ -treated mice (HT29 luc+ $V\delta 1$ line) as compared to control mice (HT29 luc) (Figures 2A, 2B, and 2D). However, despite an effector/target ratio of 100/1, tumor growth was not arrested by single

local injections of $V\delta 1^+$ lymphocytes. Thanks to the high sensitivity of BLI, HT29 luc cells could be detected as early as day 2 in control mice (not shown), before the apparition of measurable hypodermal tumors at day 7 (Figure 2B). Normalized images revealed clear differences in tumor loads between control and treated mice (Figure 2D). A positive correlation was shown between photon emission and tumor size for control ($R^2=0.91$, Figure 2C) and treated mice ($R^2=0.93$, not shown). In their whole, our results encourage the use of BLI to follow the dissemination of colon cancer cells *in vivo*, and to study the potential anti-tumor activity of $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T lymphocytes in this context.

The experimental metastasis assay generates bioluminescent colon tumor foci at one single site

Although s.c. injections of HT29 luc cells were necessary to validate our cellular tools, hypodermal HT29 luc tumors didn't appear to be metastatic in our mouse model (Figure 2D and data not shown); therefore, they were not optimal to test whether $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells could have anti-metastatic properties. To generate colonic metastases, we tried at first to use the previously described experimental metastasis assay consisting in intravenous (i.v.) injections of cancer cells (Price, Daniels et al. 1989; Garofalo, Chirivi et al. 1993). Figure 3A depicts representative bioluminescent images from mice receiving 1.10^6 HT29 luc cells retro-orbitally. Human cancer cells were detected around the lung area as early as 10 minutes post-i.v. inoculation at day 0; they were still visible at day 6, but disappeared at day 10 (Figure 3A). Bioluminescent signal intensity and kinetics were dependent on the number of HT29 luc cells infused. The signal reappeared after 27 days in mice receiving 1.10^6 cancer cells (Figure 3A); when smaller numbers (5.10^5 and 1.10^5) of HT29 luc cells were inoculated, a minimum of 40 days was necessary to recover bioluminescent data (not shown). Luminometric analyses confirmed the presence of colonic cancer cells in the lungs of HT29 luc i.v.-infused mice at the end of experiment, in contrast to guts and livers (Figure 3B). These results suggest that in

the experimental metastasis assay, most of human HT29 luc cells died during the first week, until some of them could adhere to the lung endothelium and start growing to form a novel tumor mass.

Setting up a mouse model for human metastatic colon carcinoma

The experimental metastases assay was not satisfactory since, despite inoculation of high numbers of cancer cells (1.10^6), we couldn't detect HT29 luc cells in liver, the most frequent site of metastases in CRC. We thus decided to set up a more physiological model by orthotopic microinjection of HT29 cells, as was recently done with other colon cancer cell lines (Cespedes, Espina et al. 2007). After microsurgical injection of 1.10^5 HT29 cells under the external serosa of the caecum wall (Figure 4A), HT29 tumors developed and formed a small mass at day 15 (data not show), that increased in size and invaded the caecum later on. Figure 4B shows the presence of a huge vascularized colon tumor 2 months post-inoculation of 1.10^5 HT29 cells. At that time, secondary foci were visible at necropsy in lungs and livers of tumor-bearing mice; they appeared as semi-translucent spots in lungs, and white masses in livers (Figure 4B). Human colon cancer cells were easily detected on histological sections of organs from tumor-bearing mice (Figure 4C).

Orthotopic microinjections of HT29 luc cells authorized the use of BLI to follow tumor development (Figure 4D). The signal emitted by the primary tumor increased progressively until the end of experiment at day 36 (Figure 4D). During the second week (day 10 on figure 4D), some luminescent spots were often seen close from the caecum area; they could relate to the presence of colon cancer cells in lymph nodes (hardly visible to the naked eye in immunodeficient mice). Distant metastases apparition occurred around days 15-18 by reason of inter-animal variation (day 18 on figure 4D). Luminometric analyses proved the presence of HT29 luc cells in caecum, lungs and liver of tumor-bearing mice. As seen in Figure 4E, light emission by total organ increased progressively during the course of the experiment. To

note, all of tumor-bearing mice that showed distant metastases in lungs and/or liver had developed a primary tumor in the caecum (Figure 4D, 4E and data not shown). Taken together, these results makes orthotopic transplantation of HT29 luc colon cancer cells a good model to mimic the natural history of human CRC.

V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T cells present anti-metastatic properties

We finally tested the effect of continuous i.p. infusions of V δ 1⁺ lymphocytes on the apparition of distant tumor metastases in mice bearing intracaecal HT29 luc tumors. The results obtained are shown in table 1 and summarized in table 2. They illustrate one representative experiment. Interestingly, the apparition of secondary tumor foci was noticeably delayed in $\gamma\delta$ -treated mice when compared to control mice. Thus, first metastases appeared at day 15 in control mice (table 1, 2 and figure 6A), and at day 31 when mice received systemic $\gamma\delta$ treatment (table 1 and 2). At the end of experiment, 100% of control mice had developed metastases in contrast to 42 % for $\gamma\delta$ -treated mice (table 2). Moreover, most of control mice had huge intracaecal tumors at day 36 (table 1). However, despite 2/7 mice had also developed important primary tumors in the $\gamma\delta$ -treated group (68,1 and 45,2 % of maximal tumor size), they didn't show any metastasis at that time (table 1). Finally, dissection of representative mice at necropsy proved the presence of secondary tumor foci in lungs and liver from untreated mice, while fewer if any HT29 luc cells were detected in the $\gamma\delta$ -treated group (Figure 6B). These results that revealed for the first time the anti-metastatic properties of V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T cells could be of significant relevance to anticipate new immunotherapeutic treatments for human CRC.

REFERENCES

1. Nguyen, D.X., P.D. Bos, and J. Massague, *Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 274-84.
2. Ng, K. and A.X. Zhu, *Targeting the epidermal growth factor receptor in metastatic colorectal cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2008. **65**(1): p. 8-20.
3. Galon, J., et al., *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. Science, 2006. **313**(5795): p. 1960-4.
4. Galon, J., W.H. Fridman, and F. Pages, *The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective*. Cancer Res, 2007. **67**(5): p. 1883-6.
5. Pages, F., et al., *Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(25): p. 2654-66.
6. Camus, M., et al., *Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence*. Cancer Res, 2009. **69**(6): p. 2685-93.
7. Koebel, C.M., et al., *Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state*. Nature, 2007. **450**(7171): p. 903-7.
8. Hayday, A.C., *[gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 975-1026.
9. Hayday, A.C., *Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response*. Immunity, 2009. **31**(2): p. 184-96.
10. Hayday, A., et al., *Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology*. Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 997-1003.
11. Couzi, L., et al., *Cytomegalovirus-Induced {gamma}{delta} T Cells Associate with Reduced Cancer Risk after Kidney Transplantation*. J Am Soc Nephrol, 2009.
12. Lamb, L.S., Jr., et al., *Human gammadelta(+) T lymphocytes have in vitro graft vs leukemia activity in the absence of an allogeneic response*. Bone Marrow Transplant, 2001. **27**(6): p. 601-6.
13. Meeh, P.F., et al., *Characterization of the gammadelta T cell response to acute leukemia*. Cancer Immunol Immunother, 2006. **55**(9): p. 1072-80.
14. Catellani, S., et al., *Expansion of Vdelta1 T lymphocytes producing IL-4 in low-grade non-Hodgkin lymphomas expressing UL-16-binding proteins*. Blood, 2007. **109**(5): p. 2078-85.
15. Poggi, A., et al., *Vdelta1 T lymphocytes from B-CLL patients recognize ULBP3 expressed on leukemic B cells and up-regulated by trans-retinoic acid*. Cancer Res, 2004. **64**(24): p. 9172-9.
16. Maeurer, M.J., et al., *Human intestinal Vdelta1+ lymphocytes recognize tumor cells of epithelial origin*. J Exp Med, 1996. **183**(4): p. 1681-96.
17. Matsuda, S., S. Kudoh, and S. Katayama, *Enhanced formation of azoxymethane-induced colorectal adenocarcinoma in gammadelta T lymphocyte-deficient mice*. Jpn J Cancer Res, 2001. **92**(8): p. 880-5.
18. Groh, V., et al., *Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 6879-84.
19. Devaud, C., et al., *Antitumor activity of gammadelta T cells reactive against cytomegalovirus-infected cells in a mouse xenograft tumor model*. Cancer Res, 2009. **69**(9): p. 3971-8.
20. Zocchi, M.R. and A. Poggi, *Role of gammadelta T lymphocytes in tumor defense*. Front Biosci, 2004. **9**: p. 2588-604.
21. Kabelitz, D., D. Wesch, and W. He, *Perspectives of gammadelta T cells in tumor immunology*. Cancer Res, 2007. **67**(1): p. 5-8.
22. Goldman, J.P., et al., *Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor gamma chain*. Br J Haematol, 1998. **103**(2): p. 335-42.
23. Halary, F., et al., *Shared reactivity of V{delta}2(neg) {gamma}{delta} T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells*. J Exp Med, 2005. **201**(10): p. 1567-78.
24. Halene, S., et al., *Improved expression in hematopoietic and lymphoid cells in mice after transplantation of bone marrow transduced with a modified retroviral vector*. Blood, 1999. **94**(10): p. 3349-57.

25. Geronimi, F., et al., *Highly efficient lentiviral gene transfer in CD34+ and CD34+/38-/lin-cells from mobilized peripheral blood after cytokine prestimulation*. *Stem Cells*, 2003. **21**(4): p. 472-80.
26. Betts, M.R., et al., *Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation*. *J Immunol Methods*, 2003. **281**(1-2): p. 65-78.
27. Jenkins, D.E., et al., *Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis*. *Clin Exp Metastasis*, 2003. **20**(8): p. 733-44.
28. Price, J.E., et al., *Organ distribution of experimental metastases of a human colorectal carcinoma injected in nude mice*. *Clin Exp Metastasis*, 1989. **7**(1): p. 55-68.
29. Garofalo, A., et al., *Comparative study on the metastatic behavior of human tumors in nude, beige/nude/xid and severe combined immunodeficient mice*. *Invasion Metastasis*, 1993. **13**(2): p. 82-91.
30. Cespedes, M.V., et al., *Orthotopic microinjection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites*. *Am J Pathol*, 2007. **170**(3): p. 1077-85.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: ***In vitro* bioluminescence of the HT29 luc cell line and its sensitivity to V δ 1⁺ γ δ T cells.** (A) HT29 luc cells were diluted from 1000 to 25 cells and imaged for 5 min after addition of D-luciferin. Wells containing 1000 cells without luciferin (no luciferin) served as negative control. (B) Cytolytic activity of the V δ 1⁺ cell line on HT29 and HT29 luc cells measured using the CD107a flow cytometry assay. V δ 1⁺ cells activated with agonist anti-CD3 mAb served as positive control. The values represented are the mean percentages of positive cells \pm SD obtained from 3 different analyses.

Figure 2: **Local anti-tumor effects of V δ 1⁺ γ δ T cells *in vivo*** (A, B, D) Tumor growth in groups of 8 mice receiving subcutaneous injections of 1×10^5 HT29 luc cells in the absence (HT29 luc) or the presence of 10×10^6 V δ 1⁺ γ δ T cells (HT29+V δ 1 line). (A) Tumor size was calculated every 3-4 days for 24 days after volumetric caliper measurements and is expressed in cubic mm (B) Tumor growth was monitored concomitantly with BLI; bioluminescent emission is expressed in photons/s/steradian (ph/s/sr). Values are means \pm SD, (*, $P < 0.05$, **, $P < 0.005$). (C) Linear regression analysis between tumor size (cubic mm) and bioluminescent emission (ph/s/sr) in control mice ($R^2 = 0.91$). (D) Images of one representative mouse for each group (HT29 luc and HT29 luc+V δ 1 line) are shown from day 7 (D7) to day 24 (D24). Each of the images shown results from the compilation of 30 sec of maximal signal emission during the analysis of acquired data, owing comparison between the 2 groups of mice and over time.

Figure 3: **Intravenous injection of HT29 luc cells.** (A) Bioluminescent images from day 0 to day 43, of one representative immunodeficient mouse which received i.v injections of 1×10^6 HT29 luc cells at day 0. Same settings were applied for each mouse with a compilation of 100 sec of maximal signal emission. (B) Bioluminescent intensities from luminometric analysis of

livers, guts and lungs excised at day 43, from mice receiving i.v injections of 1×10^6 HT29 luc cells (HT29 luc i.v) or one healthy mouse (control). Results are from 3 different mice and values are shown as means $RLU \pm SD$ for each organ (*, $P < 0.05$).

Figure 4: Orthotopic microinjection of human colon cancer cells in mice and visualization of secondary tumor foci in lungs and liver. (A) View of the microsurgical procedure which consists in the subserous microinjection of 1×10^5 HT29 cells in the cecum of immunodeficient mice. (B) Photographs of caecum, lungs and liver from healthy (control) and tumor-bearing mouse. Organs were excised 2 month after orthotopic injections. (C) Histological examination of same organs. Human colon cancer cells are shown by black arrows. (D) Bioluminescent images of one representative mouse at various times post-orthotopic injection of 1×10^5 HT29 luc cells. (E) Bioluminescent intensities from luminometric analysis of liver, caecum and lungs from one healthy mouse (control) or tumor-bearing mice. Organs were excised at early (one week), middle (2-3 weeks) and late (end of experiment) times post-orthotopic inoculation of HT29 luc cells. Results are shown as means $RLU \pm SD$ from 5 tumor-bearing mice. The bioluminescent signals are significantly different between control and tumor bearing mice (*, $P < 0.05$).

Figure 5: Effect of continuous i.p injections of $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T cells on primary colon tumor growth in immunodeficient mice. (A, B) Primary colon tumor growth in mice receiving orthotopic injections of 1×10^5 HT29 luc cells and no treatment (Control mice) or continuous (3 times a week from day 0 to day 36) intraperitoneal (i.p) injections of 4×10^6 $V\delta 1^+$ lymphocytes ($\gamma\delta$ -treated mice). (A) Values represent the mean percentages of maximal tumor “sizes” for 7-10 mice as shown in Table 1 (*, $P < 0.05$). Clear squares represent individual untreated mice and dark circles represent individual $\gamma\delta$ -treated mice. (B) Primary tumor growth in same groups of untreated mice (clear boxes) or $\gamma\delta$ -treated mice (dark boxes) at day

7, day 20 and day 36 post-orthotopic implantation of HT29 luc cells. Percentages of maximal tumor “sizes” were estimated as described in table 1. Values are presented as median, 25th and 75th percentiles (respectively horizontal line, bottom and top of boxes), and 10th and 90th percentiles (bottom and top range bars) and minimum and maximum (black triangles) (*, $P < 0.05$).

Figure 6: ***In vivo* analysis of lungs and liver colonization in immunodeficient mice bearing HT29 luc intracaecal tumors.** (A, B) Bioluminescent images of primary tumors and metastases in mice injected orthotopically with 1×10^5 HT29 luc cells, and treated or not with continuous (3 times a week from day 0 to day 34) i.p. injections of $V\delta 1^+$ lymphocytes. (A) Images of one representative mouse for each group at day 7, day 15, day 25 and day 36 post-tumor implantation in the caecum. (B) Following necropsy at day 36, caecum, lungs and liver were excised and bioluminescent signals were analyzed by *ex vivo* imaging (imaging time of 5 minutes). The organs imaged in B were excised from the representative mice shown in A.

Table 1: **Estimation of primary HT 29 luc tumor “sizes” in immunodeficient mice treated or not with human $V\delta 1^+$ lymphocytes.** For each group of mice (untreated and $\gamma\delta$ -treated as described in Figure 5A), the bioluminescent signal emitted by the primary intracaecal tumor was analyzed and quantified at different times with the Photon Imager and associated software (see Material and Methods). For simplification, results were expressed and tabulated as percentages of maximal tumor “size” (light emission from primary tumor at day x / maximal tumor light emission). In our settings, 100% relies to a tumor which emitted 1.10^9 ph/s/sr ; 10% = 1.10^8 ph/s/sr; 1% = 1.10^7 ph/s/sr; 0.1% = 1.10^6 ph/s/sr; 0.01% = 1.10^5 ph/s/sr and 0 = 1.10^4 ph/s/sr = minimal signal detectable with the Photon Imager. Darkened cases and stars symbols represent apparition of distant metastases. Groups are made up of 7 to 10 mice. Results are from one representative experiment.

Table 2: Quantification of distant metastases in untreated and $\gamma\delta$ -treated HT29 luc-bearing mice. The development of HT29 luc tumors *in vivo* was followed by BLI at different times, in both control and $\gamma\delta$ -treated mice. The apparition of distant metastasis was noted and the percentages of mice with detectable metastases in lungs and/or liver areas were tabulated (number of mice with distant metastases/total number of mice in the group). Results are from one representative experiment.

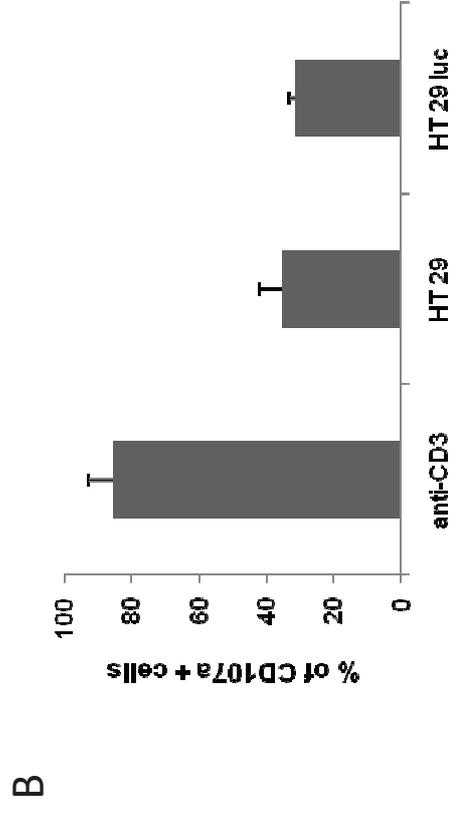
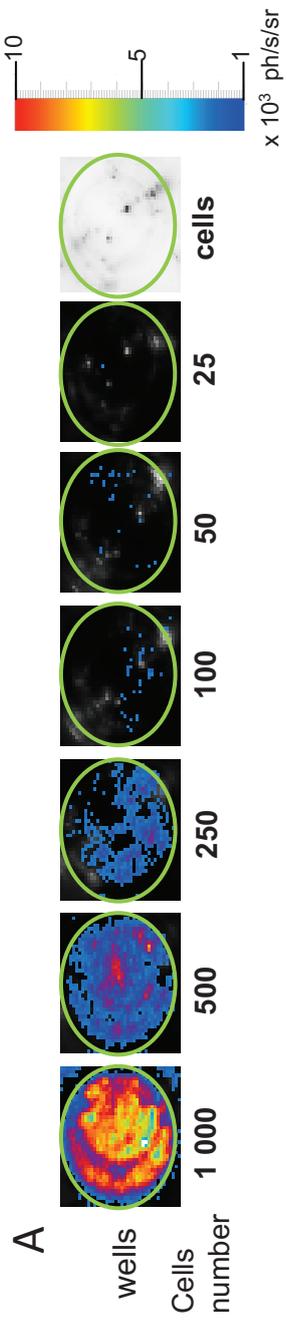


Figure 1

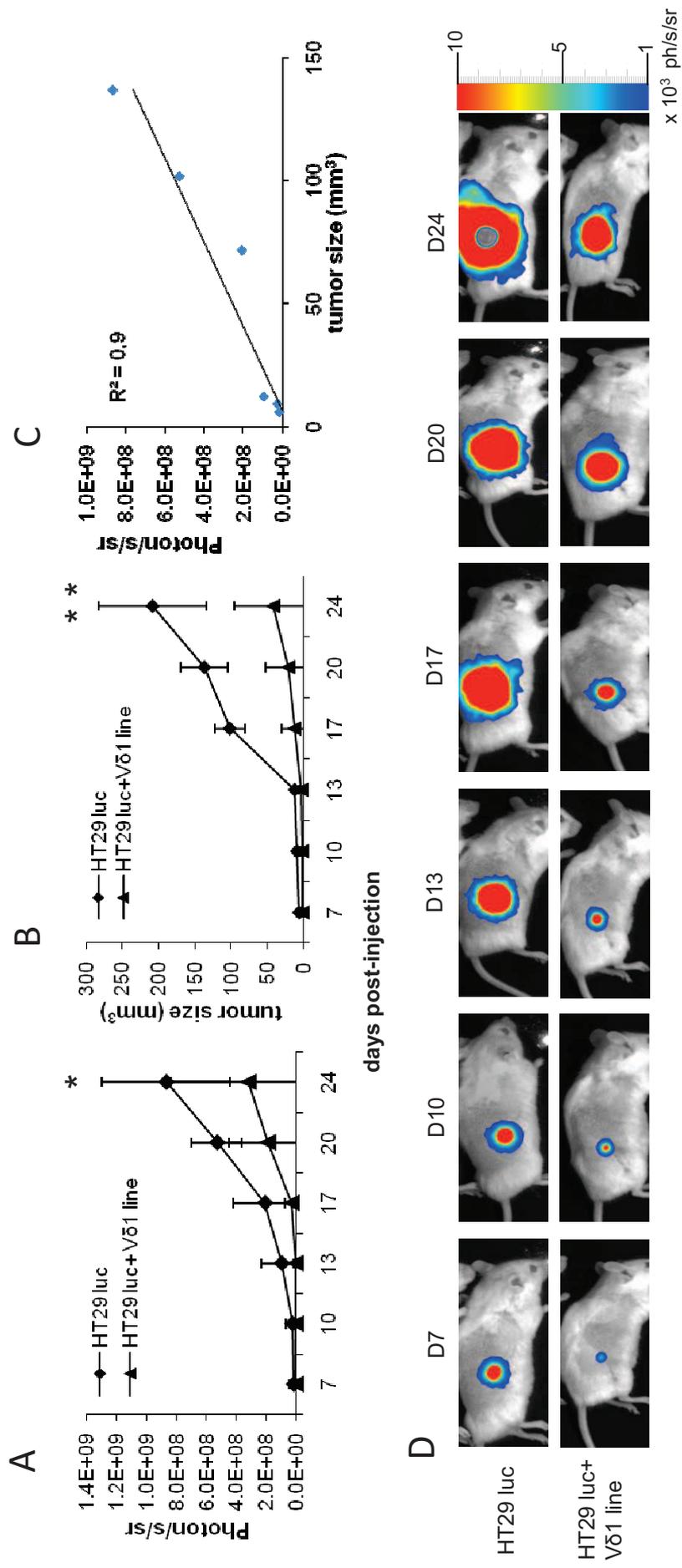


Figure 2

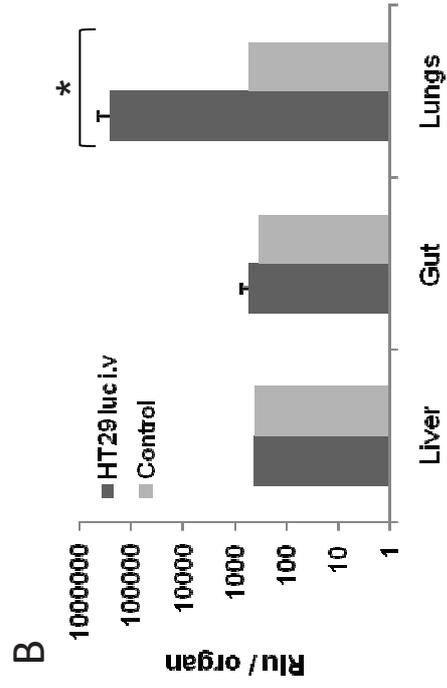
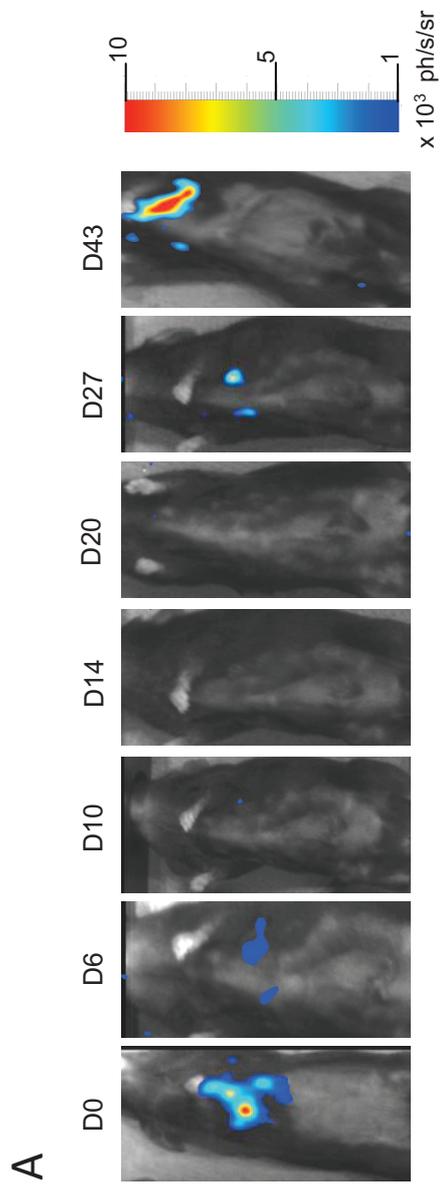


Figure 3

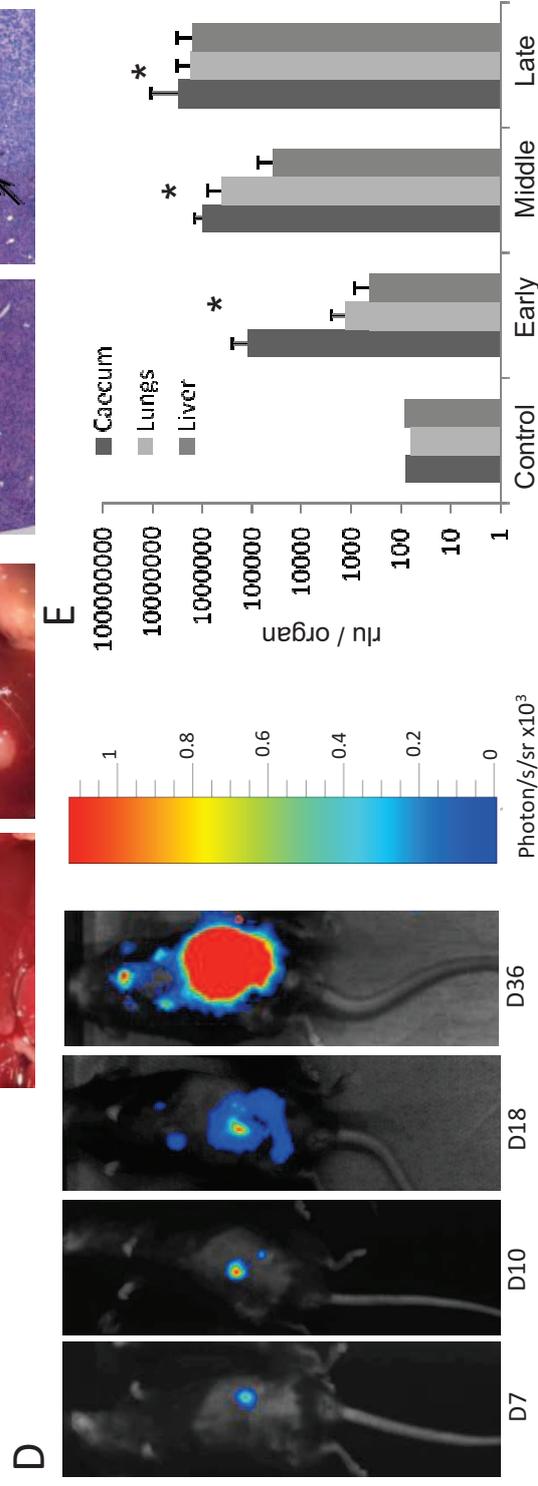
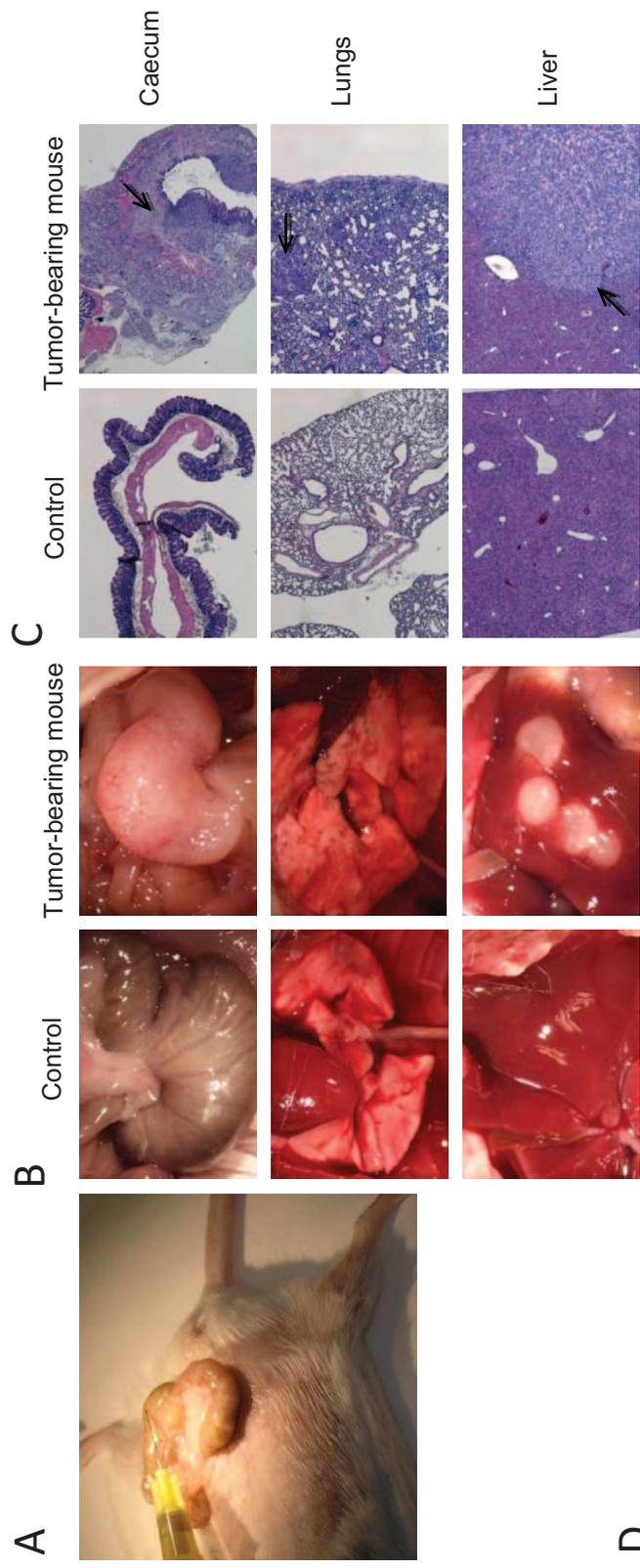
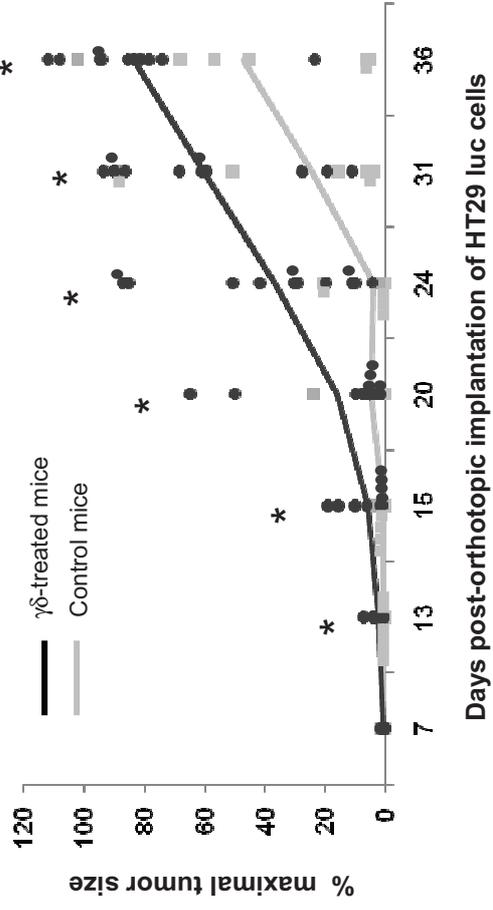


Figure 4

A



B

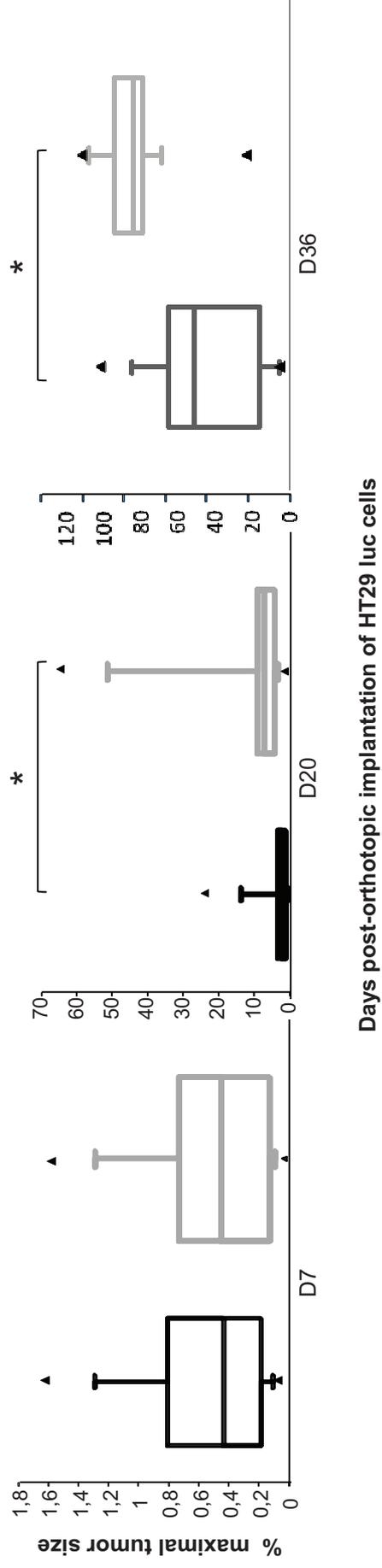


Figure 5

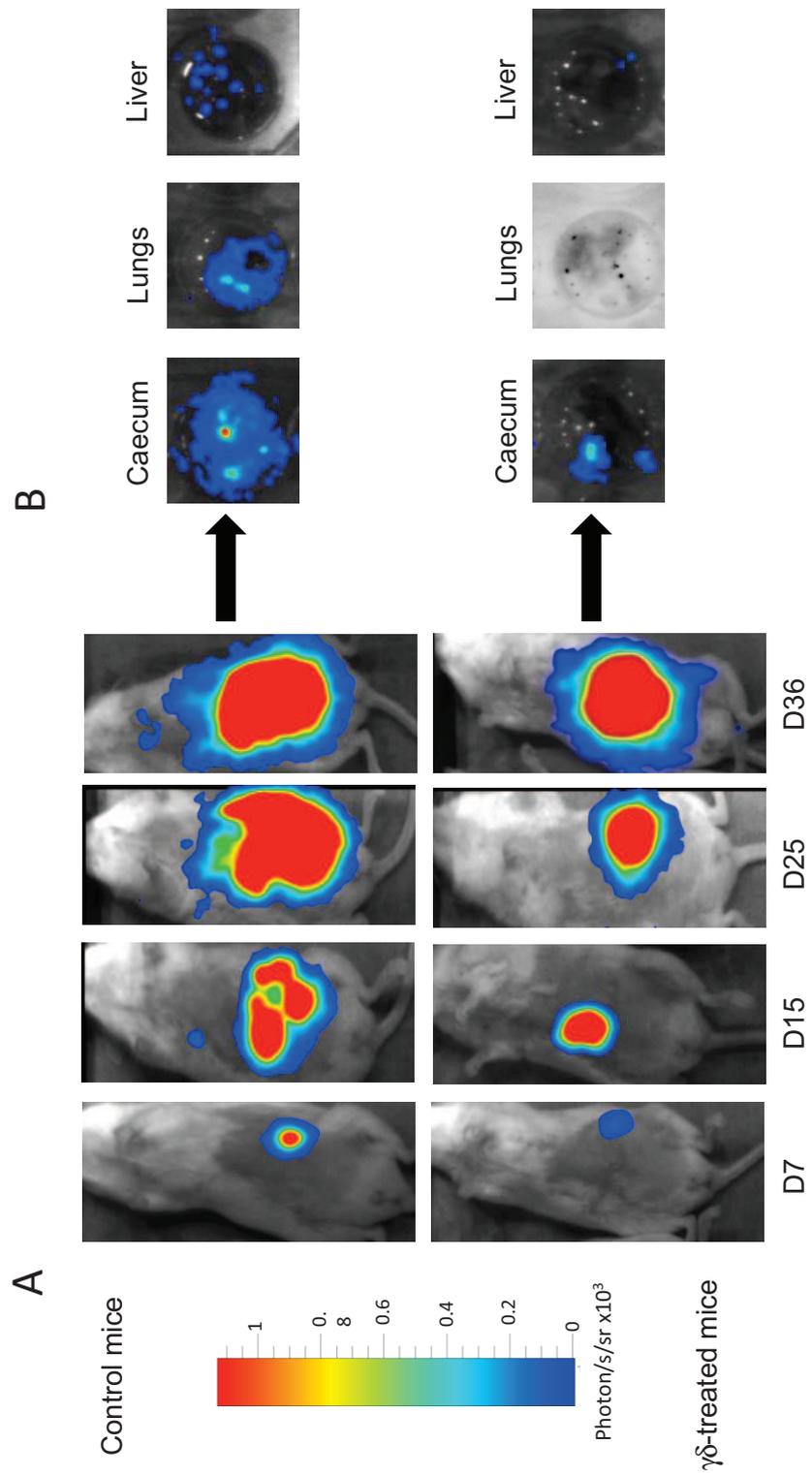


Figure 6

mice		d 7	d 13	d 15	d 20	d 24	d 31	d 36
γδ-treated mice	(1) Vδ1 line	0	0,06	0,02	0,02	0,8	2,6	dead
	(2) Vδ1 line	0,07	0,3	0,6	0,07	3,1	6,4*	6,46 *
	(3) Vδ1 line	1,62	0,3	0,3	1,4	1,7	15,6	68,1
	(4) Vδ1 line	0,9	0,01	0,01	3,7	1,2	4,7	45,2
	(5) Vδ1 line	0,07	0,8	0,2	1,3	20,6	50,6	56,8 *
	(6) Vδ1 line	0,4	0,7	0,4	3	0,1	4,1	5,34
	(7) Vδ1 line	0,4	1,54	3,1	24	1,8	88,9*	102 *
means	0,5	0,5	0,7	4,8	4,2	24,7	47,3	
Control mice	(1) Control	1,25	3,87	10	1,5	50,6	89,7*	94,1 *
	(2) Control	0,74	3	6*	5*	30,3*	68,5*	112 *
	(3) Control	0,4	4	1,2*	7,6*	19,7*	93,5*	83,4 *
	(4) Control	0,03	1,1	15,6	50*	87,1*	90,1*	74,1 *
	(5) Control	0,1	0,6	0,8	7*	29*	60,9*	81,2 *
	(6) Control	0,7	7,3	19	64,8*	85,2*	86,3*	108 *
	(7) Control	0,1	0,6	1,2*	7,8*	41,7*	59,5*	94,9 *
	(8) Control	0,2	2,5	1,5	4,2	4,2*	11,2*	23,4 *
	(9) Control	1,61	0,3	0,7	9,7	10*	19,3*	85,6 *
	(10) Control	0,5	1,4	1,3	3,8*	11*	27,5*	78,4 *
means	0,6	2,5	5,7	16,1	36,9	60,7	83,5	

Table 1

	D7-D13	D15	D20	D24	D31	D36
γδ- treated mice	0% (0/7)	0% (0/7)	0% (0/7)	0% (0/7)	28% (2/7)	42% (3/7)
Control mice	0% (0/10)	30% (3/10)	70% (7/10)	90% (0/10)	100% (10/10)	100% (10/10)

Table 2

Conclusion et Discussion de l'article 2

La localisation préférentielle des sous-populations T $\gamma\delta$ V δ 1⁺ au niveau des épithéliums intestinaux et de la peau (Janeway, Jones et al. 1988; Triebel and Hercend 1989) en fait des candidats privilégiés dans l'immunosurveillance des cancers épithéliaux et notamment des cancers colorectaux. Par ailleurs, la létalité d'un cancer est due à la colonisation de différents organes à partir de la tumeur primaire. Dans cette seconde partie de mon projet de thèse, nos objectifs étaient d'étudier l'effet des lymphocytes T V δ 1⁺ sur des tumeurs primaires d'origine colique et sur leurs métastases. Pour cela, nous avons mis en place un modèle de xénogreffe orthotopique de tumeurs coliques humaines dont la croissance et la progression ont été suivies à l'aide d'une technique d'imagerie en bioluminescence (BLI).

Au cours de ma thèse, la majorité du temps consacré à ce projet portait sur la mise en place i) du modèle de cancer colorectal ii) d'une technique d'imagerie en BLI permettant de suivre la croissance tumorale et la progression du cancer. Ces outils n'avaient encore jamais été développés au laboratoire, ni par les équipes de recherches Bordelaises. De plus, des problèmes de contaminations des souris au sein des animaleries dont nous n'étions pas responsables ont malheureusement retardé le projet.

Nos résultats montrent cependant que des lignées T V δ 1⁺ ont un potentiel anti-tumoral *in vivo* vis-à-vis 1) de tumeurs primaires développées dans un environnement orthotopique ainsi que 2) des métastases issues de ces tumeurs primaires. Nous allons donc d'abord discuter le développement du modèle puis nous reviendrons sur l'étude du potentiel anti-tumoral des lymphocytes T V δ 1⁺.

La mise en place du modèle :

L'utilisation de la BLI

Afin d'utiliser la technique de BLI pour observer les tumeurs dans des souris vivantes, nous avons généré des lignées de cellules tumorales coliques humaines HT29 exprimant la luciférase. Suite à des transductions lentivirales, notre lignée HT29 exprime de manière stable la luciférase (HT29 luc) sans nécessité d'aucune pression de sélection. En effet, le signal de bioluminescence émis par la lignée ne varie pas même après plusieurs mois de culture *in vitro*.

Dans un premier temps, nous avons démontré que la lignée V δ 1⁺ pouvait inhiber le développement d'une tumeur solide sous-cutanée (s.c) en utilisant le modèle classique s.c de Winn HJ (Winn 1960). Des cellules HT29 luc ayant été implantées, les tumeurs solides se développant sous la peau des souris sont bioluminescentes. Nous avons donc pu visualiser la croissance tumorale par une augmentation de la quantité de photons émise au cours du temps, que nous avons pu corrélérer avec une augmentation concomitante du volume tumoral. Ces données nous ont permis de valider l'utilisation de cette lignée HT29 luc *in vivo* et de la technique d'imagerie BLI pour suivre quantitativement la croissance des tumeurs solides. On peut noter, comme d'autres équipes l'ont déjà suggéré (Rehemtulla, Stegman et al. 2000; Jenkins, Oei et al. 2003), que la BLI présente l'avantage de refléter plus le nombre de cellules tumorales métaboliquement actives qu'un volume de masse tumorale. En effet, le volume d'une tumeur, mesuré au pied à coulisse, comprend les cellules tumorales vivantes et mortes mais aussi les débris cellulaires et les cellules de l'hôte infiltrant la tumeur alors que l'imagerie en BLI ne visualise que les cellules tumorales vivantes. La technique de BLI nous permet ainsi d'obtenir des informations sur « l'état d'une tumeur » en s.c mais aussi en profondeur, témoignant de l'efficacité d'un traitement, comme l'injection de lymphocytes T V δ 1⁺.

Les xénogreffes orthotopiques :

Le but de notre étude étant d'étudier le potentiel anti-tumoral mais aussi anti-métastatique de cellules T V δ 1⁺ nous avons développé un modèle de métastases spontanées, échappées d'une tumeur primaire.

Certaines équipes ont pu détecter des métastases ganglionnaires ou pulmonaires suite à des implantations de cellules HT29 en s.c (Schumacher, Adam et al. 1994; Mitchell, Horny et al. 1997). Les cellules HT29 dont disposaient ces équipes possédaient peut-être des caractéristiques différentes de notre lignée. De plus, les expériences étaient réalisées dans des souris immunodéficientes différentes et les quantités de cellules HT29 implantées en s.c étaient largement supérieures (10 à 30 fois plus) aux quantités utilisées dans nos expériences. En accord avec les résultats de De Both et al, nous n'avons jamais observé de métastases à partir d'une tumeur en s.c. au cours de nos expériences (de Both, Vermey et al. 1999).

Nous avons donc implanté les cellules HT29 d'origine colique en orthotopique, au niveau de caecum, dans un environnement cellulaire proche de leur environnement d'origine. Nous observons des tumeurs primaires solides se développant au niveau du caecum dont la capacité invasive des différentes couches du tissu intestinal murin a récemment été mise en évidence (Gao, Sun et al. 2009). De plus, nos observations histologiques et par imagerie en BLI (une technique validée par ailleurs pour détecter de manière sensible l'apparition de métastases (Adams, Johnson et al. 2002)), démontrent l'existence de foyers secondaires tumoraux spécifiquement issus des tumeurs primaires intra-caecales. Ces foyers sont situés au niveau du foie et des poumons, principaux organes touchés lors de cancer colorectaux, mais aussi de plusieurs autres organes comme l'estomac, les reins et la rate (non montré).

Il est intéressant de noter que dans les rares études où des cellules HT29 (non bioluminescentes) ont été implantées en orthotopique, seules les métastases au niveau des ganglions lymphatiques mésentériques, proches de la tumeur primaire caecale, étaient observées à l'œil nu après dissection (Yokoi, Thaker et al. 2005; Miyake, Shimada et al. 2009). Dans nos expériences, lors du suivi par imagerie BLI des souris implantées en intra-caecal avec des HT29 luc, nous avons pu distinguer des points de bioluminescence proches du signal bioluminescent de la tumeur caecale primaire (figure 4D), qui pourraient représenter les ganglions mésentériques. Cependant, les ganglions étant atrophiés chez une souris immunodéficiente, il était difficile de les isoler de manière certaine lors des dissections. De plus, en imagerie BLI, il est probable qu'un potentiel signal provenant des ganglions mésentériques, ne soit difficile à discriminer car masqué par le signal important venant de la tumeur primaire caecale. Pour éviter toute confusion, nous avons choisi de nous centrer sur l'apparition de métastases au niveau du foie et des poumons, à distance du site primaire.

En conclusion, le suivi quantitatif de la croissance d'une tumeur caecale ainsi que de l'apparition des métastases hépatiques et pulmonaires tel que nous l'avons réalisé reste, à notre connaissance, une nouveauté. Ce modèle de suivi par BLI nous permet d'obtenir plusieurs points sur le développement de tumeurs profondes de plusieurs souris de groupes différents en parallèle, sans nécessité de sacrifice. De plus, le modèle mime l'évolution d'un cancer colique chez l'homme avec l'apparition des métastases à distance essentiellement hépatiques et pulmonaires en stade avancé de la maladie (Hess, Varadhachary et al. 2006; Schluter, Gassmann et al. 2006). Nous ne l'avons pas directement montré mais on peut supposer que les cellules métastatiques atteignent les organes cibles *via* la circulation lymphatique et sanguine (Gout and Huot 2008).

Utilisation du modèle pour tester le potentiel anti-tumoral de lymphocytes T V δ 1⁺ humains.

Très peu d'études s'intéressent spécifiquement à l'effet anti-tumoral des sous-populations T V δ 1⁺ *in vivo* dans un modèle animal. On peut citer l'étude de Lozupone et al où le potentiel des lymphocytes T V δ 1⁺ contre des tumeurs solides humaines a déjà été rapporté dans un modèle murin SCID vis-à-vis de lignées de mélanomes implantées en s.c (Lozupone, Pende et al. 2004). A notre connaissance, il semblerait que notre étude soit la première à s'intéresser au potentiel anti-tumoral des sous-populations T V δ 1⁺ vis-à-vis de tumeurs d'origine colique en particulier dans un modèle murin d'implantation orthotopique. L'effet anti-tumoral des lymphocytes T V δ 1⁺ est observé, grâce à ce modèle, dans leur environnement de prédilection au niveau des muqueuses épithéliales.

La technique sensible de BLI est utilisée pour suivre quantitativement l'effet du traitement des lymphocytes T V δ 1⁺ au niveau du site primaire. Dans une étude très récente, Yuasa T et al utilisent cette technique de BLI pour observer l'effet de lymphocytes T $\gamma\delta$ (V δ 2⁺), sur des tumeurs de lignée humaines de vessie implantées en orthotopique dans des souris SCID (Yuasa, Sato et al. 2009). Ils peuvent observer la disparition du signal bioluminescent 21 jours après l'implantation des tumeurs, quand les souris sont traitées par des injections locales de lymphocytes T $\gamma\delta$. Dans notre modèle, les souris sont traitées par des injections systémiques de lymphocytes T $\gamma\delta$ V δ 1⁺ en i.p. Nous n'observons pas de disparition totale du signal bioluminescent mais une inhibition de la croissance tumorale au niveau du caecum dans les souris traitées par rapport aux souris non traitées (figure 5A). Ces résultats supportent l'idée que les lymphocytes T V δ 1⁺ auraient un potentiel d'action sur la tumeur primaire lors d'un cancer colique. Ils corroborent notamment des études montrant par exemple que parmi les lymphocytes T $\gamma\delta$, les sous-populations T V δ 1⁺ infiltrent majoritairement les cancers coliques (Maeurer, Martin et al. 1996).

La différence de signal émis par les tumeurs caecales primaires du groupe traité par la lignée V δ 1 et non traité ne semble pas être significative à la première mesure (jour 7 figure 5B). On peut supposer qu'il s'agit d'une limite de la quantification par la technique d'imagerie BLI qui ne permettrait pas de discriminer des différences faibles entre deux signaux. Au cours du temps au fur et à mesure que les tumeurs grossissent, l'écart entre les signaux des groupes traités ou non se creuse et devient significatif.

Comme nous l'avons proposé pour la première partie de mon projet, les pentes parallèles des courbes de développement tumoral des groupes murins traités et non-traités pourraient souligner un effet précoce des lymphocytes T V δ 1 qui élimineraient initialement une partie des cellules tumorales, induisant par la suite un retard de développement tumoral. Par ailleurs, dans ce modèle, le traitement étant effectué en continu, nous pouvons exclure l'hypothèse d'un maintien bref des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans la souris. Il nous reste encore à reproduire ce résultat mais il semblerait que, les lymphocytes T V δ 1⁺ agissent précocement sur la tumeur primaire, au moment de sa formation.

Nos résultats montrent que des injections de lymphocytes T V δ 1⁺ en continu, retardent l'apparition de métastases hépatiques et pulmonaires dans les souris possédant des tumeurs coliques. Le potentiel cytotoxique avéré de la lignée T V δ 1⁺ *in vitro* vis-à-vis des cellules HT29 luc (figure 1B) nous laisse penser qu'il existerait une action directe des lymphocytes T V δ 1⁺ sur les cellules tumorales, comme nous l'avons montré avec le clone T $\gamma\delta$ V δ 5⁺ lors de notre première étude (article 1). Ainsi, on peut envisager une action cytotoxique des lymphocytes T V δ 1⁺ sur les cellules tumorales métastatiques juste avant leur passage dans la circulation au niveau du site primaire ainsi que sur les sites d'implantation au niveau hépatique et pulmonaire. Il nous reste encore à tester cette hypothèse qui ne semble pas déjà avoir été démontrée pour les lymphocytes T $\gamma\delta$.

Les lymphocytes T V δ 1⁺ pourraient également agir sur le stroma tumoral de manière à atténuer l'échappement des cellules tumorales. Ils pourraient par exemple sécréter des facteurs anti-angiogéniques comme l'IP10 (Arenberg, Kunkel et al. 1996) et réduire ainsi la progression tumorale.

Enfin, le retard de l'apparition des métastases observé pourrait être une conséquence de l'action inhibitrice des lymphocytes T V δ 1⁺ sur la tumeur primaire. L'apparition des métastases dans les souris semble corrélée avec la taille de la tumeur primaire (non montré) comme l'ont déjà suggéré Jojovic et al qui ont corrélé le nombre de métastases pulmonaires et le poids de tumeurs primaires HT29 sous-cutanées dans des souris SCID (Jojovic and Schumacher 2000). De façon intéressante, il semble que pour des tumeurs primaires de tailles comparables nous n'observons pas de métastases chez les souris traitées par les injections de lignée T V δ 1⁺ alors que nous en observons chez les souris non traitées. Cette tendance observée sur deux expériences indépendantes conforte l'idée d'une action potentielle des lymphocytes T V δ 1⁺ directement sur les cellules métastatiques.

Les résultats de notre étude nous permettent de proposer un rôle protecteur des sous-populations T V δ 1⁺ contre la dissémination des cellules tumorales à partir d'une tumeur colique. Ce rôle protecteur « contre » les métastases, avait déjà été proposé dans des modèles murins pour d'autres éléments du système immunitaire inné comme les cellules NKT (Takeda, Seki et al. 1996) ou encore les cellules NK (Smyth, Thia et al. 1999), mais semble encore méconnu concernant les lymphocytes T $\gamma\delta$.

Les travaux de l'équipe de Pages F ont appuyé, chez des patients atteints de cancer colorectaux, l'importance du système immunitaire dans le contrôle des événements précoces initiant la colonisation d'organes par les cellules tumorales (Pages, Berger et al. 2005). Le système immunitaire serait un élément crucial limitant le nombre de cellules s'échappant de la tumeur primaire et passant dans la circulation. Ainsi nos recherches présentent un intérêt certain puisque les lymphocytes T $\gamma\delta$, en tant qu'effecteurs précoces de la réponse anti-tumorale, pourraient faire partie des acteurs immunitaires de la prévention de la progression tumorale. Nos résultats pourraient conforter le potentiel et la relevance de l'utilisation de cellules T $\gamma\delta$ dans les protocoles d'immunothérapies de cancers métastatiques. Une étude clinique récente encourageante rapporte un cas de régression de métastases pulmonaires et osseuses chez un patient traité avec du zolédronate, stimulant les lymphocytes T V δ 2⁺, en combinaison avec de la radiothérapie (Laggner, Lopez et al. 2009). Il n'existe pas d'essai clinique utilisant les lymphocytes T V δ 1⁺ à l'heure actuelle. Cependant, la localisation préférentielle au niveau épithélial des lymphocytes T V δ 1⁺ ainsi que leur potentiel anti-tumoral en font des candidats idéaux dans la mise en place de nouvelles thérapies ciblant notamment les cancers colorectaux métastatiques. Il reste cependant une étape non négligeable d'identification précise des ligands de ces lymphocytes T V δ 1⁺ sur laquelle plusieurs équipes, dont l'équipe de Julie Déchanet Merville, travaillent.

Perspectives sur ce projet

L'article sur cette 2^{ème} partie de mon projet de thèse est en préparation et il reste encore quelques questions auxquelles nous essaierons de répondre pour compléter notre étude.

*Il sera intéressant d'étudier les mécanismes d'action anti-tumorale mis en jeu par la lignée T Vδ1⁺ sous l'effet d'une activation par les cellules tumorales coliques (HT29). Des expériences *in vitro*, déjà réalisées au laboratoire lors de l'étude des clones T Vδ2^{neg} réactifs contre le CMV (Halary, Pitard et al. 2005) pourraient illustrer un mode d'action dépendant des voies perforines/granzymes comme pour des lymphocytes T Vδ1⁺ humains issus de la peau de l'étude de Ebert et al (Ebert, Meuter et al. 2006). Nous pourrions tester si les voies Fas/FasL, les molécules TRAIL et la sécrétion de diverses cytokines comme l'IFN-γ et le TNFα pourraient également intervenir dans le mécanisme d'action des lymphocytes T Vδ1⁺.*

Il nous reste à tester si l'effet anti-tumoral observé sur les tumeurs primaires intra-caecales et leurs métastases est bien dû à une action cytotoxique spécifique des cellules exprimant un TCR Vδ1⁺. Des mécanismes indépendants de la reconnaissance spécifique des cellules tumorales par le TCR Vδ1 pourraient être à l'origine de l'inhibition du développement tumoral. En effet, des cellules murines du microenvironnement tumoral pourraient contribuer à cet effet anti-tumoral observé par exemple en sécrétant des facteurs inhibiteurs pouvant fixer des récepteurs humains sur les cellules tumorales.

Nous avons réalisé une première expérience contrôle en traitant les souris avec des lymphocytes T Vδ2⁺. Nos observations par imagerie BLI montrent qu'une lignée T Vδ2⁺ injectée en i.p, 3 fois par semaine tout au long de l'expérience (36 jours), semble avoir un effet anti-tumoral *in vivo* équivalent aux lymphocytes T Vδ2^{neg}. Les cellules T Vδ2⁺ semblent retarder non seulement la croissance de la tumeur intra-caecale mais aussi l'apparition des métastases par rapport à des souris contrôles non traitées. Même si nous avons vérifié *in vitro* que contrairement aux cellules T Vδ2^{neg}, les cellules T Vδ2⁺ ne semblent pas dégranuler (i.e. relarguer de molécules cytotoxiques) au contact de cellules HT29 luc (4% des cellules T Vδ2⁺ sont positives CD107a membranaire par rapport à 30% des cellules T Vδ2^{neg}) nous n'avons pas directement montré qu'elles ne sont pas capables de lyser les cellules HT29 luc.

Pour l'instant, nous n'avons pas d'explication définitive sur cet effet des lymphocytes T Vδ2⁺ d'autant plus que nous ne l'avons pas observé dans la première partie du projet de thèse (article 1) sur les tumeurs HT29 implantées en s.c. Cependant, on peut noter qu'il est connu que les cellules tumorales d'origine colique n'ont pas la même sensibilité aux traitements en fonction de leur site d'implantation. Par exemple, des cellules de lignées de carcinomes coliques murins CT-26 implantées en sous-cutané sont plus sensibles à la doxorubicine que quand elles sont implantées au niveau du caecum probablement sous l'effet du microenvironnement tumoral qui perturberait des voies de signalisations (Wilmanns, Fan et al. 1992). Il est possible qu'une fois implantées en orthotopique *in vivo*, les cellules HT29 luc deviennent sensibles à la lyse par les cellules T Vδ2⁺. Des signaux du microenvironnement tumoral au niveau du colon pourraient moduler l'expression de certains gènes qui rendraient *in vivo* les cellules HT29 luc phénotypiquement différentes d'*in vitro* et sensibles aux cellules T Vδ2⁺. Il est possible aussi d'imaginer que la reconnaissance des tumeurs intra-caecales HT29 par les cellules T γδ passe uniquement par un signal TCR-indépendant (comme NKG2D) reconnaissant des ligands de stress. Dans ce cas, si ces ligands de stress sont surexprimés *in vivo*, cela pourrait expliquer la réactivité de lymphocytes T Vδ2⁺.

Une expérience contrôle convaincante de l'implication du TCR V δ 1 consisterait à injecter dans les souris, des cellules T V δ 1⁺ dont le TCR aurait été éliminé et n'observer aucun effet sur la progression des tumeurs HT29 luc. L'expression du TCR pourrait être supprimée des lignées T V δ 1⁺ (par exemple avec une technologie de RNA interférence). Elle pourrait être aussi down-réglée transitoirement suite à la fixation l'aide d'un anticorps anti-TCR comme dans l'étude de Beck et al qui ont de cette manière provoqué l'internalisation du TCR de lymphocytes T $\gamma\delta$ murins avant leur transfert adoptif dans la souris (Beck, Kim et al. 2009). L'utilisation d'une lignée exprimant un TCR différent (comme une lignée T $\alpha\beta$ par exemple), non réactive vis-à-vis des cellules tumorales HT29 luc pourrait être aussi envisagée. Enfin, on peut imaginer bloquer les ligands des TCR V δ 1 au niveau des cellules tumorales (à l'aide d'anticorps par exemple) une fois que ceux-ci auront été identifiés.

Conclusion
générale
Discussion

CONCLUSION GENERALE

Mon projet de thèse consistait en une étude fondamentale du potentiel anti-tumoral *in vivo* de lymphocytes T V δ 2^{neg} humains et plus particulièrement de leur réactivité vis-à-vis de cellules tumorales humaines d'origine colique dans un modèle murin de xéno greffe. Nous avons démontré que ces lymphocytes T V δ 2^{neg} ont la capacité d'inhiber le développement de tumeurs solides primaires développées aussi bien en ectopique (en s.c) qu'en orthotopique mais aussi de retarder le développement des métastases issues de ces tumeurs. **L'ensemble de nos résultats peut être résumé dans un modèle hypothétique de la réponse anti-tumeur colique par les lymphocytes T V δ 2^{neg} *in vivo* (figure 23).**

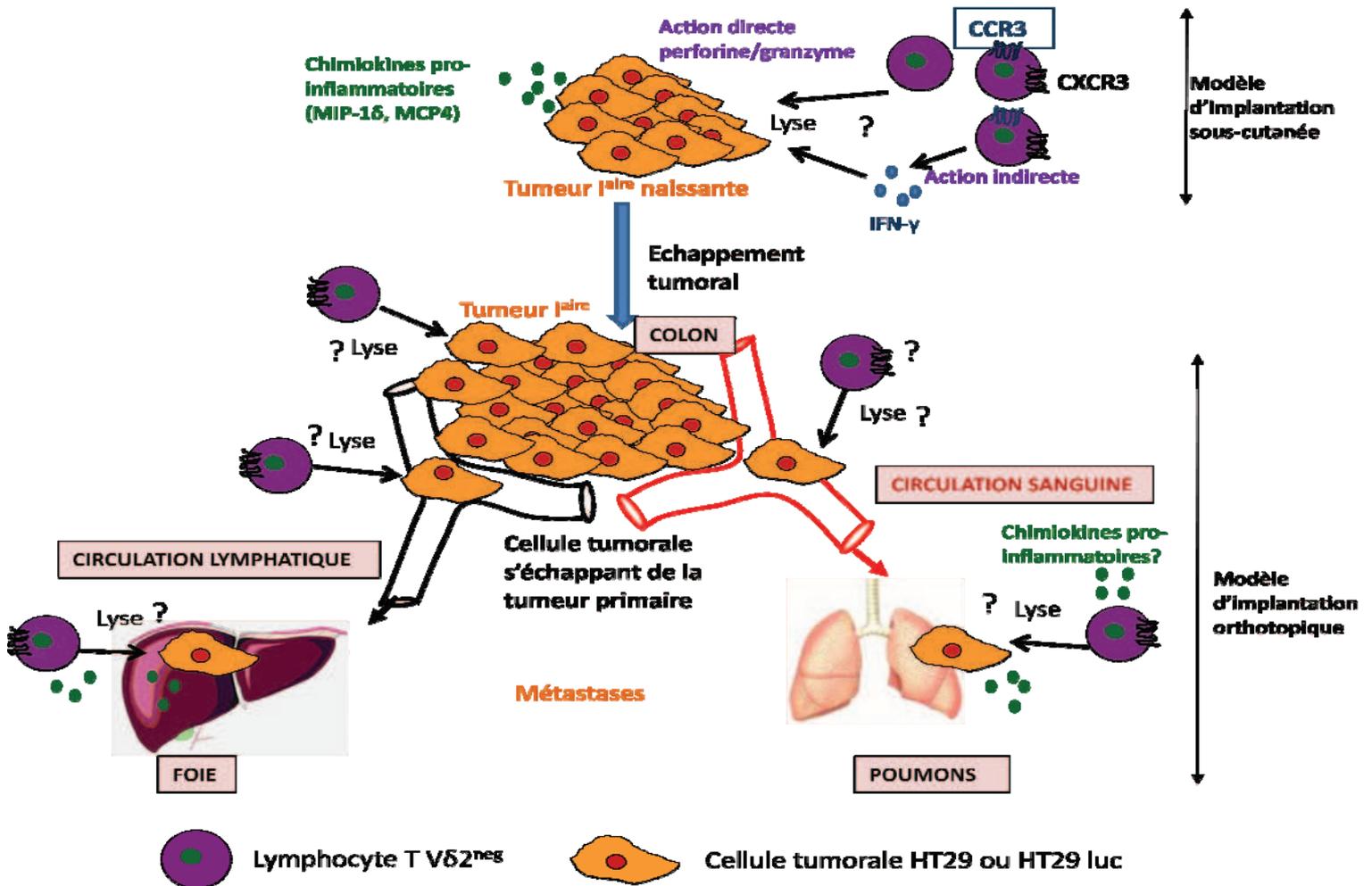


Figure 23 : Modèle de l'action des lymphocytes TV δ 2^{neg} sur des tumeurs coliques primaires et leurs métastases.

La figure 23 représente le modèle d'implantation sous-cutanée de la première partie de mon projet (article 1) et le modèle d'implantation orthotopique de la seconde partie (article 2) dans les souris immunodéficientes. Dans la première partie de l'étude nous nous sommes intéressés au potentiel anti-tumoral *in vivo* de lymphocytes V δ 2^{neg} (V δ 5⁺), réactifs contre le CMV. Nous avons montré que des clones T $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} expriment en majorité les récepteurs CCR3 et CXCR3. Ces lymphocytes T V δ 2^{neg} auraient la capacité, grâce notamment au récepteur CCR3, d'atteindre des tumeurs sous cutanées de cellules d'origine colique, sécrétant des chimiokines pro-inflammatoires. Une fois sur le site tumoral, les lymphocytes T V δ 2^{neg}

inhiberaient rapidement le développement des tumeurs naissantes probablement par une lyse précoce des cellules tumorales. Les mécanismes mis en jeu dans cette lyse restent à préciser et pourraient notamment faire intervenir les voies perforine/granzyme ou encore la sécrétion de cytokines comme l'IFN γ . Nos données sur cette partie suggèrent donc que **des cellules T V δ 2^{neg}, possédant un potentiel anti-viral, ont la capacité de migrer jusqu'à un site tumoral *in vivo* et d'inhiber le développement de tumeurs solides d'origine colique.** Dans la seconde partie du projet, nous avons étudié le potentiel anti-tumoral de lymphocytes T V δ 1⁺ sur la progression de tumeurs d'origine colique implantées en orthotopique, qui évoluent vers un stade avancé de cancer métastatique et qu'on pourrait considérer comme mimant l'échappement tumoral. **Nous montrons que les lymphocytes T V δ 1⁺ seraient capables d'avoir une action inhibitrice sur la tumeur primaire et sur ces métastases.** Il nous reste encore à montrer s'ils sont capables d'agir directement sur les cellules tumorales au moment où elles s'échappent dans la circulation sanguine ou lymphatique ou au moment où elles vont s'implanter dans leurs sites métastatiques comme les poumons et le foie. De même on peut imaginer que les lymphocytes T V δ 1⁺ expriment des récepteurs à chimiokines qui leur permettraient un homing vers des sites d'intérêt où sont sécrétées les chimiokines de type pro-inflammatoire. Enfin, on peut imaginer qu'il existe dans cette migration une boucle d'amplification dans laquelle les lymphocytes T V δ 1⁺ pourraient sécréter des chimiokines. **Nos données supportent l'idée que les lymphocytes T V δ 2^{neg} pourraient être impliqués dans le contrôle des cancers colorectaux métastatiques.**

PERSPECTIVES

Dans la continuité de la deuxième partie de mon projet de thèse, un certain nombre de questions peuvent être posées.

Si comme nous le suggérons, les cellules TV δ 1⁺ ont spécifiquement un potentiel anti-métastatique, il serait intéressant de se demander pourquoi des métastases se développent quand même en fin d'expérience (à jour 36) dans des souris malgré le traitement continu par les injections i.p de cellules T V δ 1⁺ (article 2)?

Le ratio cellules effectrices T V δ 1⁺/cellules tumorales cibles s'échappant de la tumeur primaire d'une certaine taille pourrait être devenu favorable aux cellules tumorales.

Par ailleurs, il est connu que les cellules tumorales seraient capables de développer des mécanismes de résistances au système immunitaire (Crocì, Zacarias Fluck et al. 2007). Nous avons déjà vérifié *in vitro* que les lignées T V δ 1⁺ dégranulent (lors de tests CD107a) en présence de lignées tumorales générées à partir des métastases pulmonaires spontanées HT29 luc (non montré). Il reste encore à prouver que cette dégranulation des lignées T V δ 1⁺ traduit bien une destruction des cellules tumorales métastatiques *in vitro* (par des tests de cytotoxicité au chrome par exemple).

Enfin, même si apparemment *in vitro*, on retrouve une sensibilité à la lyse par la lignée T V δ 1⁺ équivalente entre les cellules HT29 luc de la lignée primaire et celles issues de métastases, nous ne pouvons pas exclure qu'un mécanisme de résistance ait été mis en place *in vivo*. Par exemple, les cellules tumorales qui forment des métastases pourraient exprimer *in vivo* des molécules comme CD80 (ligand du CTLA4) (Leach, Krummel et al. 1996), PD-L1 (Zha, Blank et al. 2004) ou encore produire de l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) (Munn and Mellor 2007) qui pourraient inhiber les fonctions des lymphocytes T V δ 1⁺. L'expression de ces molécules au niveau des cellules tumorales métastatiques de même que l'expression de

leurs ligands sur la lignée T V δ 1⁺ pourraient être testées. On peut aussi imaginer que des cytokines immunosuppressives comme TGF- β ou l'IL-10 soient produites par le microenvironnement tumoral murin ou par les cellules tumorales elles même (Kruger-Krasagakes, Krasagakis et al. 1994). Si elles fixent des récepteurs humains sur les cellules T $\gamma\delta$, ces cytokines pourraient empêcher la lyse des cellules tumorales humaines.

Il sera intéressant d'évaluer i) le site d'action des cellules T V δ 1⁺ et ii) le moment où ces cellules agissent; au niveau du site primaire quand les cellules tumorales s'échappent de la tumeur primaire et passent dans la circulation et/ou au niveau des sites secondaires quand les cellules tumorales circulantes vont s'implanter et former des métastases (figure 23).

Les lymphocytes T V δ 2^{neg} pourraient posséder des propriétés de *homing* naturelles vers les poumons et le foie et/ou se localiser dans ces organes seulement après la sécrétion de chimiokines par les métastases. Une étude du profil des récepteurs à chimiokines sur la lignée T V δ 1⁺ pourrait être réalisée (figure 23). De même, la sécrétion de chimiokines par la lignée T V δ 1⁺ activée par les cellules tumorales pourrait être analysée par des marquages intracytoplasmiques en cytométrie ou encore des dosages dans les surnageants de culture. Les cellules T V δ 1⁺ pourraient sécréter des chimiokines pro-inflammatoires (comme MIP-1 α et β ou RANTES) (Boismenu, Feng et al. 1996) au niveau du site tumoral dans la souris et provoquer le recrutement de d'avantage de lymphocytes T $\gamma\delta$.

Par ailleurs, la localisation des lymphocytes T $\gamma\delta$ directement dans les souris vivantes pourrait être effectuée comme l'ont fait par exemple, récemment, Beck et al qui ont détecté des lymphocytes T $\gamma\delta$ murins marqués radioactivement dans des souris, au niveau de tumeurs murines d'origine mammaire implantées en s.c (Beck, Kim et al. 2009). La technique d'imagerie par BLI n'a pas encore été utilisée pour suivre spécifiquement des lymphocytes T $\gamma\delta$ humains dans des souris, cependant, des études montrent que sa sensibilité serait suffisante pour détecter *in vivo* des lymphocytes T (Nguyen, Zeiser et al. 2007; Wohler, Smith et al. 2009).

Récemment nous avons transduit des cellules de la lignée T V δ 1⁺ avec le lentivirus contenant le gène de la luciférase (utilisé pour transduire les cellules HT29). Ces cellules ont été transduites en parallèle avec le lentivirus contenant le gène GFP et nous obtenons environ 30% de cellules positives. Nous avons injecté 9x10⁶ cellules T V δ 1⁺ luc⁺ en i.p dans une souris RAG^{-/-} / γ (c) ^{-/-} implantée avec des HT29 (luc⁻) en intra-caecal depuis 41 jours et possédant probablement des métastases dans plusieurs organes. En imagerie BLI, nous observons du signal au jour 0 (J0) réparti en plusieurs points dans le péritoine dès 10 min après l'injection (figure 24a). Nous retrouvons ce signal tout au long du suivi (3 fois par jour) jusqu'à J3 où nous avons arrêté l'expérience et confirmé la présence du signal au niveau des viscères sur la souris ouverte (figure 24b). Une analyse quantitative du signal émis au sein d'une ROI tracée (figure 24a, rectangle rouge), nous indique que l'intensité du signal reste constante entre J0 et J3, supportant l'idée que les lymphocytes T V δ 1⁺ humains se maintiennent dans la souris pendant cette période. Nous avons pu observer la même tendance sur 2 autres souris. Ce résultat préliminaire, à reproduire sur un nombre plus important de souris, nous indique que la détection de lymphocytes T $\gamma\delta$ en profondeur dans les souris vivantes est possible grâce à la technique d'imagerie par BLI.

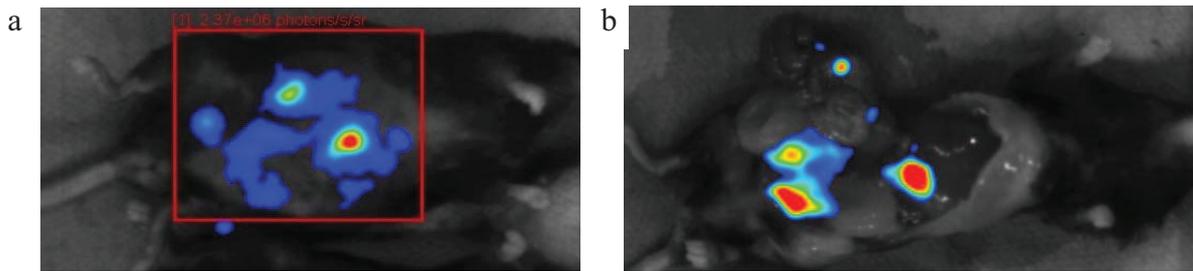


Figure 24 : Images de souris ayant reçu une injection i.p de lignée $V\delta 1^+$ exprimant la luc . La souris a été implantée avec des cellules HT29 en orthotopique depuis 41 jours. Le carré rouge représente la ROI tracée au niveau du péritoine.

Une analyse au luminomètre des différents organes broyés après le sacrifice de la souris à J3, permet de détecter un signal bioluminescent au niveau du caecum, site de la tumeur primaire mais aussi de l'estomac, du foie, des poumons, des reins et de la rate que nous avons précédemment identifiés comme des sites potentiels de développement de métastases. Un contrôle, dans lequel nous injecterons les cellules T $\gamma\delta$ bioluminescentes dans une souris n'ayant pas reçu de tumeur nous permettra de déduire le *homing* des lymphocytes T $\gamma\delta$ provoqué par la tumeur. On peut citer une étude qui, même si elle concerne des lymphocytes T $\gamma\delta$ murins, montre que leur répartition dans la souris, après un transfert adoptif en i.v, semblerait relativement identique entre une souris saine et une souris ayant reçu des tumeurs murines d'origine mammaire en s.c (au niveau de la patte) à l'exception de la rate dans laquelle les auteurs retrouvent une accumulation de lymphocytes T $\gamma\delta$ dans les souris sans tumeurs (Beck, Kim et al. 2009).

Nous envisageons de vérifier la colocalisation des lymphocytes T $V\delta 1^+$ et des tumeurs HT29 luc comme l'ont déjà réalisée Dobrenkov et al qui ont localisé dans le même animal aux mêmes jours des tumeurs de prostate murines exprimant la *Renilla* luciférase (*Rluc*) injectées en i.v et des lymphocytes T humains exprimant la *click beetle red* luc (nécessitant un substrat différent de la *Rluc*) (Dobrenkov, Olszewska et al. 2008). Pour cela nous transduirons la lignée $V\delta 1^+$ avec la *Gaussia* luc (*Gluc*), qui dégrade un substrat différent de la *firefly* luc (*fluc*) exprimée par notre lignée HT29. Cette enzyme normalement sécrétée, dégrade la coelentérazine (Tannous, Kim et al. 2005). Dans une étude récente, Santos et al réussissent à colocaliser lymphocytes T $\alpha\beta$ murins exprimant la $Gluc^+$, ancrée dans la membrane cellulaire grâce à la partie membranaire du CD8, et des tumeurs cibles $fluc^+$ situées dans différents organes d'une souris (Santos, Yeh et al. 2009). Cette équipe nous a fait parvenir leur vecteur extGluc-IRES-GFP et des constructions sont actuellement en cours au laboratoire pour produire des lentivirus qui serviront à infecter nos lignées T $V\delta 1^+$.

Enfin, pour tester une action des lignées T $V\delta 1^+$ au moment où les cellules métastatiques s'échappent de la tumeur primaire, on peut imaginer évaluer la quantité de cellules tumorales humaines circulantes dans les souris comme cela a déjà été fait chez l'homme notamment lors de cancers du sein (Cristofanilli, Budd et al. 2004). En effet, le nombre de cellules tumorales circulantes pourrait être diminué dans les animaux traités par la lignée T $V\delta 1^+$ par rapport à des souris non traitées, traduisant un effet des lymphocytes T $V\delta 1^+$ en amont dans la progression tumorale. Très récemment, Kojima et al ont mis au point une technique pour évaluer précisément la quantité de cellules tumorales circulantes dans des échantillons sanguins en leur faisant exprimer spécifiquement le gène GFP (au niveau de la région codant pour la télomérase active dans les cellules tumorales) (Kojima, Hashimoto et al. 2009). D'autre part, l'action des lymphocytes T $V\delta 1^+$ pourrait être testée en aval, au niveau

du site des métastases, dans un modèle de métastases « provoquées » que nous avons décrit dans la partie méthodologie de l'article 2. L'absence de tumeurs primaires intra-caecales suite à des injections en i.v des cellules HT29 luc (pour les métastases pulmonaires) (Price, Daniels et al. 1989) ou des implantations directes des cellules HT29 luc au niveau du foie (Hamblin, Del Governatore et al. 2000) permettrait de tester un rôle direct des lymphocytes T V δ 1⁺ sur les métastases formées.

Enfin, il sera intéressant de se placer dans des conditions plus physiologiques. Dans notre étude, l'utilisation de lignées et de clones a restreint nos résultats à un nombre limité de lymphocytes sélectionnés lors des cultures in vitro et il demeure important de les élargir à des lymphocytes T V δ 2^{neg} et des cellules de cancers colorectaux provenant directement des patients malades.

Il est possible par une chirurgie de ligation d'implanter de petits morceaux de biopsies de tumeurs coliques humaines au niveau du caecum des souris immunodéficientes (Fu, Besterman et al. 1991; Sun, Sasson et al. 1999). Dans ce cas, il est intéressant de noter qu'on planterait avec les morceaux de tumeurs une partie du microenvironnement tumoral (comprenant la matrice, les fibroblastes et des cellules du système immunitaire) provenant du patient dont il faudra tenir compte pour l'étude des fonctions des cellules T $\gamma\delta$.

De plus, plusieurs équipes ont déjà utilisé des lymphocytes T $\gamma\delta$ (V δ 2⁺) humains de donneurs sains amplifiés *ex vivo* pour traiter des tumeurs bioluminescentes de lignées humaines implantées chez des souris (Sato, Kimura et al. 2005) (Yuasa, Sato et al. 2009). Nous pourrions traiter les souris ayant reçu des tumeurs en orthotopique par des injections de lymphocytes T V δ 2^{neg} amplifiés *ex vivo* provenant par exemple de patients sains (comme des individus CMV-séropositifs pour lesquels les cellules T V δ 2^{neg} sont augmentées dans le sang (Pitard, Roumanes et al. 2008)). Les lymphocytes T V δ 2^{neg} seraient testés pour leur réactivité anti-tumorale *in vitro* avant leur utilisation. On peut aussi imaginer utiliser les cellules T $\gamma\delta$ autologues des patients ayant développés des tumeurs colorectales, comme l'ont fait Lozupone et al qui avaient utilisé des lymphocytes T $\gamma\delta$ et des lignées de mélanomes autologues de patients dans un modèle de souris immunodéficientes (Lozupone, Pende et al. 2004).

Un modèle exclusivement murin pourrait permettre de préciser l'implication des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans l'immunosurveillance des cancers colorectaux suivant l'exemple des études de Girardi et al dans le cas des cancers cutanés avec des souris TCR $\delta^{-/-}$ (Girardi, Oppenheim et al. 2001).

Un modèle d'induction de cancer colorectal, par application de carcinogène chimique chez des souris immunocompétentes et TCR $\delta^{-/-}$ comme celui de Matsuda et al (Matsuda, Kudoh et al. 2001), permettrait d'approfondir l'étude du rôle anti-tumoral des lymphocytes T $\gamma\delta$. Ce modèle resituerait l'action des cellules T $\gamma\delta$ au sein d'une réponse immunitaire globale lors de la tumorigénèse. Cependant, l'organisation des lymphocytes T $\gamma\delta$ étant complètement différentes entre la souris et l'homme, il sera difficile de transposer les résultats observés dans un contexte humain.

OUVERTURES...

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, la réponse du système immunitaire lors du développement d'une tumeur est un processus qui requiert l'action de différents effecteurs d'une manière dépendante de l'environnement tumoral. Nous l'avons souligné, la notion de *l'immuno-editing* complexifie considérablement l'étude du rôle de l'immunité dans le cancer qui ne se résume pas à « la protection de l'hôte » mais qui peut aussi promouvoir le développement tumoral (Smyth, Dunn et al. 2006). Les modèles chimériques d'implantation de cellules humaines dans des souris immunodéficientes, tel que celui utilisé dans cette thèse, permettent de simplifier l'étude de la réponse du système immunitaire au cancer en ciblant un type cellulaire. Bien que l'environnement murin permette à la tumeur humaine d'évoluer (grâce à des apports en oxygène et nutriments (Mueller and Fusenig 2004)) et de disséminer, ce modèle comporte un certain nombre de limites. Par exemple, on peut citer : la présence d'éléments du système immunitaire murin inné (granulocytes, macrophages) qui pourraient exercer une action contre les tumeurs humaines, mais aussi l'absence du microenvironnement humain contenant les facteurs de survie, les molécules d'adhésion nécessaires au maintien et au *homing* des lymphocytes T $\gamma\delta$. Ce modèle nous a toutefois permis d'étudier, i) un type de fonction de cellules immunitaires : des fonctions anti-tumorales ii) une catégorie d'effecteurs immunitaires particuliers : les lymphocytes T $V\delta^{neg}$ iii) la réponse contre un type de tumeurs : des tumeurs d'origine colique.

Comme nous l'avons précisé dans notre étude, des éléments indiquent une action anti-tumorale précoce des lymphocytes TV δ^{neg} . Dans la littérature, plusieurs arguments, comprenant leur état de pré-activation, leur propriété de reconnaissance d'un antigène indépendamment du CMH, leurs récepteurs du système immunitaire innée (comme NKG2D), leurs localisations épithéliales, mais aussi leurs fonctions pléiotropes avec une sécrétion locale rapide de diverses cytokines, désignent les lymphocytes T $V\delta^{neg}$ comme des effecteurs rapides et précoces en réponse au stress tumoral (Hayday 2009). Cette implication précoce des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans la réponse anti-tumorale semble actuellement admise et n'a pourtant été clairement mise en évidence que dans les modèles murins, notamment ceux de l'équipe de Girardi M que nous avons présentés dans l'introduction. Récemment, ils ont apporté une preuve convaincante en démontrant que les lymphocytes T $\gamma\delta$ ont la capacité de supprimer l'incidence tumorale de papillomes mais pas la progression des papillomes en carcinomes (Strid, Roberts et al. 2008). Ainsi, si les lymphocytes T $\gamma\delta$ font partie des premiers acteurs de la réponse anti-tumorale au niveau local, on pourrait se questionner sur la pertinence des études effectuées chez les patients atteints de tumeurs. En effet, selon le concept de *l'immuno-editing*, si la tumeur est cliniquement détectable chez ces patients, elle a probablement déjà échappé au système immunitaire et serait à un stade avancé, ultérieur à l'intervention des lymphocytes T $\gamma\delta$. Or les études d'infiltrats de lymphocytes T $\gamma\delta$ sont réalisées à partir de tumeurs cliniquement visibles et de manière logique, hormis quelques exceptions, la proportion de lymphocytes T $\gamma\delta$ retrouvés parmi les TILs est faible (Shimizu, Weidmann et al. 1991; Alam, Clark et al. 1992; Kowalczyk, Skorupski et al. 1996). La tendance observée se confirme concernant les tumeurs colorectales, dans lesquelles les lymphocytes T $\gamma\delta$ ne représenteraient qu'un faible pourcentage des TILs (Chen, Niu et al. 2001) qui serait même inférieur au pourcentage de lymphocytes T $\gamma\delta$ observé dans les épithéliums intestinaux sains (Watanabe, Hizuta et al. 1995).

Quel serait alors le rôle de ces lymphocytes T $\gamma\delta$ retrouvés dans des tumeurs à un stade tardif ? Pourraient-ils préférentiellement avoir un rôle immunorégulateur ? Notre étude n'aborde pas ces questions mais une fois une tumeur solide développée, les lymphocytes T $\gamma\delta$ pourrait préférentiellement être des stimulateurs de l'immunité adaptative notamment en activant les DC (Leslie, Vincent et al. 2002), en sécrétant des cytokines comme des IFN de

types I (Le Bon and Tough 2002), ou en exerçant des fonctions d'APC (Brandes, Willimann et al. 2005). La présence des lymphocytes T $\gamma\delta$ pourrait même être nécessaire au préalable d'une réponse des lymphocytes T $\alpha\beta$ au sein d'une tumeur. Par exemple, on pourrait aussi imaginer que les lymphocytes T $\gamma\delta$ intra-tumoraux sécrètent de grandes quantités d'IL17 provoquant le recrutement de cellules du système immunitaire inné dont les neutrophiles (Deknuydt, Scotet et al. 2009). Enfin, les lymphocytes T $\gamma\delta$ pourraient également promouvoir le développement tumoral en exerçant des fonctions immunosuppressives comme le démontrent Peng et al dans leur étude sur les lymphocytes T $\gamma\delta$ infiltrant les tumeurs de sein et de prostate (Peng, Wang et al. 2007).

Utiliser les lymphocytes TV $\delta 2^{\text{neg}}$ en immunothérapie des cancers colorectaux...

Un nombre croissant de travaux comme ceux de l'équipe de F Pagès (Galon, Costes et al. 2006; Pages, Galon et al. 2008) soulignent l'importance du système immunitaire dans la lutte contre les cancers colorectaux soutenant ainsi la mise en place de protocoles d'immunothérapie pour leur traitement. Même s'il est communément admis que les populations T $\alpha\beta$ CD8⁺ sont parmi les plus efficaces lors de la réponse effectrice anti-tumorale (Yu and Fu 2006), nos travaux renforcent l'idée que les populations T V $\delta 2^{\text{neg}}$ pourraient aussi avoir une importance lors de l'élimination de tumeurs colorectales et la prévention de leur métastases. De plus, leur localisation au niveau des épithéliums intestinaux (Soderstrom, Bucht et al. 1994) en fait des candidats intéressants dans des protocoles d'immunothérapies des cancers colorectaux. L'avantage d'une immunothérapie utilisant les lymphocytes T V $\delta 2^{\text{neg}}$ repose sur le fait que potentiellement : i) ils pourraient atteindre une tumeur solide grâce à des propriétés migratoires, ii) reconnaître leurs ligands via par exemple NKG2D et/ou leur TCR comme peuvent le faire les cellules T V $\delta 2^+$ (Das, Groh et al. 2001), iii) déployer rapidement des effecteurs clés et stimuler la réponse adaptative des lymphocytes T $\alpha\beta$ CD4⁺ et CD8⁺. Plusieurs approches ont déjà été testées concernant les sous-populations T V $\delta 2^+$ (Wilhelm, Kunzmann et al. 2003; Dieli, Vermijlen et al. 2007), mais celles-ci ne pourront être envisagées pour les sous-populations T V $\delta 2^{\text{neg}}$ qu'une fois leurs ligands spécifiques identifiés.

Enfin, dans la mesure où l'immunothérapie T $\gamma\delta$ ne serait délivrée aux patients qu'une fois les tumeurs détectées, l'idée de cibler un seul type cellulaire comme les lymphocytes T $\gamma\delta$ peut paraître être vaine alors que la tumeur a déjà mis en place des mécanismes de résistance au système immunitaire (Zou 2005). Par exemple, les tumeurs colorectales pourraient sécréterIDO comme l'ont déjà été montré Brandacher et al (Brandacher, Perathoner et al. 2006) ou produire des MICA solubles, comme il a été montré pour les tumeurs pancréatiques (Marten, von Lilienfeld-Toal et al. 2006), qui pourrait diminuer l'activité cytotoxique des lymphocytes T $\gamma\delta$ en induisant une down régulation du NKG2D (Groh, Wu et al. 2002). De même des cellules aux potentiels immunosuppresseurs comme les macrophages associés aux tumeurs (TAM) (Lu and Finn 2008) ou encore les cellules T Reg (Zou 2006) auraient probablement un effet négatif sur la réponse effectrice des lymphocytes T V $\delta 2^{\text{neg}}$ stimulés. Ainsi une thérapie anti-cancer colique efficace, consisterait probablement en la combinaison d'une stimulation des lymphocytes T V $\delta 2^{\text{neg}}$ et d'une inhibition des mécanismes mis en marche par les tumeurs pour s'échapper comme nous l'avons décrits dans l'introduction.

Bibliographie

- (1998). "Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer. Meta-analysis Group In Cancer." J Clin Oncol **16**(1): 301-8.
- Abe, Y., M. Muto, et al. (2009). "Clinical and immunological evaluation of zoledronate-activated Vgamma9gammadelta T-cell-based immunotherapy for patients with multiple myeloma." Exp Hematol **37**(8): 956-68.
- Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, et al. (2007). "Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells." Nat Immunol **8**(6): 639-46.
- Adams, E. J., Y. H. Chien, et al. (2005). "Structure of a gammadelta T cell receptor in complex with the nonclassical MHC T22." Science **308**(5719): 227-31.
- Adams, J. Y., M. Johnson, et al. (2002). "Visualization of advanced human prostate cancer lesions in living mice by a targeted gene transfer vector and optical imaging." Nat Med **8**(8): 891-7.
- Addison, C. L., T. O. Daniel, et al. (2000). "The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity." J Immunol **165**(9): 5269-77.
- Aguirre-Ghiso, J. A. (2007). "Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy." Nat Rev Cancer **7**(11): 834-46.
- Ahmadi, A., S. Polyak, et al. (2009). "Colorectal cancer surveillance in inflammatory bowel disease: the search continues." World J Gastroenterol **15**(1): 61-6.
- Airoidi, I., E. Di Carlo, et al. (2005). "Lack of II12rb2 signaling predisposes to spontaneous autoimmunity and malignancy." Blood **106**(12): 3846-53.
- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, et al. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3983-8.
- Alam, S. M., J. S. Clark, et al. (1992). "T cell receptor gamma/delta expression on lymphocyte populations of breast cancer patients." Immunol Lett **31**(3): 279-83.
- Alexander, A. A., A. Maniar, et al. (2008). "Isopentenyl pyrophosphate-activated CD56+ {gamma}{delta} T lymphocytes display potent antitumor activity toward human squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **14**(13): 4232-40.
- Ali, Z., L. Shao, et al. (2007). "Prolonged (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate-driven antimicrobial and cytotoxic responses of pulmonary and systemic Vgamma2Vdelta2 T cells in macaques." J Immunol **179**(12): 8287-96.
- Allen, S. J., S. E. Crown, et al. (2007). "Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism." Annu Rev Immunol **25**: 787-820.
- Allinen, M., R. Beroukhim, et al. (2004). "Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer." Cancer Cell **6**(1): 17-32.
- Allison, T. J., C. C. Winter, et al. (2001). "Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor." Nature **411**(6839): 820-4.
- Amigorena, S. (2002). "Fc gamma receptors and cross-presentation in dendritic cells." J Exp Med **195**(1): F1-3.
- Angelini, D. F., G. Borsellino, et al. (2004). "FcgammaRIII discriminates between 2 subsets of Vgamma9Vdelta2 effector cells with different responses and activation pathways." Blood **104**(6): 1801-7.
- Apetoh, L., F. Ghiringhelli, et al. (2007). "The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy." Immunol Rev **220**: 47-59.
- Apetoh, L., A. Tesniere, et al. (2008). "Molecular interactions between dying tumor cells and the innate immune system determine the efficacy of conventional anticancer therapies." Cancer Res **68**(11): 4026-30.
- Apte, S. H., A. Baz, et al. (2008). "Interferon-gamma and interleukin-4 reciprocally regulate CD8 expression in CD8+ T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(45): 17475-80.

- Arenberg, D. A., M. P. Keane, et al. (1998). "Epithelial-neutrophil activating peptide (ENA-78) is an important angiogenic factor in non-small cell lung cancer." J Clin Invest **102**(3): 465-72.
- Arenberg, D. A., S. L. Kunkel, et al. (1996). "Interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10) is an angiostatic factor that inhibits human non-small cell lung cancer (NSCLC) tumorigenesis and spontaneous metastases." J Exp Med **184**(3): 981-92.
- Argentati, K., F. Re, et al. (2002). "Numerical and functional alterations of circulating gammadelta T lymphocytes in aged people and centenarians." J Leukoc Biol **72**(1): 65-71.
- Arkenau, H. T., D. Arnold, et al. (2008). "Efficacy of oxaliplatin plus capecitabine or infusional fluorouracil/leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: a pooled analysis of randomized trials." J Clin Oncol **26**(36): 5910-7.
- Baggiolini, M. (1998). "Chemokines and leukocyte traffic." Nature **392**(6676): 565-8.
- Baker, S. J., E. R. Fearon, et al. (1989). "Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas." Science **244**(4901): 217-21.
- Balbi, B., M. T. Valle, et al. (1993). "T-lymphocytes with gamma delta+ V delta 2+ antigen receptors are present in increased proportions in a fraction of patients with tuberculosis or with sarcoidosis." Am Rev Respir Dis **148**(6 Pt 1): 1685-90.
- Balkwill, F. (2004). "Cancer and the chemokine network." Nat Rev Cancer **4**(7): 540-50.
- Bancroft, G. J., R. D. Schreiber, et al. (1991). "Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse." Immunol Rev **124**: 5-24.
- Bao, S., Q. Wu, et al. (2006). "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response." Nature **444**(7120): 756-60.
- Bauer, S., V. Groh, et al. (1999). "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA." Science **285**(5428): 727-9.
- Beck, B. H., H. G. Kim, et al. (2009). "Adoptively transferred ex vivo expanded gammadelta-T cells mediate in vivo antitumor activity in preclinical mouse models of breast cancer." Breast Cancer Res Treat.
- Bell, D., P. Chomarat, et al. (1999). "In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas." J Exp Med **190**(10): 1417-26.
- Belmant, C., E. Espinosa, et al. (1999). "3-Formyl-1-butyl pyrophosphate A novel mycobacterial metabolite-activating human gammadelta T cells." J Biol Chem **274**(45): 32079-84.
- Bendersky, A., N. Markovits, et al. (2009). "Vgamma9+ gammadelta T cells in systemic sclerosis patients are numerically and functionally preserved and induce fibroblast apoptosis." Immunobiology.
- Bennouna, J., E. Bompas, et al. (2008). "Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma." Cancer Immunol Immunother **57**(11): 1599-609.
- Bergstrom, J. D., R. G. Bostedor, et al. (2000). "Alendronate is a specific, nanomolar inhibitor of farnesyl diphosphate synthase." Arch Biochem Biophys **373**(1): 231-41.
- Bertotto, A., R. Gerli, et al. (1993). "Lymphocytes bearing the gamma delta T cell receptor in acute Brucella melitensis infection." Eur J Immunol **23**(5): 1177-80.
- Betts, M. R., J. M. Brenchley, et al. (2003). "Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation." J Immunol Methods **281**(1-2): 65-78.
- Bhagat, G., A. J. Naiyer, et al. (2008). "Small intestinal CD8+TCRgammadelta+NKG2A+ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease." J Clin Invest **118**(1): 281-93.

- Bialasiewicz, A. A., J. X. Ma, et al. (1999). "Alpha/beta- and gamma/delta TCR(+) lymphocyte infiltration in necrotising choroidal melanomas." Br J Ophthalmol **83**(9): 1069-73.
- Bishop, J. M. (1991). "Molecular themes in oncogenesis." Cell **64**(2): 235-48.
- Blohm, U., E. Roth, et al. (2002). "Lack of effector cell function and altered tetramer binding of tumor-infiltrating lymphocytes." J Immunol **169**(10): 5522-30.
- Boismenu, R., L. Feng, et al. (1996). "Chemokine expression by intraepithelial gamma delta T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia." J Immunol **157**(3): 985-92.
- Boismenu, R. and W. L. Havran (1994). "Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells." Science **266**(5188): 1253-5.
- Born, W. K., M. Vollmer, et al. (2003). "Hybridomas expressing gammadelta T-cell receptors respond to cardiolipin and beta2-glycoprotein 1 (apolipoprotein H)." Scand J Immunol **58**(3): 374-81.
- Borroni, E. M., R. Bonecchi, et al. (2008). "Chemokine decoy receptors: new players in reproductive immunology." Immunol Invest **37**(5): 483-97.
- Boshoff, C. and R. Weiss (2002). "AIDS-related malignancies." Nat Rev Cancer **2**(5): 373-82.
- Bouet-Toussaint, F., F. Cabillic, et al. (2008). "Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of human solid tumors. Potential for immunotherapy of hepatocellular and colorectal carcinomas." Cancer Immunol Immunother **57**(4): 531-9.
- Boullier, S., G. Dadaglio, et al. (1997). "V delta 1 T cells expanded in the blood throughout HIV infection display a cytotoxic activity and are primed for TNF-alpha and IFN-gamma production but are not selected in lymph nodes." J Immunol **159**(7): 3629-37.
- Braakman, E., J. G. van de Winkel, et al. (1992). "CD16 on human gamma delta T lymphocytes: expression, function, and specificity for mouse IgG isotypes." Cell Immunol **143**(1): 97-107.
- Brandacher, G., A. Perathoner, et al. (2006). "Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells." Clin Cancer Res **12**(4): 1144-51.
- Brandes, M., K. Willimann, et al. (2009). "Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(7): 2307-12.
- Brandes, M., K. Willimann, et al. (2003). "Flexible migration program regulates gamma delta T-cell involvement in humoral immunity." Blood **102**(10): 3693-701.
- Brandes, M., K. Willimann, et al. (2005). "Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells." Science **309**(5732): 264-8.
- Brenner, M. B., J. L. Strominger, et al. (1988). "The gamma delta T cell receptor." Adv Immunol **43**: 133-92.
- Bresalier, R. S., S. E. Raper, et al. (1987). "A new animal model for human colon cancer metastasis." Int J Cancer **39**(5): 625-30.
- Brew, R., J. S. Erikson, et al. (2000). "Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro." Cytokine **12**(1): 78-85.
- Breynaert, C., S. Vermeire, et al. (2008). "Dysplasia and colorectal cancer in inflammatory bowel disease: a result of inflammation or an intrinsic risk?" Acta Gastroenterol Belg **71**(4): 367-72.
- Bricard, G. and S. A. Porcelli (2007). "Antigen presentation by CD1 molecules and the generation of lipid-specific T cell immunity." Cell Mol Life Sci **64**(14): 1824-40.
- Bromberg, J. F., C. M. Horvath, et al. (1996). "Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 7673-8.

- Brutkiewicz, S., M. Mendonca, et al. (2007). "The expression level of luciferase within tumour cells can alter tumour growth upon in vivo bioluminescence imaging." Luminescence **22**(3): 221-228.
- Bryan, T. M. and T. R. Cech (1999). "Telomerase and the maintenance of chromosome ends." Curr Opin Cell Biol **11**(3): 318-24.
- Bucht, A., K. Soderstrom, et al. (1992). "T cell receptor diversity and activation markers in the V delta 1 subset of rheumatoid synovial fluid and peripheral blood T lymphocytes." Eur J Immunol **22**(2): 567-74.
- Bucy, R. P., C. L. Chen, et al. (1989). "Tissue localization and CD8 accessory molecule expression of T gamma delta cells in humans." J Immunol **142**(9): 3045-9.
- Buell, J. F., T. G. Gross, et al. (2005). "Malignancy after transplantation." Transplantation **80**(2 Suppl): S254-64.
- Bukowski, J. F., C. T. Morita, et al. (1994). "Recognition and destruction of virus-infected cells by human gamma delta CTL." J Immunol **153**(11): 5133-40.
- Bukowski, J. F., C. T. Morita, et al. (1995). "V gamma 2V delta 2 TCR-dependent recognition of non-peptide antigens and Daudi cells analyzed by TCR gene transfer." J Immunol **154**(3): 998-1006.
- Burchenal, J. H., M. L. Murphy, et al. (1956). "Treatment of acute leukemia." Pediatrics **18**(4): 643-60.
- Burnet, F. M. (1967). "Immunological aspects of malignant disease." Lancet **1**(7501): 1171-4.
- Burnet, F. M. (1970). "The concept of immunological surveillance." Prog Exp Tumor Res **13**: 1-27.
- Burstein, N. A. and L. W. Law (1971). "Neonatal thymectomy and non-viral mammary tumours in mice." Nature **231**(5303): 450-2.
- Burt, R. W. (1996). "Cohorts with familial disposition for colon cancers in chemoprevention trials." J Cell Biochem Suppl **25**: 131-5.
- Caccamo, N., L. Battistini, et al. (2006). "CXCR5 identifies a subset of Vgamma9Vdelta2 T cells which secrete IL-4 and IL-10 and help B cells for antibody production." J Immunol **177**(8): 5290-5.
- Caccamo, N., S. Meraviglia, et al. (2005). "Differential requirements for antigen or homeostatic cytokines for proliferation and differentiation of human Vgamma9Vdelta2 naive, memory and effector T cell subsets." Eur J Immunol **35**(6): 1764-72.
- Caceres, G., X. Y. Zhu, et al. (2003). "Imaging of luciferase and GFP-transfected human tumours in nude mice." Luminescence **18**(4): 218-23.
- Cai, J. L. and P. W. Tucker (2001). "Gamma-delta T cells: immunoregulatory functions and immunoprotection." Chem Immunol **79**: 99-138.
- Callaway, M. P. and J. C. Briggs (1989). "The incidence of late recurrence (greater than 10 years); an analysis of 536 consecutive cases of cutaneous melanoma." Br J Plast Surg **42**(1): 46-9.
- Campoli, M., C. C. Chang, et al. (2002). "HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection." Vaccine **20 Suppl 4**: A40-5.
- Camus, M., M. Tosolini, et al. (2009). "Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence." Cancer Res **69**(6): 2685-93.
- Cao, X., E. W. Shores, et al. (1995). "Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain." Immunity **2**(3): 223-38.
- Catellani, S., A. Poggi, et al. (2007). "Expansion of Vdelta1 T lymphocytes producing IL-4 in low-grade non-Hodgkin lymphomas expressing UL-16-binding proteins." Blood **109**(5): 2078-85.
- Cespedes, M. V., C. Espina, et al. (2007). "Orthotopic microinjection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites." Am J Pathol **170**(3): 1077-85.

- Chambers, A. F., A. C. Groom, et al. (2002). "Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites." Nat Rev Cancer **2**(8): 563-72.
- Chaput, N., J. Taieb, et al. (2004). "Exosome-based immunotherapy." Cancer Immunol Immunother **53**(3): 234-9.
- Chen, J., H. Niu, et al. (2001). "Antitumor activity of expanded human tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes." Int Arch Allergy Immunol **125**(3): 256-63.
- Chen, W., A. S. Chan, et al. (2005). "FLT3 ligand administration after hematopoietic cell transplantation increases circulating dendritic cell precursors that can be activated by CpG oligodeoxynucleotides to enhance T-cell and natural killer cell function." Biol Blood Marrow Transplant **11**(1): 23-34.
- Chen, Z. W. (2005). "Immune regulation of gammadelta T cell responses in mycobacterial infections." Clin Immunol **116**(3): 202-7.
- Choudhary, A., F. Davodeau, et al. (1995). "Selective lysis of autologous tumor cells by recurrent gamma delta tumor-infiltrating lymphocytes from renal carcinoma." J Immunol **154**(8): 3932-40.
- Chowers, Y., W. Holtmeier, et al. (1994). "The V delta 1 T cell receptor repertoire in human small intestine and colon." J Exp Med **180**(1): 183-90.
- Christofori, G. and H. Semb (1999). "The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene." Trends Biochem Sci **24**(2): 73-6.
- Cipriani, B., G. Borsellino, et al. (2000). "Activation of C-C beta-chemokines in human peripheral blood gammadelta T cells by isopentenyl pyrophosphate and regulation by cytokines." Blood **95**(1): 39-47.
- Clark, W. H., Jr., D. E. Elder, et al. (1989). "Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression." J Natl Cancer Inst **81**(24): 1893-904.
- Clemente, C. G., M. C. Mihm, Jr., et al. (1996). "Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma." Cancer **77**(7): 1303-10.
- Cobleigh, M. A., C. L. Vogel, et al. (1999). "Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease." J Clin Oncol **17**(9): 2639-48.
- Cockwell, P., J. W. Calderwood, et al. (2002). "Chemoattraction of T cells expressing CCR5, CXCR3 and CX3CR1 by proximal tubular epithelial cell chemokines." Nephrol Dial Transplant **17**(5): 734-44.
- Coiffier, B. (2002). "Rituximab in combination with CHOP improves survival in elderly patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma." Semin Oncol **29**(2 Suppl 6): 18-22.
- Cole, K. E., C. A. Strick, et al. (1998). "Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3." J Exp Med **187**(12): 2009-21.
- Colonna-Romano, G., A. Aquino, et al. (2004). "Impairment of gamma/delta T lymphocytes in elderly: implications for immunosenescence." Exp Gerontol **39**(10): 1439-46.
- Comoli, P., P. Pedrazzoli, et al. (2005). "Cell therapy of stage IV nasopharyngeal carcinoma with autologous Epstein-Barr virus-targeted cytotoxic T lymphocytes." J Clin Oncol **23**(35): 8942-9.
- Constant, P., F. Davodeau, et al. (1994). "Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands." Science **264**(5156): 267-70.
- Contag, C. H., P. R. Contag, et al. (1995). "Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts." Mol Microbiol **18**(4): 593-603.
- Contag, P. R., I. N. Olomu, et al. (1998). "Bioluminescent indicators in living mammals." Nat Med **4**(2): 245-7.

- Conti, J. A., N. E. Kemeny, et al. (1996). "Irinotecan is an active agent in untreated patients with metastatic colorectal cancer." J Clin Oncol **14**(3): 709-15.
- Corvaisier, M., A. Moreau-Aubry, et al. (2005). "V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells." J Immunol **175**(8): 5481-8.
- Cotton, M. and A. Claing (2009). "G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration." Cell Signal **21**(7): 1045-53.
- Coughlin, C. M., K. E. Salhany, et al. (1998). "Tumor cell responses to IFNgamma affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis." Immunity **9**(1): 25-34.
- Couzi, L., Y. Levaillant, et al. (2009). "Cytomegalovirus-Induced {gamma}{delta} T Cells Associate with Reduced Cancer Risk after Kidney Transplantation." J Am Soc Nephrol.
- Cristofanilli, M., G. T. Budd, et al. (2004). "Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer." N Engl J Med **351**(8): 781-91.
- Croci, D. O., M. F. Zacarias Fluck, et al. (2007). "Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment." Cancer Immunol Immunother **56**(11): 1687-700.
- Cui, K., X. Xu, et al. (2008). "A quantitative study of factors affecting in vivo bioluminescence imaging." Luminescence **23**(5): 292-5.
- Cunningham, D., Y. Humblet, et al. (2004). "Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer." N Engl J Med **351**(4): 337-45.
- Curiel, T. J., G. Coukos, et al. (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." Nat Med **10**(9): 942-9.
- Dagna, L., A. Iellem, et al. (2002). "Skewing of cytotoxic activity and chemokine production, but not of chemokine receptor expression, in human type-1/-2 gamma delta T lymphocytes." Eur J Immunol **32**(10): 2934-43.
- Das, H., V. Groh, et al. (2001). "MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function." Immunity **15**(1): 83-93.
- Daughaday, W. H. and T. F. Deuel (1991). "Tumor secretion of growth factors." Endocrinol Metab Clin North Am **20**(3): 539-63.
- Davis, M. M. and P. J. Bjorkman (1988). "T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition." Nature **334**(6181): 395-402.
- de Both, N. J., M. Vermey, et al. (1999). "A comparative evaluation of various invasion assays testing colon carcinoma cell lines." Br J Cancer **81**(6): 934-41.
- De La Barrera, S. S., M. Finiasz, et al. (2003). "Specific lytic activity against mycobacterial antigens is inversely correlated with the severity of tuberculosis." Clin Exp Immunol **132**(3): 450-61.
- De Libero, G., M. P. Rocci, et al. (1993). "T cell receptor heterogeneity in gamma delta T cell clones from intestinal biopsies of patients with celiac disease." Eur J Immunol **23**(2): 499-504.
- De Paoli, P., D. Gennari, et al. (1991). "A subset of gamma delta lymphocytes is increased during HIV-1 infection." Clin Exp Immunol **83**(2): 187-91.
- De Rosa, S. C., J. P. Andrus, et al. (2004). "Ontogeny of gamma delta T cells in humans." J Immunol **172**(3): 1637-45.
- Dechanet, J., P. Merville, et al. (1999). "Major expansion of gammadelta T lymphocytes following cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients." J Infect Dis **179**(1): 1-8.
- Dechanet, J., P. Merville, et al. (1999). "Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus." J Clin Invest **103**(10): 1437-49.

- Deknuydt, F., E. Scotet, et al. (2009). "Modulation of inflammation through IL-17 production by gammadelta T cells: Mandatory in the mouse, dispensable in humans?" Immunol Lett.
- Dell'Agnola, C. and A. Biragyn (2007). "Clinical utilization of chemokines to combat cancer: the double-edged sword." Expert Rev Vaccines **6**(2): 267-83.
- Demicheli, R., A. Abbattista, et al. (1996). "Time distribution of the recurrence risk for breast cancer patients undergoing mastectomy: further support about the concept of tumor dormancy." Breast Cancer Res Treat **41**(2): 177-85.
- Desjarlais, J. R., G. A. Lazar, et al. (2007). "Optimizing engagement of the immune system by anti-tumor antibodies: an engineer's perspective." Drug Discov Today **12**(21-22): 898-910.
- Deusch, K., F. Luling, et al. (1991). "A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously expresses the gamma/delta T cell receptor, the CD8 accessory molecule and preferentially uses the V delta 1 gene segment." Eur J Immunol **21**(4): 1053-9.
- Devaud, C., E. Bilhere, et al. (2009). "Antitumor activity of gammadelta T cells reactive against cytomegalovirus-infected cells in a mouse xenograft tumor model." Cancer Res **69**(9): 3971-8.
- Dhawan, P. and A. Richmond (2002). "Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma." J Leukoc Biol **72**(1): 9-18.
- Dhodapkar, M. V., K. M. Dhodapkar, et al. (2008). "Interactions of tumor cells with dendritic cells: balancing immunity and tolerance." Cell Death Differ **15**(1): 39-50.
- Diederichsen, A. C., J. B. Hjelmberg, et al. (2003). "Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells." Cancer Immunol Immunother **52**(7): 423-8.
- Dieli, F., N. Gebbia, et al. (2003). "Induction of gammadelta T-lymphocyte effector functions by bisphosphonate zoledronic acid in cancer patients in vivo." Blood **102**(6): 2310-1.
- Dieli, F., D. Vermijlen, et al. (2007). "Targeting human {gamma}delta T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer." Cancer Res **67**(15): 7450-7.
- Ding, Y., Y. Shimada, et al. (2003). "Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **9**(9): 3406-12.
- DiSanto, J. P. (1997). "Cytokines: shared receptors, distinct functions." Curr Biol **7**(7): R424-6.
- DiSanto, J. P., W. Muller, et al. (1995). "Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(2): 377-81.
- Dobrenkov, K., M. Olszewska, et al. (2008). "Monitoring the efficacy of adoptively transferred prostate cancer-targeted human T lymphocytes with PET and bioluminescence imaging." J Nucl Med **49**(7): 1162-70.
- Dong, H., S. E. Strome, et al. (2002). "Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion." Nat Med **8**(8): 793-800.
- Dorsey, R., N. Kundu, et al. (2002). "Immunotherapy with interleukin-10 depends on the CXC chemokines inducible protein-10 and monokine induced by IFN-gamma." Cancer Res **62**(9): 2606-10.
- Druker, B. J., M. Talpaz, et al. (2001). "Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia." N Engl J Med **344**(14): 1031-7.
- Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, et al. (2002). "Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes." Science **298**(5594): 850-4.

- Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, et al. (2005). "Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma." *J Clin Oncol* **23**(10): 2346-57.
- Dunford, J. E., K. Thompson, et al. (2001). "Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates." *J Pharmacol Exp Ther* **296**(2): 235-42.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, et al. (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." *Nat Immunol* **3**(11): 991-8.
- Duval, M., P. Yotnda, et al. (1995). "Potential antileukemic effect of gamma delta T cells in acute lymphoblastic leukemia." *Leukemia* **9**(5): 863-8.
- Eberl, M., R. Engel, et al. (2002). "Differentiation of human gamma-delta T cells towards distinct memory phenotypes." *Cell Immunol* **218**(1-2): 1-6.
- Eberl, M., M. Hintz, et al. (2003). "Microbial isoprenoid biosynthesis and human gammadelta T cell activation." *FEBS Lett* **544**(1-3): 4-10.
- Eberl, M., G. W. Roberts, et al. (2009). "A rapid crosstalk of human gammadelta T cells and monocytes drives the acute inflammation in bacterial infections." *PLoS Pathog* **5**(2): e1000308.
- Ebert, L. M., S. Meuter, et al. (2006). "Homing and function of human skin gammadelta T cells and NK cells: relevance for tumor surveillance." *J Immunol* **176**(7): 4331-6.
- Edlund, M., S. Y. Sung, et al. (2004). "Modulation of prostate cancer growth in bone microenvironments." *J Cell Biochem* **91**(4): 686-705.
- Egen, J. G., M. S. Kuhns, et al. (2002). "CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy." *Nat Immunol* **3**(7): 611-8.
- Elgert, K. D., D. G. Alleva, et al. (1998). "Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection." *J Leukoc Biol* **64**(3): 275-90.
- Engel, A. M., I. M. Svane, et al. (1997). "MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice." *Scand J Immunol* **45**(5): 463-70.
- Enzler, T., S. Gillessen, et al. (2003). "Deficiencies of GM-CSF and interferon gamma link inflammation and cancer." *J Exp Med* **197**(9): 1213-9.
- Falini, B., L. Flenghi, et al. (1989). "Distribution of T cells bearing different forms of the T cell receptor gamma/delta in normal and pathological human tissues." *J Immunol* **143**(8): 2480-8.
- Faure, F., S. Jitsukawa, et al. (1990). "CD1c as a target recognition structure for human T lymphocytes: analysis with peripheral blood gamma/delta cells." *Eur J Immunol* **20**(3): 703-6.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." *Cell* **61**(5): 759-67.
- Fenoglio, D., A. Poggi, et al. (2009). "Vdelta1 T lymphocytes producing IFN-gamma and IL-17 are expanded in HIV-1-infected patients and respond to *Candida albicans*." *Blood* **113**(26): 6611-8.
- Ferrarini, M., S. Heltai, et al. (1994). "V delta 1+ gamma/delta T lymphocytes infiltrating human lung cancer express the CD8 alpha/alpha homodimer." *Scand J Immunol* **40**(3): 363-7.
- Ferrero, E., P. Biswas, et al. (2003). "Macrophages exposed to *Mycobacterium tuberculosis* release chemokines able to recruit selected leucocyte subpopulations: focus on gammadelta cells." *Immunology* **108**(3): 365-74.
- Ferrero, E., M. Fabbri, et al. (1998). "Tumor-driven matrix invasion by infiltrating lymphocytes: involvement of the alpha1 integrin I-domain." *Eur J Immunol* **28**(8): 2530-6.
- Fidler, I. J. (2003). "The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited." *Nat Rev Cancer* **3**(6): 453-8.

- Fisch, P., M. Malkovsky, et al. (1990). "Recognition by human V gamma 9/V delta 2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells." Science **250**(4985): 1269-73.
- Fisch, P., E. Meuer, et al. (1997). "Control of B cell lymphoma recognition via natural killer inhibitory receptors implies a role for human Vgamma9/Vdelta2 T cells in tumor immunity." Eur J Immunol **27**(12): 3368-79.
- Fisch, P., A. Moris, et al. (2000). "Inhibitory MHC class I receptors on gammadelta T cells in tumour immunity and autoimmunity." Immunol Today **21**(4): 187-91.
- Flatmark, K., G. M. Maeldansmo, et al. (2004). "Twelve colorectal cancer cell lines exhibit highly variable growth and metastatic capacities in an orthotopic model in nude mice." Eur J Cancer **40**(10): 1593-8.
- Foulds, L. (1954). "The experimental study of tumor progression: a review." Cancer Res **14**(5): 327-39.
- Frattini, M., D. Balestra, et al. (2004). "Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis." Clin Cancer Res **10**(12 Pt 1): 4015-21.
- Friberg, S. and S. Mattson (1997). "On the growth rates of human malignant tumors: implications for medical decision making." J Surg Oncol **65**(4): 284-97.
- Friedl, P. and B. Weigelin (2008). "Interstitial leukocyte migration and immune function." Nat Immunol **9**(9): 960-9.
- Fu, X. Y., J. M. Besterman, et al. (1991). "Models of human metastatic colon cancer in nude mice orthotopically constructed by using histologically intact patient specimens." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(20): 9345-9.
- Fuchs, E. J. and P. Matzinger (1996). "Is cancer dangerous to the immune system?" Semin Immunol **8**(5): 271-80.
- Furuya, M., T. Suyama, et al. (2007). "Up-regulation of CXC chemokines and their receptors: implications for proinflammatory microenvironments of ovarian carcinomas and endometriosis." Hum Pathol **38**(11): 1676-87.
- Fynan, T. M. and M. Reiss (1993). "Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-beta and its role in oncogenesis." Crit Rev Oncog **4**(5): 493-540.
- Gafa, V., M. E. Remoli, et al. (2007). "In vitro infection of human dendritic cells by *Aspergillus fumigatus* conidia triggers the secretion of chemokines for neutrophil and Th1 lymphocyte recruitment." Microbes Infect **9**(8): 971-80.
- Gallucci, S., M. Lolkema, et al. (1999). "Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells." Nat Med **5**(11): 1249-55.
- Galon, J., A. Costes, et al. (2006). "Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome." Science **313**(5795): 1960-4.
- Galon, J., W. H. Fridman, et al. (2007). "The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective." Cancer Res **67**(5): 1883-6.
- Gao, S. Q., Y. Sun, et al. (2009). "Antitumor Efficacy of Colon-Specific HPMACopolymer/9-Aminocamptothecin Conjugates in Mice Bearing Human-Colon Carcinoma Xenografts." Macromol Biosci.
- Gao, X., D. Saha, et al. (2009). "Radiosensitization of HT-29 cells and xenografts by the nitric oxide donor DETANONOate." J Surg Oncol **100**(2): 149-58.
- Gao, Y., W. Yang, et al. (2003). "Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity." J Exp Med **198**(3): 433-42.
- Garofalo, A., R. G. Chirivi, et al. (1993). "Comparative study on the metastatic behavior of human tumors in nude, beige/nude/xid and severe combined immunodeficient mice." Invasion Metastasis **13**(2): 82-91.
- Gatti, R. A. and R. A. Good (1971). "Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review." Cancer **28**(1): 89-98.

- Gattinoni, L., S. E. Finkelstein, et al. (2005). "Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells." *J Exp Med* **202**(7): 907-12.
- Geronimi, F., E. Richard, et al. (2003). "Highly efficient lentiviral gene transfer in CD34+ and CD34+/38-/lin- cells from mobilized peripheral blood after cytokine prestimulation." *Stem Cells* **21**(4): 472-80.
- Gertner-Dardenne, J., C. Bonnafous, et al. (2009). "Bromohydrin pyrophosphate enhances antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by therapeutic antibodies." *Blood* **113**(20): 4875-84.
- Ghiringhelli, F., L. Apetoh, et al. (2009). "Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors." *Nat Med* **15**(10): 1170-8.
- Giacomelli, R., M. Matucci-Cerinic, et al. (1998). "Circulating Vdelta1+ T cells are activated and accumulate in the skin of systemic sclerosis patients." *Arthritis Rheum* **41**(2): 327-34.
- Giacomelli, R., I. Parzanese, et al. (1994). "Increase of circulating gamma/delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients affected by active inflammatory bowel disease." *Clin Exp Immunol* **98**(1): 83-8.
- Giavazzi, R., D. E. Campbell, et al. (1986). "Metastatic behavior of tumor cells isolated from primary and metastatic human colorectal carcinomas implanted into different sites in nude mice." *Cancer Res* **46**(4 Pt 2): 1928-33.
- Girardi, M., E. Glusac, et al. (2003). "The distinct contributions of murine T cell receptor (TCR)gammadelta+ and TCRAlphabeta+ T cells to different stages of chemically induced skin cancer." *J Exp Med* **198**(5): 747-55.
- Girardi, M., D. Oppenheim, et al. (2004). "Characterizing the protective component of the alphabeta T cell response to transplantable squamous cell carcinoma." *J Invest Dermatol* **122**(3): 699-706.
- Girardi, M., D. E. Oppenheim, et al. (2001). "Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells." *Science* **294**(5542): 605-9.
- Girlanda, S., C. Fortis, et al. (2005). "MICA expressed by multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance plasma cells Costimulates pamidronate-activated gammadelta lymphocytes." *Cancer Res* **65**(16): 7502-8.
- Glatzel, A., F. Entschladen, et al. (2002). "The responsiveness of human V delta 1 gamma delta T cells to *Borrelia burgdorferi* is largely restricted to synovial-fluid cells from patients with Lyme arthritis." *J Infect Dis* **186**(7): 1043-6.
- Glatzel, A., D. Wesch, et al. (2002). "Patterns of chemokine receptor expression on peripheral blood gamma delta T lymphocytes: strong expression of CCR5 is a selective feature of V delta 2/V gamma 9 gamma delta T cells." *J Immunol* **168**(10): 4920-9.
- Gober, H. J., M. Kistowska, et al. (2003). "Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells." *J Exp Med* **197**(2): 163-8.
- Godfrey, D. I., K. J. Hammond, et al. (2000). "NKT cells: facts, functions and fallacies." *Immunol Today* **21**(11): 573-83.
- Goldman, J. P., M. P. Blundell, et al. (1998). "Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor gamma chain." *Br J Haematol* **103**(2): 335-42.
- Gomes, C. M., M. Welling, et al. (2007). "Functional imaging of multidrug resistance in an orthotopic model of osteosarcoma using 99mTc-sestamibi." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **34**(11): 1793-803.
- Goodier, M. R., C. Lundqvist, et al. (1995). "Cytokine profiles for human V gamma 9+ T cells stimulated by *Plasmodium falciparum*." *Parasite Immunol* **17**(8): 413-23.
- Gougeon, M. L., S. Boullier, et al. (1999). "NKR-mediated control of gammadelta T-cell immunity to viruses." *Microbes Infect* **1**(3): 219-26.

- Gout, S. and J. Huot (2008). "Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer." Cancer Microenviron **1**(1): 69-83.
- Grant, G. A. and J. F. Miller (1965). "Effect of neonatal thymectomy on the induction of sarcomata in C57 BL mice." Nature **205**(976): 1124-5.
- Green, J. R. (2003). "Antitumor effects of bisphosphonates." Cancer **97**(3 Suppl): 840-7.
- Greer, L. F., 3rd and A. A. Szalay (2002). "Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review." Luminescence **17**(1): 43-74.
- Groh, V., S. Porcelli, et al. (1989). "Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system." J Exp Med **169**(4): 1277-94.
- Groh, V., R. Rhinehart, et al. (1999). "Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6879-84.
- Groh, V., A. Steinle, et al. (1998). "Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells." Science **279**(5357): 1737-40.
- Groh, V., J. Wu, et al. (2002). "Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation." Nature **419**(6908): 734-8.
- Guilbaud, N., L. Kraus-Berthier, et al. (2001). "Marked antitumor activity of a new potent acronycine derivative in orthotopic models of human solid tumors." Clin Cancer Res **7**(8): 2573-80.
- Gunthert, U., M. Hofmann, et al. (1991). "A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells." Cell **65**(1): 13-24.
- Guo, B. L., Z. Liu, et al. (2005). "Innate anti-breast cancer immunity of apoptosis-resistant human gammadelta-T cells." Breast Cancer Res Treat **93**(2): 169-75.
- Gupta, G. P. and J. Massague (2006). "Cancer metastasis: building a framework." Cell **127**(4): 679-95.
- Haas, W., P. Pereira, et al. (1993). "Gamma/delta cells." Annu Rev Immunol **11**: 637-85.
- Hacker, G., S. Kromer, et al. (1992). "V delta 1+ subset of human gamma delta T cells responds to ligands expressed by EBV-infected Burkitt lymphoma cells and transformed B lymphocytes." J Immunol **149**(12): 3984-9.
- Halary, F., V. Pitard, et al. (2005). "Shared reactivity of V{delta}2(neg) {gamma}{delta} T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells." J Exp Med **201**(10): 1567-78.
- Halene, S., L. Wang, et al. (1999). "Improved expression in hematopoietic and lymphoid cells in mice after transplantation of bone marrow transduced with a modified retroviral vector." Blood **94**(10): 3349-57.
- Halliday, G. M., A. Patel, et al. (1995). "Spontaneous regression of human melanoma/nonmelanoma skin cancer: association with infiltrating CD4+ T cells." World J Surg **19**(3): 352-8.
- Hamada, K., M. Monnai, et al. (2008). "Liver metastasis models of colon cancer for evaluation of drug efficacy using NOD/Shi-scid IL2Rgammanull (NOG) mice." Int J Oncol **32**(1): 153-9.
- Hamada, S., M. Umemura, et al. (2008). "IL-17A produced by gammadelta T cells plays a critical role in innate immunity against listeria monocytogenes infection in the liver." J Immunol **181**(5): 3456-63.
- Hamblin, M. R., M. Del Governatore, et al. (2000). "Biodistribution of charged 17.1A photoimmunoconjugates in a murine model of hepatic metastasis of colorectal cancer." Br J Cancer **83**(11): 1544-51.
- Hanahan, D. and J. Folkman (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." Cell **86**(3): 353-64.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

- Hanninen, A. and L. C. Harrison (2000). "Gamma delta T cells as mediators of mucosal tolerance: the autoimmune diabetes model." Immunol Rev **173**: 109-19.
- Hara, T., T. Katakai, et al. (2006). "A transmembrane chemokine, CXC chemokine ligand 16, expressed by lymph node fibroblastic reticular cells has the potential to regulate T cell migration and adhesion." Int Immunol **18**(2): 301-11.
- Hara, T., Y. Mizuno, et al. (1992). "Predominant activation and expansion of V gamma 9-bearing gamma delta T cells in vivo as well as in vitro in Salmonella infection." J Clin Invest **90**(1): 204-10.
- Havran, W. L. and R. Boismenu (1994). "Activation and function of gamma delta T cells." Curr Opin Immunol **6**(3): 442-6.
- Havran, W. L., Y. H. Chien, et al. (1991). "Recognition of self antigens by skin-derived T cells with invariant gamma delta antigen receptors." Science **252**(5011): 1430-2.
- Hayday, A., E. Theodoridis, et al. (2001). "Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology." Nat Immunol **2**(11): 997-1003.
- Hayday, A. and R. Tigelaar (2003). "Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells." Nat Rev Immunol **3**(3): 233-42.
- Hayday, A. C. (2000). "[gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection." Annu Rev Immunol **18**: 975-1026.
- Hayday, A. C. (2009). "Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response." Immunity **31**(2): 184-96.
- Hecht, J. R., E. Mitchell, et al. (2009). "A randomized phase IIIB trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer." J Clin Oncol **27**(5): 672-80.
- Heise, C. E., A. Pahuja, et al. (2005). "Pharmacological characterization of CXC chemokine receptor 3 ligands and a small molecule antagonist." J Pharmacol Exp Ther **313**(3): 1263-71.
- Hernandez-Ilizaliturri, F. J. and M. S. Czuczman (2009). "Therapeutic options in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. Part 1. current treatment approaches." Oncology (Williston Park) **23**(6): 546-53.
- Hess, K. R., G. R. Varadhachary, et al. (2006). "Metastatic patterns in adenocarcinoma." Cancer **106**(7): 1624-33.
- Hintz, M., A. Reichenberg, et al. (2001). "Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human gammadelta T cells in Escherichia coli." FEBS Lett **509**(2): 317-22.
- Ho, M., H. K. Webster, et al. (1990). "Increased gamma delta T cells in acute Plasmodium falciparum malaria." Immunol Lett **25**(1-3): 139-41.
- Holtmeier, W., Y. Chowers, et al. (1995). "The delta T cell receptor repertoire in human colon and peripheral blood is oligoclonal irrespective of V region usage." J Clin Invest **96**(2): 1108-17.
- Holtmeier, W., M. Pfander, et al. (2001). "The TCR-delta repertoire in normal human skin is restricted and distinct from the TCR-delta repertoire in the peripheral blood." J Invest Dermatol **116**(2): 275-80.
- Huang, A. Y., P. Golumbek, et al. (1994). "Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens." Science **264**(5161): 961-5.
- Huang, E. H., B. Singh, et al. (2009). "A CXCR4 antagonist CTCE-9908 inhibits primary tumor growth and metastasis of breast cancer." J Surg Res **155**(2): 231-6.
- Huber, S., C. Shi, et al. (2002). "Gammadelta T cells promote a Th1 response during coxsackievirus B3 infection in vivo: role of Fas and Fas ligand." J Virol **76**(13): 6487-94.
- Hurwitz, H., L. Fehrenbacher, et al. (2004). "Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer." N Engl J Med **350**(23): 2335-42.

- Hyjek, E. M., J. Bartkowiak, et al. (1997). "Evidence for B cell-mediated activation of V delta 1+ T lymphocytes during progression of HIV infection." *J Immunol* **158**(1): 464-74.
- Iihara, K., K. Yamaguchi, et al. (2004). "Spontaneous regression of malignant lymphoma of the breast." *Pathol Int* **54**(7): 537-42.
- Ikeda, H., L. J. Old, et al. (2002). "The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting." *Cytokine Growth Factor Rev* **13**(2): 95-109.
- Inman, B. A., X. Frigola, et al. (2008). "Questionable relevance of gamma delta T lymphocytes in renal cell carcinoma." *J Immunol* **180**(5): 3578-84.
- Ishikawa, A., S. Motohashi, et al. (2005). "A phase I study of alpha-galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer." *Clin Cancer Res* **11**(5): 1910-7.
- Ito, M., H. Hiramatsu, et al. (2002). "NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells." *Blood* **100**(9): 3175-82.
- Janeway, C. A., Jr., B. Jones, et al. (1988). "Specificity and function of T cells bearing gamma delta receptors." *Immunol Today* **9**(3): 73-6.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2008). "Cancer statistics, 2008." *CA Cancer J Clin* **58**(2): 71-96.
- Jenkins, D. E., Y. Oei, et al. (2003). "Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis." *Clin Exp Metastasis* **20**(8): 733-44.
- Ji, X., L. Cheng, et al. (2009). "Non-invasive visualization of retinoblastoma growth and metastasis via bioluminescence imaging." *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
- Jojovic, M. and U. Schumacher (2000). "Quantitative assessment of spontaneous lung metastases of human HT29 colon cancer cells transplanted into SCID mice." *Cancer Lett* **152**(2): 151-6.
- Jomaa, H., J. Feurle, et al. (1999). "Vgamma9/Vdelta2 T cell activation induced by bacterial low molecular mass compounds depends on the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis." *FEMS Immunol Med Microbiol* **25**(4): 371-8.
- Jouen-Beades, F., E. Paris, et al. (1997). "In vivo and in vitro activation and expansion of gammadelta T cells during *Listeria monocytogenes* infection in humans." *Infect Immun* **65**(10): 4267-72.
- Jubb, A. M., S. M. Bell, et al. (2001). "Methylation and colorectal cancer." *J Pathol* **195**(1): 111-34.
- Kabelitz, D. and D. Wesch (2003). "Features and functions of gamma delta T lymphocytes: focus on chemokines and their receptors." *Crit Rev Immunol* **23**(5-6): 339-70.
- Kabelitz, D., D. Wesch, et al. (2007). "Perspectives of gammadelta T cells in tumor immunology." *Cancer Res* **67**(1): 5-8.
- Kabelitz, D., D. Wesch, et al. (1999). "gamma delta T cells, their T cell receptor usage and role in human diseases." *Springer Semin Immunopathol* **21**(1): 55-75.
- Kabelitz, D., D. Wesch, et al. (2004). "Characterization of tumor reactivity of human V gamma 9V delta 2 gamma delta T cells in vitro and in SCID mice in vivo." *J Immunol* **173**(11): 6767-76.
- Kabelitz, D., D. Wesch, et al. (2004). "Potential of human gammadelta T lymphocytes for immunotherapy of cancer." *Int J Cancer* **112**(5): 727-32.
- Kakinuma, T. and S. T. Hwang (2006). "Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis." *J Leukoc Biol* **79**(4): 639-51.
- Kapiteijn, E., G. J. Liefers, et al. (2001). "Mechanisms of oncogenesis in colon versus rectal cancer." *J Pathol* **195**(2): 171-8.
- Kaplan, D. H., V. Shankaran, et al. (1998). "Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7556-61.
- Kaplan, H. S. (1971). "Role of immunologic disturbance in human oncogenesis: some facts and fancies." *Br J Cancer* **25**(4): 620-34.

- Karrison, T. G., D. J. Ferguson, et al. (1999). "Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy." J Natl Cancer Inst **91**(1): 80-5.
- Kato, Y., Y. Tanaka, et al. (2001). "Targeting of tumor cells for human gammadelta T cells by nonpeptide antigens." J Immunol **167**(9): 5092-8.
- Kauffman, H. M., M. A. McBride, et al. (2000). "First report of the United Network for Organ Sharing Transplant Tumor Registry: donors with a history of cancer." Transplantation **70**(12): 1747-51.
- Kaufmann, S. H. (1996). "gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do?" Proc Natl Acad Sci U S A **93**(6): 2272-9.
- Kawada, K., H. Hosogi, et al. (2007). "Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes." Oncogene **26**(32): 4679-88.
- Ke, Y., L. M. Kapp, et al. (2003). "Inhibition of tumor rejection by gammadelta T cells and IL-10." Cell Immunol **221**(2): 107-14.
- Kelly, P. N., A. Dakic, et al. (2007). "Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells." Science **317**(5836): 337.
- Kennedy, J., G. S. Kelner, et al. (1995). "Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin." J Immunol **155**(1): 203-9.
- Kerr, K. M., S. K. Johnson, et al. (1998). "Partial regression in primary carcinoma of the lung: does it occur?" Histopathology **33**(1): 55-63.
- Keyaerts, M., J. Verschueren, et al. (2008). "Dynamic bioluminescence imaging for quantitative tumour burden assessment using IV or IP administration of D: -luciferin: effect on intensity, time kinetics and repeatability of photon emission." Eur J Nucl Med Mol Imaging **35**(5): 999-1007.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell **87**(2): 159-70.
- Klein, C. A. (2008). "Cancer. The metastasis cascade." Science **321**(5897): 1785-7.
- Klein, C. A. (2009). "Parallel progression of primary tumours and metastases." Nat Rev Cancer **9**(4): 302-12.
- Klein, G. (1998). "Foulds' dangerous idea revisited: the multistep development of tumors 40 years later." Adv Cancer Res **72**: 1-23.
- Kline, C. L., S. S. Shanmugavelandy, et al. (2009). "Delivery of PAR-4 plasmid in vivo via nanoliposomes sensitizes colon tumor cells subcutaneously implanted into nude mice to 5-FU." Cancer Biol Ther **8**(19).
- Kobayashi, H., Y. Tanaka, et al. (2007). "Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using gamma-delta T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study." Cancer Immunol Immunother **56**(4): 469-76.
- Kobayashi, H., Y. Tanaka, et al. (2001). "Gamma/delta T cells provide innate immunity against renal cell carcinoma." Cancer Immunol Immunother **50**(3): 115-24.
- Koebel, C. M., W. Vermi, et al. (2007). "Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state." Nature **450**(7171): 903-7.
- Koizumi, H., C. C. Liu, et al. (1991). "Expression of perforin and serine esterases by human gamma/delta T cells." J Exp Med **173**(2): 499-502.
- Kojima, T., Y. Hashimoto, et al. (2009). "A simple biological imaging system for detecting viable human circulating tumor cells." J Clin Invest.
- Kolinsky, K., Y. E. Zhang, et al. (2009). "Novel regimens of capecitabine alone and combined with irinotecan and bevacizumab in colorectal cancer xenografts." Anticancer Res **29**(1): 91-8.
- Kondo, M., K. Sakuta, et al. (2008). "Zoledronate facilitates large-scale ex vivo expansion of functional gammadelta T cells from cancer patients for use in adoptive immunotherapy." Cytotherapy **10**(8): 842-56.

- Kong, Y., W. Cao, et al. (2009). "The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCRgamma9/delta2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCRgammadelta and NKG2D." Blood **114**(2): 310-7.
- Kowalczyk, D., W. Skorupski, et al. (1996). "Activated gamma/delta T lymphocytes infiltrating renal cell carcinoma." Immunol Lett **53**(1): 15-8.
- Kowalczyk, D., W. Skorupski, et al. (1997). "Flow cytometric analysis of tumour-infiltrating lymphocytes in patients with renal cell carcinoma." Br J Urol **80**(4): 543-7.
- Kronenberg, M. and W. L. Havran (2007). "Frontline T cells: gammadelta T cells and intraepithelial lymphocytes." Immunol Rev **215**: 5-7.
- Kruger-Krasagakes, S., K. Krasagakis, et al. (1994). "Expression of interleukin 10 in human melanoma." Br J Cancer **70**(6): 1182-5.
- Kumar, A., M. Commane, et al. (1997). "Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases." Science **278**(5343): 1630-2.
- Kunzmann, V., E. Bauer, et al. (2000). "Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma." Blood **96**(2): 384-92.
- Kunzmann, V., E. Bauer, et al. (1999). "Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate." N Engl J Med **340**(9): 737-8.
- Kunzmann, V., B. Kimmel, et al. (2009). "Inhibition of phosphoantigen-mediated gammadelta T-cell proliferation by CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells." Immunology **126**(2): 256-67.
- Kurt, R. A., J. A. Park, et al. (2000). "TCR v(beta) usage and clonality of T cells isolated from progressing and rejected tumor sites before and after in vitro culture." Int Immunol **12**(5): 639-46.
- Kurts, C., W. R. Heath, et al. (1996). "Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo." J Exp Med **184**(3): 923-30.
- Lafarge, X., P. Merville, et al. (2001). "Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role." J Infect Dis **184**(5): 533-41.
- Lafarge, X., V. Pitard, et al. (2005). "Expression of MHC class I receptors confers functional intraclonal heterogeneity to a reactive expansion of gammadelta T cells." Eur J Immunol **35**(6): 1896-905.
- Lafont, V., J. Liautard, et al. (2000). "Tumor necrosis factor-alpha production is differently regulated in gamma delta and alpha beta human T lymphocytes." J Biol Chem **275**(25): 19282-7.
- Lafont, V., J. Liautard, et al. (2001). "Production of TNF-alpha by human V gamma 9V delta 2 T cells via engagement of Fc gamma RIIIA, the low affinity type 3 receptor for the Fc portion of IgG, expressed upon TCR activation by nonpeptidic antigen." J Immunol **166**(12): 7190-9.
- Laggner, U., J. S. Lopez, et al. (2009). "Regression of melanoma metastases following treatment with the n-bisphosphonate zoledronate and localised radiotherapy." Clin Immunol **131**(3): 367-73.
- Lalor, P. F., W. K. Lai, et al. (2006). "Human hepatic sinusoidal endothelial cells can be distinguished by expression of phenotypic markers related to their specialised functions in vivo." World J Gastroenterol **12**(34): 5429-39.
- Lamb, L. S., Jr., P. Musk, et al. (2001). "Human gammadelta(+) T lymphocytes have in vitro graft vs leukemia activity in the absence of an allogeneic response." Bone Marrow Transplant **27**(6): 601-6.
- Lanier, L. L., T. J. Kipps, et al. (1985). "Functional properties of a unique subset of cytotoxic CD3+ T lymphocytes that express Fc receptors for IgG (CD16/Leu-11 antigen)." J Exp Med **162**(6): 2089-106.

- Lanier, L. L., J. Ruitenber, et al. (1988). "Structural and serological heterogeneity of gamma/delta T cell antigen receptor expression in thymus and peripheral blood." Eur J Immunol **18**(12): 1985-92.
- Lantz, O., L. I. Sharara, et al. (1997). "Lineage relationships and differentiation of natural killer (NK) T cells: intrathymic selection and interleukin (IL)-4 production in the absence of NKR-P1 and Ly49 molecules." J Exp Med **185**(8): 1395-401.
- Lapidot, T., C. Sirard, et al. (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." Nature **367**(6464): 645-8.
- Lasagni, L., M. Francalanci, et al. (2003). "An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4." J Exp Med **197**(11): 1537-49.
- Le Bon, A. and D. F. Tough (2002). "Links between innate and adaptive immunity via type I interferon." Curr Opin Immunol **14**(4): 432-6.
- Leach, D. R., M. F. Krummel, et al. (1996). "Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade." Science **271**(5256): 1734-6.
- Lefranc, M. P. and T. H. Rabbitts (1990). "Genetic organization of the human T-cell receptor gamma and delta loci." Res Immunol **141**(7): 565-77.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler, et al. (1998). "Genetic instabilities in human cancers." Nature **396**(6712): 643-9.
- Leslie, D. S., M. S. Vincent, et al. (2002). "CD1-mediated gamma/delta T cell maturation of dendritic cells." J Exp Med **196**(12): 1575-84.
- Li, L. N., H. D. Zhang, et al. (2007). "Artesunate attenuates the growth of human colorectal carcinoma and inhibits hyperactive Wnt/beta-catenin pathway." Int J Cancer **121**(6): 1360-5.
- Li, X., M. T. Lewis, et al. (2008). "Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy." J Natl Cancer Inst **100**(9): 672-9.
- Liao, F., R. L. Rabin, et al. (1995). "Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization." J Exp Med **182**(5): 1301-14.
- Liu, Z., I. E. Eltoun, et al. (2008). "Protective immunosurveillance and therapeutic antitumor activity of gammadelta T cells demonstrated in a mouse model of prostate cancer." J Immunol **180**(9): 6044-53.
- Liu, Z., B. L. Guo, et al. (2005). "Ex vivo expanded human Vgamma9Vdelta2+ gammadelta-T cells mediate innate antitumor activity against human prostate cancer cells in vitro." J Urol **173**(5): 1552-6.
- Lockhart, E., A. M. Green, et al. (2006). "IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection." J Immunol **177**(7): 4662-9.
- Lozupone, F., D. Pende, et al. (2004). "Effect of human natural killer and gammadelta T cells on the growth of human autologous melanoma xenografts in SCID mice." Cancer Res **64**(1): 378-85.
- Lozupone, F., L. Rivoltini, et al. (2003). "Adoptive transfer of an anti-MART-1(27-35)-specific CD8+ T cell clone leads to immunoselection of human melanoma antigen-loss variants in SCID mice." Eur J Immunol **33**(2): 556-66.
- Lu, B. and O. J. Finn (2008). "T-cell death and cancer immune tolerance." Cell Death Differ **15**(1): 70-9.
- Lundin, J., E. Kimby, et al. (2002). "Phase II trial of subcutaneous anti-CD52 monoclonal antibody alemtuzumab (Campath-1H) as first-line treatment for patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL)." Blood **100**(3): 768-73.
- Luster, A. D. and P. Leder (1993). "IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo." J Exp Med **178**(3): 1057-65.
- Luster, A. D. and J. V. Ravetch (1987). "Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10)." J Exp Med **166**(4): 1084-97.

- Maeurer, M. J., D. Martin, et al. (1996). "Human intestinal Vdelta1+ lymphocytes recognize tumor cells of epithelial origin." J Exp Med **183**(4): 1681-96.
- Mak, T. W. and D. A. Ferrick (1998). "The gammadelta T-cell bridge: linking innate and acquired immunity." Nat Med **4**(7): 764-5.
- Maker, A. V., G. Q. Phan, et al. (2005). "Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study." Ann Surg Oncol **12**(12): 1005-16.
- Malkovska, V., F. K. Cigel, et al. (1992). "Antilymphoma activity of human gamma delta T-cells in mice with severe combined immune deficiency." Cancer Res **52**(20): 5610-6.
- Marcus, R., K. Imrie, et al. (2005). "CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma." Blood **105**(4): 1417-23.
- Markowitz, S., J. Wang, et al. (1995). "Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability." Science **268**(5215): 1336-8.
- Marroquin, C. E., J. A. Westwood, et al. (2002). "Mobilization of dendritic cell precursors in patients with cancer by flt3 ligand allows the generation of higher yields of cultured dendritic cells." J Immunother **25**(3): 278-88.
- Marsal, J., M. Svensson, et al. (2002). "Involvement of CCL25 (TECK) in the generation of the murine small-intestinal CD8alpha alpha+CD3+ intraepithelial lymphocyte compartment." Eur J Immunol **32**(12): 3488-97.
- Marten, A., M. von Lilienfeld-Toal, et al. (2006). "Soluble MIC is elevated in the serum of patients with pancreatic carcinoma diminishing gammadelta T cell cytotoxicity." Int J Cancer **119**(10): 2359-65.
- Martin, B., K. Hirota, et al. (2009). "Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals." Immunity **31**(2): 321-30.
- Matrisian, L. M., G. T. Bowden, et al. (1986). "The mRNA coding for the secreted protease transin is expressed more abundantly in malignant than in benign tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(24): 9413-7.
- Matsuda, S., S. Kudoh, et al. (2001). "Enhanced formation of azoxymethane-induced colorectal adenocarcinoma in gammadelta T lymphocyte-deficient mice." Jpn J Cancer Res **92**(8): 880-5.
- Matsumoto, S., M. G. Espey, et al. (2008). "Dynamic monitoring of localized tumor oxygenation changes using RF pulsed electron paramagnetic resonance in conscious mice." Magn Reson Med **59**(3): 619-25.
- Mattarollo, S. R., T. Kenna, et al. (2007). "Chemotherapy and zoledronate sensitize solid tumour cells to Vgamma9Vdelta2 T cell cytotoxicity." Cancer Immunol Immunother **56**(8): 1285-97.
- McClanahan, J., P. I. Fukushima, et al. (1999). "Increased peripheral blood gamma delta T-cells in patients with lymphoid neoplasia: A diagnostic dilemma in flow cytometry." Cytometry **38**(6): 280-5.
- McDonnell, T. J. and S. J. Korsmeyer (1991). "Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18)." Nature **349**(6306): 254-6.
- McLaughlin, P., A. J. Grillo-Lopez, et al. (1998). "Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program." J Clin Oncol **16**(8): 2825-33.
- Meeh, P. F., M. King, et al. (2006). "Characterization of the gammadelta T cell response to acute leukemia." Cancer Immunol Immunother **55**(9): 1072-80.
- Meijer, J., I. S. Zeelenberg, et al. (2006). "The CXCR5 chemokine receptor is expressed by carcinoma cells and promotes growth of colon carcinoma in the liver." Cancer Res **66**(19): 9576-82.

- Mellado, M., J. M. Rodriguez-Frade, et al. (2001). "Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation." Annu Rev Immunol **19**: 397-421.
- Meresse, B., Z. Chen, et al. (2004). "Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease." Immunity **21**(3): 357-66.
- Merville, P., J. Dechanet, et al. (2000). "Cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients is followed by a prolonged expansion of gammadelta T lymphocytes." Transplant Proc **32**(2): 357-9.
- Minn, A. J., G. P. Gupta, et al. (2005). "Genes that mediate breast cancer metastasis to lung." Nature **436**(7050): 518-24.
- Mitchell, B. S., H. P. Horny, et al. (1997). "Immunophenotyping of human HT29 colon cancer cell primary tumours and their metastases in severe combined immunodeficient mice." Histochem J **29**(5): 393-9.
- Miyagawa, F., Y. Tanaka, et al. (2001). "Essential requirement of antigen presentation by monocyte lineage cells for the activation of primary human gamma delta T cells by aminobisphosphonate antigen." J Immunol **166**(9): 5508-14.
- Miyake, K., M. Shimada, et al. (2009). "Downregulation of matrix metalloprotease-9 and urokinase plasminogen activator by TX-1877 results in decreased tumor growth and metastasis on xenograft model of rectal cancer." Cancer Chemother Pharmacol **64**(5): 885-92.
- Miyamoto, M., Y. Shimizu, et al. (1998). "Effect of interleukin-8 on production of tumor-associated substances and autocrine growth of human liver and pancreatic cancer cells." Cancer Immunol Immunother **47**(1): 47-57.
- Miyawaki, T., Y. Kasahara, et al. (1990). "Differential expression of CD45RO (UCHL1) and its functional relevance in two subpopulations of circulating TCR-gamma/delta+ lymphocytes." J Exp Med **171**(5): 1833-8.
- Moingeon, P., A. Ythier, et al. (1986). "A unique T-cell receptor complex expressed on human fetal lymphocytes displaying natural-killer-like activity." Nature **323**(6089): 638-40.
- Mombaerts, P., J. Iacomini, et al. (1992). "RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes." Cell **68**(5): 869-77.
- Morgan, R. A., M. E. Dudley, et al. (2006). "Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes." Science **314**(5796): 126-9.
- Morita, C. T., C. Jin, et al. (2007). "Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens." Immunol Rev **215**: 59-76.
- Morita, C. T., H. Li, et al. (2001). "Superantigen recognition by gammadelta T cells: SEA recognition site for human Vgamma2 T cell receptors." Immunity **14**(3): 331-44.
- Moser, B. and M. Brandes (2006). "Gammadelta T cells: an alternative type of professional APC." Trends Immunol **27**(3): 112-8.
- Moser, B. and M. Eberl (2007). "gammadelta T cells: novel initiators of adaptive immunity." Immunol Rev **215**: 89-102.
- Moser, B. and P. Loetscher (2001). "Lymphocyte traffic control by chemokines." Nat Immunol **2**(2): 123-8.
- Moser, B. and K. Willmann (2004). "Chemokines: role in inflammation and immune surveillance." Ann Rheum Dis **63 Suppl 2**: ii84-ii89.
- Moser, B., M. Wolf, et al. (2004). "Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control." Trends Immunol **25**(2): 75-84.

- Motohashi, S., K. Nagato, et al. (2009). "A phase I-II study of alpha-galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer." *J Immunol* **182**(4): 2492-501.
- Mrass, P., H. Takano, et al. (2006). "Random migration precedes stable target cell interactions of tumor-infiltrating T cells." *J Exp Med* **203**(12): 2749-61.
- Mueller, A., A. Meiser, et al. (2008). "CXCL4-induced migration of activated T lymphocytes is mediated by the chemokine receptor CXCR3." *J Leukoc Biol* **83**(4): 875-82.
- Mueller, M. M. and N. E. Fusenig (2004). "Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer." *Nat Rev Cancer* **4**(11): 839-49.
- Muller, A., B. Homey, et al. (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." *Nature* **410**(6824): 50-6.
- Munn, D. H. and A. L. Mellor (2007). "Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance." *J Clin Invest* **117**(5): 1147-54.
- Murphy, W. J., T. C. Back, et al. (1993). "Antitumor effects of interleukin-7 and adoptive immunotherapy on human colon carcinoma xenografts." *J Clin Invest* **92**(4): 1918-24.
- Murphy, W. J., K. C. Conlon, et al. (1993). "Engraftment and activity of anti-CD3-activated human peripheral blood lymphocytes transferred into mice with severe combined immune deficiency." *J Immunol* **150**(8 Pt 1): 3634-42.
- Murzenok, P. P., D. Matusevicius, et al. (2002). "gamma/delta T cells in multiple sclerosis: chemokine and chemokine receptor expression." *Clin Immunol* **103**(3 Pt 1): 309-16.
- Nacopoulou, L., P. Azaris, et al. (1981). "Prognostic significance of histologic host response in cancer of the large bowel." *Cancer* **47**(5): 930-6.
- Nagamine, I., Y. Yamaguchi, et al. (2009). "Induction of gamma delta T cells using zoledronate plus interleukin-2 in patients with metastatic cancer." *Hiroshima J Med Sci* **58**(1): 37-44.
- Naito, Y., K. Saito, et al. (1998). "CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer." *Cancer Res* **58**(16): 3491-4.
- Narazaki, H., E. Watari, et al. (2003). "Perforin-dependent killing of tumor cells by Vgamma1Vdelta1-bearing T-cells." *Immunol Lett* **86**(1): 113-9.
- Negus, R. P., G. W. Stamp, et al. (1997). "Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines." *Am J Pathol* **150**(5): 1723-34.
- Negus, R. P., G. W. Stamp, et al. (1995). "The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer." *J Clin Invest* **95**(5): 2391-6.
- Ng, K. and A. X. Zhu (2008). "Targeting the epidermal growth factor receptor in metastatic colorectal cancer." *Crit Rev Oncol Hematol* **65**(1): 8-20.
- Nguyen, D. X., P. D. Bos, et al. (2009). "Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization." *Nat Rev Cancer* **9**(4): 274-84.
- Nguyen, V. H., R. Zeiser, et al. (2007). "In vivo dynamics of regulatory T-cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft-versus-host disease following allogeneic transplantation." *Blood* **109**(6): 2649-56.
- Nieda, M., M. Okai, et al. (2004). "Therapeutic activation of Valpha24+Vbeta11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity." *Blood* **103**(2): 383-9.
- Norbury, K. C. and M. L. Kripke (1978). "Ultraviolet carcinogenesis in T-cell-depleted mice." *J Natl Cancer Inst* **61**(3): 917-21.
- Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." *Science* **194**(4260): 23-8.
- O'Brien, C. A., A. Pollett, et al. (2007). "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice." *Nature* **445**(7123): 106-10.

- Odoux, C., H. Fohrer, et al. (2008). "A stochastic model for cancer stem cell origin in metastatic colon cancer." *Cancer Res* **68**(17): 6932-41.
- Olive, C., P. A. Gatenby, et al. (1992). "Evidence for oligoclonality of T cell receptor delta chain transcripts expressed in rheumatoid arthritis patients." *Eur J Immunol* **22**(10): 2587-93.
- Olive, C., D. Nicol, et al. (1997). "Characterisation of gamma delta T cells in renal cell carcinoma patients by polymerase chain reaction analysis of T cell receptor transcripts." *Cancer Immunol Immunother* **44**(1): 27-34.
- Onizuka, S., I. Tawara, et al. (1999). "Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody." *Cancer Res* **59**(13): 3128-33.
- Orimo, A., P. B. Gupta, et al. (2005). "Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion." *Cell* **121**(3): 335-48.
- Otto, M., R. C. Barfield, et al. (2005). "Combination immunotherapy with clinical-scale enriched human gammadelta T cells, hu14.18 antibody, and the immunocytokine Fc-IL7 in disseminated neuroblastoma." *Clin Cancer Res* **11**(23): 8486-91.
- Owens, D. M., S. Wei, et al. (1999). "A multihit, multistage model of chemical carcinogenesis." *Carcinogenesis* **20**(9): 1837-44.
- Oyoshi, M. K., H. Nagata, et al. (2003). "Preferential expansion of Vgamma9-JgammaP/Vdelta2-Jdelta3 gammadelta T cells in nasal T-cell lymphoma and chronic active Epstein-Barr virus infection." *Am J Pathol* **162**(5): 1629-38.
- Pages, F., A. Berger, et al. (2005). "Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer." *N Engl J Med* **353**(25): 2654-66.
- Pages, F., J. Galon, et al. (2008). "The essential role of the in situ immune reaction in human colorectal cancer." *J Leukoc Biol* **84**(4): 981-7.
- Palframan, R. T., P. D. Collins, et al. (1998). "Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow." *Blood* **91**(7): 2240-8.
- Par, G., D. Rukavina, et al. (2002). "Decrease in CD3-negative-CD8dim(+) and Vdelta2/Vgamma9 TcR+ peripheral blood lymphocyte counts, low perforin expression and the impairment of natural killer cell activity is associated with chronic hepatitis C virus infection." *J Hepatol* **37**(4): 514-22.
- Pardoll, D. M. (2002). "Spinning molecular immunology into successful immunotherapy." *Nat Rev Immunol* **2**(4): 227-38.
- Park, J. Y., K. H. Park, et al. (2007). "CXCL5 overexpression is associated with late stage gastric cancer." *J Cancer Res Clin Oncol* **133**(11): 835-40.
- Parker, C. M., V. Groh, et al. (1990). "Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire." *J Exp Med* **171**(5): 1597-612.
- Paroo, Z., R. A. Bollinger, et al. (2004). "Validating bioluminescence imaging as a high-throughput, quantitative modality for assessing tumor burden." *Mol Imaging* **3**(2): 117-24.
- Pechhold, K., D. Wesch, et al. (1994). "Primary activation of V gamma 9-expressing gamma delta T cells by Mycobacterium tuberculosis. Requirement for Th1-type CD4 T cell help and inhibition by IL-10." *J Immunol* **152**(10): 4984-92.
- Peng, G., H. Y. Wang, et al. (2007). "Tumor-Infiltrating gammadelta T Cells Suppress T and Dendritic Cell Function via Mechanisms Controlled by a Unique Toll-like Receptor Signaling Pathway." *Immunity* **27**(2): 334-48.
- Peng, S. L., M. P. Madaio, et al. (1996). "Propagation and regulation of systemic autoimmunity by gammadelta T cells." *J Immunol* **157**(12): 5689-98.
- Peng, S. L., M. E. Robert, et al. (1996). "A tumor-suppressor function for Fas (CD95) revealed in T cell-deficient mice." *J Exp Med* **184**(3): 1149-54.
- Penn, I. (1988). "Tumors of the immunocompromised patient." *Annu Rev Med* **39**: 63-73.

- Penn, I. and T. E. Starzl (1970). "Malignant lymphomas in transplantation patients: a review of the world experience." Int Z Klin Pharmakol Ther Toxikol **3**(1): 49-54.
- Perera, L. P., C. K. Goldman, et al. (1999). "IL-15 induces the expression of chemokines and their receptors in T lymphocytes." J Immunol **162**(5): 2606-12.
- Peyrat, M. A., F. Davodeau, et al. (1995). "Repertoire analysis of human peripheral blood lymphocytes using a human V delta 3 region-specific monoclonal antibody. Characterization of dual T cell receptor (TCR) delta-chain expressors and alpha beta T cells expressing V delta 3J alpha C alpha-encoded TCR chains." J Immunol **155**(6): 3060-7.
- Pfeffer, K., B. Schoel, et al. (1990). "Primary responses of human T cells to mycobacteria: a frequent set of gamma/delta T cells are stimulated by protease-resistant ligands." Eur J Immunol **20**(5): 1175-9.
- Phan, G. Q., J. C. Yang, et al. (2003). "Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8372-7.
- Piccioli, D., S. Sbrana, et al. (2002). "Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells." J Exp Med **195**(3): 335-41.
- Pischon, T., U. Nothlings, et al. (2008). "Obesity and cancer." Proc Nutr Soc **67**(2): 128-45.
- Pitard, V., D. Roumanes, et al. (2008). "Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection." Blood **112**(4): 1317-24.
- Poccia, F., C. Agrati, et al. (2005). "Antiviral reactivities of gammadelta T cells." Microbes Infect **7**(3): 518-28.
- Poggi, A., R. Carosio, et al. (2004). "Migration of V delta 1 and V delta 2 T cells in response to CXCR3 and CXCR4 ligands in healthy donors and HIV-1-infected patients: competition by HIV-1 Tat." Blood **103**(6): 2205-13.
- Poggi, A., S. Catellani, et al. (2007). "Adhesion molecules and kinases involved in gammadelta T cells migratory pathways: implications for viral and autoimmune diseases." Curr Med Chem **14**(30): 3166-70.
- Poggi, A., C. Venturino, et al. (2004). "Vdelta1 T lymphocytes from B-CLL patients recognize ULBP3 expressed on leukemic B cells and up-regulated by trans-retinoic acid." Cancer Res **64**(24): 9172-9.
- Poggi, A., M. Zancolli, et al. (2007). "Migratory pathways of gammadelta T cells and response to CXCR3 and CXCR4 ligands: adhesion molecules involved and implications for multiple sclerosis pathogenesis." Ann N Y Acad Sci **1107**: 68-78.
- Poles, M. A., S. Barsoum, et al. (2003). "Human immunodeficiency virus type 1 induces persistent changes in mucosal and blood gammadelta T cells despite suppressive therapy." J Virol **77**(19): 10456-67.
- Ponomarev, E. D. and B. N. Dittel (2005). "Gamma delta T cells regulate the extent and duration of inflammation in the central nervous system by a Fas ligand-dependent mechanism." J Immunol **174**(8): 4678-87.
- Poquet, Y., M. Kroca, et al. (1998). "Expansion of Vgamma9 Vdelta2 T cells is triggered by Francisella tularensis-derived phosphoantigens in tularemia but not after tularemia vaccination." Infect Immun **66**(5): 2107-14.
- Porcelli, S., M. B. Brenner, et al. (1991). "Biology of the human gamma delta T-cell receptor." Immunol Rev **120**: 137-83.
- Porcelli, S., M. B. Brenner, et al. (1989). "Recognition of cluster of differentiation 1 antigens by human CD4-CD8-cytolytic T lymphocytes." Nature **341**(6241): 447-50.
- Potter, J. D., M. L. Slattery, et al. (1993). "Colon cancer: a review of the epidemiology." Epidemiol Rev **15**(2): 499-545.
- Poupot, M. and J. J. Fournie (2004). "Non-peptide antigens activating human Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes." Immunol Lett **95**(2): 129-38.

- Price, J. E., L. M. Daniels, et al. (1989). "Organ distribution of experimental metastases of a human colorectal carcinoma injected in nude mice." *Clin Exp Metastasis* **7**(1): 55-68.
- Puan, K. J., C. Jin, et al. (2007). "Preferential recognition of a microbial metabolite by human Vgamma2Vdelta2 T cells." *Int Immunol* **19**(5): 657-73.
- Qi, J., J. Zhang, et al. (2003). "Immobilized MICA could expand human Vdelta1 gammadelta T cells in vitro that displayed major histocompatibility complex class I chain-related A-dependent cytotoxicity to human epithelial carcinomas." *Scand J Immunol* **58**(2): 211-20.
- Quintana, E., M. Shackleton, et al. (2008). "Efficient tumour formation by single human melanoma cells." *Nature* **456**(7222): 593-8.
- Raggi, M. C., R. Djafarzadeh, et al. (2009). "Peritumoral administration of GPI-anchored TIMP-1 inhibits colon carcinoma growth in Rag-2 gamma chain-deficient mice." *Biol Chem* **390**(9): 893-7.
- Ray, P., R. Tsien, et al. (2007). "Construction and validation of improved triple fusion reporter gene vectors for molecular imaging of living subjects." *Cancer Res* **67**(7): 3085-93.
- Raziuddin, S., A. W. Telmasani, et al. (1992). "Gamma delta T cells and the immune response in visceral leishmaniasis." *Eur J Immunol* **22**(5): 1143-8.
- Razmus, I., J. Jackson, et al. (2008). "Hereditary non-polyposis colon cancer: change the name to protect the innocent." *Medsurg Nurs* **17**(6): 400-4, 410.
- Re, F., F. Poccia, et al. (2005). "Skewed representation of functionally distinct populations of Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes in aging." *Exp Gerontol* **40**(1-2): 59-66.
- Rehemtulla, A., L. D. Stegman, et al. (2000). "Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging." *Neoplasia* **2**(6): 491-5.
- Renehan, A. G., D. L. Roberts, et al. (2008). "Obesity and cancer: pathophysiological and biological mechanisms." *Arch Physiol Biochem* **114**(1): 71-83.
- Ribas, A., B. Comin-Anduix, et al. (2009). "Intratumoral immune cell infiltrates, FoxP3, and indoleamine 2,3-dioxygenase in patients with melanoma undergoing CTLA4 blockade." *Clin Cancer Res* **15**(1): 390-9.
- Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, et al. (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." *Nature* **445**(7123): 111-5.
- Ridge, J. P., E. J. Fuchs, et al. (1996). "Neonatal tolerance revisited: turning on newborn T cells with dendritic cells." *Science* **271**(5256): 1723-6.
- Rincon-Orozco, B., V. Kunzmann, et al. (2005). "Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D." *J Immunol* **175**(4): 2144-51.
- Rock, E. P., P. R. Sibbald, et al. (1994). "CDR3 length in antigen-specific immune receptors." *J Exp Med* **179**(1): 323-8.
- Romond, E. H., E. A. Perez, et al. (2005). "Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer." *N Engl J Med* **353**(16): 1673-84.
- Rooney, C. M., C. A. Smith, et al. (1995). "Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation." *Lancet* **345**(8941): 9-13.
- Rooney, C. M., C. A. Smith, et al. (1998). "Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients." *Blood* **92**(5): 1549-55.
- Rosenberg, S. A., M. T. Lotze, et al. (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." *J Natl Cancer Inst* **85**(8): 622-32.
- Rosenberg, S. A., B. S. Packard, et al. (1988). "Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report." *N Engl J Med* **319**(25): 1676-80.

- Rosenberg, S. A., N. P. Restifo, et al. (2008). "Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy." *Nat Rev Cancer* **8**(4): 299-308.
- Rosenberg, S. A., R. M. Sherry, et al. (2005). "Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8+ T cells in patients with melanoma." *J Immunol* **175**(9): 6169-76.
- Rosenberg, S. A., J. C. Yang, et al. (2004). "Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines." *Nat Med* **10**(9): 909-15.
- Rosenblatt-Velin, N., J. F. Arrighi, et al. (1997). "Transformed and nontransformed human T lymphocytes migrate to skin in a chimeric human skin/SCID mouse model." *J Invest Dermatol* **109**(6): 744-50.
- Rossol, R., J. M. Dobmeyer, et al. (1998). "Increase in Vdelta1+ gammadelta T cells in the peripheral blood and bone marrow as a selective feature of HIV-1 but not other virus infections." *Br J Haematol* **100**(4): 728-34.
- Roth, S. J., T. G. Diacovo, et al. (1998). "Transendothelial chemotaxis of human alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes to chemokines." *Eur J Immunol* **28**(1): 104-13.
- Rougier, P., E. Van Cutsem, et al. (1998). "Randomised trial of irinotecan versus fluorouracil by continuous infusion after fluorouracil failure in patients with metastatic colorectal cancer." *Lancet* **352**(9138): 1407-12.
- Roussillon, C., M. Agrapart, et al. (1990). "T lymphocytes bearing the gamma delta T cell receptor in patients with acute Plasmodium falciparum malaria." *J Infect Dis* **162**(1): 283-5.
- Russano, A. M., G. Bassotti, et al. (2007). "CD1-restricted recognition of exogenous and self-lipid antigens by duodenal gammadelta+ T lymphocytes." *J Immunol* **178**(6): 3620-6.
- Russell, J. H. and T. J. Ley (2002). "Lymphocyte-mediated cytotoxicity." *Annu Rev Immunol* **20**: 323-70.
- Rust, C. J., F. Verreck, et al. (1990). "Specific recognition of staphylococcal enterotoxin A by human T cells bearing receptors with the V gamma 9 region." *Nature* **346**(6284): 572-4.
- Sabzevari, H. and R. A. Reisfeld (1993). "Human cytotoxic T-cells suppress the growth of spontaneous melanoma metastases in SCID/hu mice." *Cancer Res* **53**(20): 4933-7.
- Saito, H., D. M. Kranz, et al. (1984). "Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences." *Nature* **309**(5971): 757-62.
- Sallusto, F., J. Geginat, et al. (2004). "Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance." *Annu Rev Immunol* **22**: 745-63.
- Sallusto, F., E. Kremmer, et al. (1999). "Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells." *Eur J Immunol* **29**(6): 2037-45.
- Sallusto, F., A. Lanzavecchia, et al. (1998). "Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses." *Immunol Today* **19**(12): 568-74.
- Sallusto, F., D. Lenig, et al. (1998). "Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes." *J Exp Med* **187**(6): 875-83.
- Salot, S., C. Laplace, et al. (2007). "Large scale expansion of gamma 9 delta 2 T lymphocytes: Innacell gamma delta cell therapy product." *J Immunol Methods* **326**(1-2): 63-75.
- Santos, E. B., R. Yeh, et al. (2009). "Sensitive in vivo imaging of T cells using a membrane-bound Gaussia princeps luciferase." *Nat Med* **15**(3): 338-44.
- Sarikonda, G., H. Wang, et al. (2008). "Photoaffinity antigens for human gammadelta T cells." *J Immunol* **181**(11): 7738-50.
- Sato, A., B. Klaunberg, et al. (2004). "In vivo bioluminescence imaging." *Comp Med* **54**(6): 631-4.

- Sato, E., S. H. Olson, et al. (2005). "Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(51): 18538-43.
- Sato, K., S. Kimura, et al. (2005). "Cytotoxic effects of gammadelta T cells expanded ex vivo by a third generation bisphosphonate for cancer immunotherapy." Int J Cancer **116**(1): 94-9.
- Saur, D., B. Seidler, et al. (2005). "CXCR4 expression increases liver and lung metastasis in a mouse model of pancreatic cancer." Gastroenterology **129**(4): 1237-50.
- Scalise, F., R. Gerli, et al. (1992). "Lymphocytes bearing the gamma delta T-cell receptor in acute toxoplasmosis." Immunology **76**(4): 668-70.
- Schadendorf, D., A. Moller, et al. (1993). "IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor." J Immunol **151**(5): 2667-75.
- Schaerli, P., L. Ebert, et al. (2004). "A skin-selective homing mechanism for human immune surveillance T cells." J Exp Med **199**(9): 1265-75.
- Schardt, J. A., M. Meyer, et al. (2005). "Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer." Cancer Cell **8**(3): 227-39.
- Scheel, C., T. Onder, et al. (2007). "Adaptation versus selection: the origins of metastatic behavior." Cancer Res **67**(24): 11476-9; discussion 11479-80.
- Schell, T. D., B. B. Knowles, et al. (2000). "Sequential loss of cytotoxic T lymphocyte responses to simian virus 40 large T antigen epitopes in T antigen transgenic mice developing osteosarcomas." Cancer Res **60**(11): 3002-12.
- Schild, H., N. Mavaddat, et al. (1994). "The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells." Cell **76**(1): 29-37.
- Schimanski, C. C., P. R. Galle, et al. (2008). "Chemokine receptor CXCR4-prognostic factor for gastrointestinal tumors." World J Gastroenterol **14**(30): 4721-4.
- Schluter, K., P. Gassmann, et al. (2006). "Organ-specific metastatic tumor cell adhesion and extravasation of colon carcinoma cells with different metastatic potential." Am J Pathol **169**(3): 1064-73.
- Schnurr, M., C. Scholz, et al. (2002). "Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and gammadelta T cells." Cancer Res **62**(8): 2347-52.
- Schumacher, U., E. Adam, et al. (1994). "Glycosylation patterns of the human colon cancer cell line HT-29 detected by Helix pomatia agglutinin and other lectins in culture, in primary tumours and in metastases in SCID mice." Clin Exp Metastasis **12**(6): 398-404.
- Scotet, E., L. O. Martinez, et al. (2005). "Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I." Immunity **22**(1): 71-80.
- Scotton, C. J., J. L. Wilson, et al. (2001). "Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors?" Cancer Res **61**(13): 4961-5.
- Seki, S., T. Abo, et al. (1990). "Identification of activated T cell receptor gamma delta lymphocytes in the liver of tumor-bearing hosts." J Clin Invest **86**(2): 409-15.
- Selin, L. K., S. Stewart, et al. (1992). "Reactivity of gamma delta T cells induced by the tumour cell line RPMI 8226: functional heterogeneity of clonal populations and role of GroEL heat shock proteins." Scand J Immunol **36**(1): 107-17.
- Seo, N., Y. Tokura, et al. (1999). "Depletion of IL-10- and TGF-beta-producing regulatory gamma delta T cells by administering a daunomycin-conjugated specific monoclonal antibody in early tumor lesions augments the activity of CTLs and NK cells." J Immunol **163**(1): 242-9.
- Sgadari, C., A. L. Angiolillo, et al. (1996). "Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10." Blood **87**(9): 3877-82.

- Shankaran, V., H. Ikeda, et al. (2001). "IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." Nature **410**(6832): 1107-11.
- Sharp, L. L., J. M. Jameson, et al. (2005). "Dendritic epidermal T cells regulate skin homeostasis through local production of insulin-like growth factor 1." Nat Immunol **6**(1): 73-9.
- Sheil, A. G. (1986). "Cancer after transplantation." World J Surg **10**(3): 389-96.
- Shibata, K., H. Yamada, et al. (2007). "Resident V δ 1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after Escherichia coli infection via IL-17 production." J Immunol **178**(7): 4466-72.
- Shibata, M. A., J. Morimoto, et al. (2008). "Combination therapy with short interfering RNA vectors against VEGF-C and VEGF-A suppresses lymph node and lung metastasis in a mouse immunocompetent mammary cancer model." Cancer Gene Ther **15**(12): 776-86.
- Shimizu, Y., E. Weidmann, et al. (1991). "Characterization of human autotumor-reactive T-cell clones obtained from tumor-infiltrating lymphocytes in liver metastasis of gastric carcinoma." Cancer Res **51**(22): 6153-62.
- Shinkai, Y., G. Rathbun, et al. (1992). "RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement." Cell **68**(5): 855-67.
- Shiohara, T., N. Moriya, et al. (1996). "Resistance to cutaneous graft-vs.-host disease is not induced in T cell receptor delta gene-mutant mice." J Exp Med **183**(4): 1483-9.
- Shultz, L. D., P. A. Schweitzer, et al. (1995). "Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice." J Immunol **154**(1): 180-91.
- Sicard, H., T. Al Saati, et al. (2001). "Synthetic phosphoantigens enhance human V γ 9V δ 2 T lymphocytes killing of non-Hodgkin's B lymphoma." Mol Med **7**(10): 711-22.
- Sicard, H., S. Ingoure, et al. (2005). "In vivo immunomanipulation of V gamma 9V delta 2 T cells with a synthetic phosphoantigen in a preclinical nonhuman primate model." J Immunol **175**(8): 5471-80.
- Sievers, E. L., F. R. Appelbaum, et al. (1999). "Selective ablation of acute myeloid leukemia using antibody-targeted chemotherapy: a phase I study of an anti-CD33 calicheamicin immunoconjugate." Blood **93**(11): 3678-84.
- Silberhumer, G. R., K. Zakian, et al. (2009). "Relationship between 31P metabolites and oncolytic viral therapy sensitivity in human colorectal cancer xenografts." Br J Surg **96**(7): 809-16.
- Singh, S. K., C. Hawkins, et al. (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." Nature **432**(7015): 396-401.
- Sireci, G., E. Espinosa, et al. (2001). "Differential activation of human gammadelta cells by nonpeptide phosphoantigens." Eur J Immunol **31**(5): 1628-35.
- Slamon, D. J., B. Leyland-Jones, et al. (2001). "Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2." N Engl J Med **344**(11): 783-92.
- Smith, I., M. Procter, et al. (2007). "2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial." Lancet **369**(9555): 29-36.
- Smyth, M. J., G. P. Dunn, et al. (2006). "Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity." Adv Immunol **90**: 1-50.
- Smyth, M. J., D. I. Godfrey, et al. (2001). "A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy." Nat Immunol **2**(4): 293-9.
- Smyth, M. J., K. Y. Thia, et al. (1999). "Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis." J Immunol **162**(11): 6658-62.

- Smyth, M. J., K. Y. Thia, et al. (2000). "Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells." *J Exp Med* **191**(4): 661-8.
- Smyth, M. J., K. Y. Thia, et al. (2000). "Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma." *J Exp Med* **192**(5): 755-60.
- Soderstrom, K., A. Bucht, et al. (1996). "Increased frequency of abnormal gamma delta T cells in blood of patients with inflammatory bowel diseases." *J Immunol* **156**(6): 2331-9.
- Soderstrom, K., A. Bucht, et al. (1994). "High expression of V gamma 8 is a shared feature of human gamma delta T cells in the epithelium of the gut and in the inflamed synovial tissue." *J Immunol* **152**(12): 6017-27.
- Spada, F. M., E. P. Grant, et al. (2000). "Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity." *J Exp Med* **191**(6): 937-48.
- Spibey, C. A., P. Jackson, et al. (2001). "A unique charge-coupled device/xenon arc lamp based imaging system for the accurate detection and quantitation of multicolour fluorescence." *Electrophoresis* **22**(5): 829-36.
- Sporn, M. B. (1996). "The war on cancer." *Lancet* **347**(9012): 1377-81.
- Stenholm, A. C., A. F. Kirkin, et al. (1998). "In vivo eradication of an established human melanoma by an in vitro generated autologous cytotoxic T cell clone: a SCID mouse model." *Int J Cancer* **77**(3): 476-80.
- Steplewski, Z., M. D. Lubeck, et al. (1983). "Human macrophages armed with murine immunoglobulin G2a antibodies to tumors destroy human cancer cells." *Science* **221**(4613): 865-7.
- Straathof, K. C., C. M. Bollard, et al. (2005). "Treatment of nasopharyngeal carcinoma with Epstein-Barr virus--specific T lymphocytes." *Blood* **105**(5): 1898-904.
- Strasser, A., A. W. Harris, et al. (1990). "Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2." *Nature* **348**(6299): 331-3.
- Street, S. E., Y. Hayakawa, et al. (2004). "Innate immune surveillance of spontaneous B cell lymphomas by natural killer cells and gammadelta T cells." *J Exp Med* **199**(6): 879-84.
- Street, S. E., J. A. Trapani, et al. (2002). "Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma." *J Exp Med* **196**(1): 129-34.
- Strid, J., S. J. Roberts, et al. (2008). "Acute upregulation of an NKG2D ligand promotes rapid reorganization of a local immune compartment with pleiotropic effects on carcinogenesis." *Nat Immunol* **9**(2): 146-54.
- Strieter, R. M., J. A. Belperio, et al. (2004). "CXC chemokines: angiogenesis, immunoangiostasis, and metastases in lung cancer." *Ann N Y Acad Sci* **1028**: 351-60.
- Strieter, R. M., P. J. Polverini, et al. (1995). "The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis." *J Biol Chem* **270**(45): 27348-57.
- Sturm, E., E. Braakman, et al. (1990). "Human V gamma 9-V delta 2 T cell receptor-gamma delta lymphocytes show specificity to Daudi Burkitt's lymphoma cells." *J Immunol* **145**(10): 3202-8.
- Stutman, O. (1975). "Immunodepression and malignancy." *Adv Cancer Res* **22**: 261-422.
- Sulica, A., P. Morel, et al. (2001). "Ig-binding receptors on human NK cells as effector and regulatory surface molecules." *Int Rev Immunol* **20**(3-4): 371-414.
- Sumida, T., T. Maeda, et al. (1992). "Predominant expansion of V gamma 9/V delta 2 T cells in a tularemia patient." *Infect Immun* **60**(6): 2554-8.
- Sun, F. X., A. R. Sasson, et al. (1999). "An ultra-metastatic model of human colon cancer in nude mice." *Clin Exp Metastasis* **17**(1): 41-8.
- Sun, H., N. Kundu, et al. (2001). "Expression of the chemokines IP-10 and Mig in IL-10 transduced tumors." *J Immunother* **24**(2): 138-43.
- Suntharalingam, G., M. R. Perry, et al. (2006). "Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412." *N Engl J Med* **355**(10): 1018-28.

- Sutton, C. E., S. J. Lalor, et al. (2009). "Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity." Immunity **31**(2): 331-41.
- Svane, I. M., A. M. Engel, et al. (1996). "Chemically induced sarcomas from nude mice are more immunogenic than similar sarcomas from congenic normal mice." Eur J Immunol **26**(8): 1844-50.
- Swann, J. B. and M. J. Smyth (2007). "Immune surveillance of tumors." J Clin Invest **117**(5): 1137-46.
- Sweeney, T. J., V. Mailander, et al. (1999). "Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(21): 12044-9.
- Szentirmai, O., C. H. Baker, et al. (2006). "Noninvasive bioluminescence imaging of luciferase expressing intracranial U87 xenografts: correlation with magnetic resonance imaging determined tumor volume and longitudinal use in assessing tumor growth and antiangiogenic treatment effect." Neurosurgery **58**(2): 365-72; discussion 365-72.
- Takanami, I. (2003). "Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis." Int J Cancer **105**(2): 186-9.
- Takeda, K., S. Seki, et al. (1996). "Liver NK1.1+ CD4+ alpha beta T cells activated by IL-12 as a major effector in inhibition of experimental tumor metastasis." J Immunol **156**(9): 3366-73.
- Takeda, K., M. J. Smyth, et al. (2002). "Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development." J Exp Med **195**(2): 161-9.
- Takeuchi, H., A. Fujimoto, et al. (2004). "CCL21 chemokine regulates chemokine receptor CCR7 bearing malignant melanoma cells." Clin Cancer Res **10**(7): 2351-8.
- Talmadge, J. E., M. Donkor, et al. (2007). "Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde." Cancer Metastasis Rev **26**(3-4): 373-400.
- Tanaka, Y., C. T. Morita, et al. (1995). "Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells." Nature **375**(6527): 155-8.
- Tanaka, Y., A. Y. Wu, et al. (1994). "Inhibition of HT-29 human colon cancer growth under the renal capsule of severe combined immunodeficient mice by an analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D3, DD-003." Cancer Res **54**(19): 5148-53.
- Tannous, B. A., D. E. Kim, et al. (2005). "Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo." Mol Ther **11**(3): 435-43.
- Tarin, D., E. W. Thompson, et al. (2005). "The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia." Cancer Res **65**(14): 5996-6000; discussion 6000-1.
- Taub, D. D., D. L. Longo, et al. (1996). "Human interferon-inducible protein-10 induces mononuclear cell infiltration in mice and promotes the migration of human T lymphocytes into the peripheral tissues and human peripheral blood lymphocytes-SCID mice." Blood **87**(4): 1423-31.
- Terabe, M. and J. A. Berzofsky (2004). "Immunoregulatory T cells in tumor immunity." Curr Opin Immunol **16**(2): 157-62.
- Terabe, M., S. Matsui, et al. (2000). "NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway." Nat Immunol **1**(6): 515-20.
- Thalheimer, A., C. Otto, et al. (2009). "Tumor cell dissemination in a human colon cancer animal model: orthotopic implantation or intraportal injection?" Eur Surg Res **42**(3): 195-200.
- Theirez, A., C. Harly, et al. (2009). "IL-21-mediated potentiation of antitumor cytolytic and proinflammatory responses of human V gamma 9V delta 2 T cells for adoptive immunotherapy." J Immunol **182**(6): 3423-31.
- Theirez, A., C. Sabourin, et al. (2007). "Self/non-self discrimination by human gammadelta T cells: simple solutions for a complex issue?" Immunol Rev **215**: 123-35.

- Thomas, M. L., R. A. Badwe, et al. (2001). "Role of adhesion molecules in recruitment of Vdelta1 T cells from the peripheral blood to the tumor tissue of esophageal cancer patients." Cancer Immunol Immunother **50**(4): 218-25.
- Thompson, E. W., D. F. Newgreen, et al. (2005). "Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition?" Cancer Res **65**(14): 5991-5; discussion 5995.
- Thompson, K., J. Rojas-Navea, et al. (2006). "Alkylamines cause Vgamma9Vdelta2 T-cell activation and proliferation by inhibiting the mevalonate pathway." Blood **107**(2): 651-4.
- Todaro, M., M. D'Asaro, et al. (2009). "Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes." J Immunol **182**(11): 7287-96.
- Tokuyama, H., T. Hagi, et al. (2008). "V gamma 9 V delta 2 T cell cytotoxicity against tumor cells is enhanced by monoclonal antibody drugs--rituximab and trastuzumab." Int J Cancer **122**(11): 2526-34.
- Tol, J., M. Koopman, et al. (2008). "A randomised phase III study on capecitabine, oxaliplatin and bevacizumab with or without cetuximab in first-line advanced colorectal cancer, the CAIRO2 study of the Dutch Colorectal Cancer Group (DCCG). An interim analysis of toxicity." Ann Oncol **19**(4): 734-8.
- Toulon, A., L. Breton, et al. (2009). "A role for human skin-resident T cells in wound healing." J Exp Med **206**(4): 743-50.
- Triebel, F. and T. Hercend (1989). "Subpopulations of human peripheral T gamma delta lymphocytes." Immunol Today **10**(6): 186-8.
- Tripathi, P. and S. Agrawal (2006). "Non-classical HLA-G antigen and its role in the cancer progression." Cancer Invest **24**(2): 178-86.
- Turpeenniemi-Hujanen, T., U. P. Thorgeirsson, et al. (1985). "Expression of collagenase IV (basement membrane collagenase) activity in murine tumor cell hybrids that differ in metastatic potential." J Natl Cancer Inst **75**(1): 99-103.
- Uchida, R., E. Ashihara, et al. (2007). "Gamma delta T cells kill myeloma cells by sensing mevalonate metabolites and ICAM-1 molecules on cell surface." Biochem Biophys Res Commun **354**(2): 613-8.
- Uehara, S., K. Song, et al. (2002). "Characterization of CCR9 expression and CCL25/thymus-expressed chemokine responsiveness during T cell development: CD3(high)CD69+ thymocytes and gammadeltaTCR+ thymocytes preferentially respond to CCL25." J Immunol **168**(1): 134-42.
- Ullrich, E., M. Bonmort, et al. (2008). "Tumor stress, cell death and the ensuing immune response." Cell Death Differ **15**(1): 21-8.
- Ullrich, R., H. L. Schieferdecker, et al. (1990). "gamma delta T cells in the human intestine express surface markers of activation and are preferentially located in the epithelium." Cell Immunol **128**(2): 619-27.
- Urban, J. L., J. M. Holland, et al. (1982). "Immunoselection of tumor cell variants by mice suppressed with ultraviolet radiation." J Exp Med **156**(4): 1025-41.
- Uyemura, K., R. J. Deans, et al. (1991). "Evidence for clonal selection of gamma/delta T cells in response to a human pathogen." J Exp Med **174**(3): 683-92.
- Uyemura, K., J. Klotz, et al. (1992). "Microanatomic clonality of gamma delta T cells in human leishmaniasis lesions." J Immunol **148**(4): 1205-11.
- Uyttenhove, C., J. Van Snick, et al. (1980). "Immunogenic variants obtained by mutagenesis of mouse mastocytoma P815. I. Rejection by syngeneic mice." J Exp Med **152**(5): 1175-83.
- van de Corput, L., M. G. Kester, et al. (1997). "TCR gamma delta+ cells expressing Vgamma 9V delta2, which normally predominate the blood, are found in the spleens of patients with hairy cell leukemia." Leukemia **11**(1): 106-9.

- van Rijn, R. S., E. R. Simonetti, et al. (2003). "A new xenograft model for graft-versus-host disease by intravenous transfer of human peripheral blood mononuclear cells in RAG2^{-/-} gammac^{-/-} double-mutant mice." *Blood* **102**(7): 2522-31.
- Vandercappellen, J., J. Van Damme, et al. (2008). "The role of CXC chemokines and their receptors in cancer." *Cancer Lett* **267**(2): 226-44.
- Varmus, H. (2006). "The new era in cancer research." *Science* **312**(5777): 1162-5.
- Varney, M. L., A. Li, et al. (2003). "Expression of CXCR1 and CXCR2 receptors in malignant melanoma with different metastatic potential and their role in interleukin-8 (CXCL-8)-mediated modulation of metastatic phenotype." *Clin Exp Metastasis* **20**(8): 723-31.
- Verbeek, W. H., B. M. von Blomberg, et al. (2008). "The presence of small intestinal intraepithelial gamma/delta T-lymphocytes is inversely correlated with lymphoma development in refractory celiac disease." *Am J Gastroenterol* **103**(12): 3152-8.
- Vermijlen, D., P. Ellis, et al. (2007). "Distinct cytokine-driven responses of activated blood gammadelta T cells: insights into unconventional T cell pleiotropy." *J Immunol* **178**(7): 4304-14.
- Vetter, C. S., V. Groh, et al. (2002). "Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma." *J Invest Dermatol* **118**(4): 600-5.
- Viey, E., G. Fromont, et al. (2005). "Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma." *J Immunol* **174**(3): 1338-47.
- Viey, E., C. Laplace, et al. (2005). "Peripheral gammadelta T-lymphocytes as an innovative tool in immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma." *Expert Rev Anticancer Ther* **5**(6): 973-86.
- Viey, E., C. Lucas, et al. (2008). "Chemokine receptors expression and migration potential of tumor-infiltrating and peripheral-expanded Vgamma9Vdelta2 T cells from renal cell carcinoma patients." *J Immunother* **31**(3): 313-23.
- Vincent, M. S., K. Roessner, et al. (1996). "Apoptosis of Fashigh CD4⁺ synovial T cells by borrelia-reactive Fas-ligand(high) gamma delta T cells in Lyme arthritis." *J Exp Med* **184**(6): 2109-17.
- Vogelstein, B., E. R. Fearon, et al. (1988). "Genetic alterations during colorectal-tumor development." *N Engl J Med* **319**(9): 525-32.
- Wallace, M., S. R. Bartz, et al. (1996). "Gamma delta T lymphocyte responses to HIV." *Clin Exp Immunol* **103**(2): 177-84.
- Wang, L., H. Das, et al. (2001). "Human V gamma 2V delta 2 T cells produce IFN-gamma and TNF-alpha with an on/off/on cycling pattern in response to live bacterial products." *J Immunol* **167**(11): 6195-201.
- Watanabe, N., A. Hizuta, et al. (1995). "Localization of T cell receptor (TCR)-gamma delta + T cells into human colorectal cancer: flow cytometric analysis of TCR-gamma delta expression in tumour-infiltrating lymphocytes." *Clin Exp Immunol* **102**(1): 167-73.
- Weber, G. F. and S. Ashkar (2000). "Molecular mechanisms of tumor dissemination in primary and metastatic brain cancers." *Brain Res Bull* **53**(4): 421-4.
- Webster, A. C., J. C. Craig, et al. (2007). "Identifying high risk groups and quantifying absolute risk of cancer after kidney transplantation: a cohort study of 15,183 recipients." *Am J Transplant* **7**(9): 2140-51.
- Wei, E. K., E. Giovannucci, et al. (2004). "Comparison of risk factors for colon and rectal cancer." *Int J Cancer* **108**(3): 433-42.
- Wei, H., D. Huang, et al. (2008). "Definition of APC presentation of phosphoantigen (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate to Vgamma2Vdelta 2 TCR." *J Immunol* **181**(7): 4798-806.
- Weinberg, R. A. (2008). "The many faces of tumor dormancy." *APMIS* **116**(7-8): 548-51.
- Weinberg, R. A. (2008). "Mechanisms of malignant progression." *Carcinogenesis* **29**(6): 1092-5.

- Wen, L., D. F. Barber, et al. (1998). "Primary gamma delta cell clones can be defined phenotypically and functionally as Th1/Th2 cells and illustrate the association of CD4 with Th2 differentiation." *J Immunol* **160**(4): 1965-74.
- Wesch, D., A. Glatzel, et al. (2001). "Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward Th1- or Th2-phenotype." *Cell Immunol* **212**(2): 110-7.
- Wetterwald, A., G. van der Pluijm, et al. (2002). "Optical imaging of cancer metastasis to bone marrow: a mouse model of minimal residual disease." *Am J Pathol* **160**(3): 1143-53.
- Whang, M. I., N. Guerra, et al. (2009). "Costimulation of dendritic epidermal gammadelta T cells by a new NKG2D ligand expressed specifically in the skin." *J Immunol* **182**(8): 4557-64.
- Wilhelm, M., V. Kunzmann, et al. (2003). "Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies." *Blood* **102**(1): 200-6.
- Wilkinson, P. C. (1988). "Chemotaxis and chemokinesis: confusion about definitions." *J Immunol Methods* **110**(1): 143-9.
- Willimsky, G. and T. Blankenstein (2005). "Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance." *Nature* **437**(7055): 141-6.
- Wilmanns, C., D. Fan, et al. (1992). "Orthotopic and ectopic organ environments differentially influence the sensitivity of murine colon carcinoma cells to doxorubicin and 5-fluorouracil." *Int J Cancer* **52**(1): 98-104.
- Winn, H. J. (1960). "Immune mechanisms in homotransplantation. I. The role of serum antibody and complement in the neutralization of lymphoma cells." *J Immunol* **84**: 530-8.
- Wohler, J. E., S. S. Smith, et al. (2009). "Gammadelta T cells in EAE: early trafficking events and cytokine requirements." *Eur J Immunol* **39**(6): 1516-26.
- Workalemahu, G., M. Foerster, et al. (2004). "Expression and synthesis of fibroblast growth factor-9 in human gammadelta T-lymphocytes. Response to isopentenyl pyrophosphate and TGF-beta1/IL-15." *J Leukoc Biol* **75**(4): 657-63.
- Workalemahu, G., M. Foerster, et al. (2003). "Human gamma delta-T lymphocytes express and synthesize connective tissue growth factor: effect of IL-15 and TGF-beta 1 and comparison with alpha beta-T lymphocytes." *J Immunol* **170**(1): 153-7.
- Wrobel, P., H. Shojaei, et al. (2007). "Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human gamma delta T cells: involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor-versus NKG2D-dependent recognition." *Scand J Immunol* **66**(2-3): 320-8.
- Wu, J., V. Groh, et al. (2002). "T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial gamma delta T cells." *J Immunol* **169**(3): 1236-40.
- Wurbel, M. A., J. M. Philippe, et al. (2000). "The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9." *Eur J Immunol* **30**(1): 262-71.
- Wyllie, A. H., J. F. Kerr, et al. (1980). "Cell death: the significance of apoptosis." *Int Rev Cytol* **68**: 251-306.
- Yang, J. C., R. M. Sherry, et al. (2003). "Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer." *J Clin Oncol* **21**(16): 3127-32.
- Yang, Y. F., M. Tomura, et al. (2001). "IL-12 as well as IL-2 upregulates CCR5 expression on T cell receptor-triggered human CD4+ and CD8+ T cells." *J Clin Immunol* **21**(2): 116-25.
- Yin, A. H., S. Miraglia, et al. (1997). "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." *Blood* **90**(12): 5002-12.
- Yokoi, K., P. H. Thaker, et al. (2005). "Dual inhibition of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation by AEE788 reduces

- growth and metastasis of human colon carcinoma in an orthotopic nude mouse model." Cancer Res **65**(9): 3716-25.
- Yoo, C. B. and P. A. Jones (2006). "Epigenetic therapy of cancer: past, present and future." Nat Rev Drug Discov **5**(1): 37-50.
- Yu, P. and Y. X. Fu (2006). "Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes?" Lab Invest **86**(3): 231-45.
- Yuasa, T., K. Sato, et al. (2009). "Intravesical administration of gammadelta T cells successfully prevents the growth of bladder cancer in the murine model." Cancer Immunol Immunother **58**(4): 493-502.
- Zeelenberg, I. S., L. Ruuls-Van Stalle, et al. (2003). "The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases." Cancer Res **63**(13): 3833-9.
- Zha, Y., C. Blank, et al. (2004). "Negative regulation of T-cell function by PD-1." Crit Rev Immunol **24**(4): 229-37.
- Zhao, J., J. Huang, et al. (2006). "Vdelta1 T cell receptor binds specifically to MHC I chain related A: molecular and biochemical evidences." Biochem Biophys Res Commun **339**(1): 232-40.
- Zheng, B. J., K. W. Chan, et al. (2001). "Anti-tumor effects of human peripheral gammadelta T cells in a mouse tumor model." Int J Cancer **92**(3): 421-5.
- Zheng, B. J., S. P. Ng, et al. (2002). "Peripheral gamma delta T-cell deficit in nasopharyngeal carcinoma." Int J Cancer **99**(2): 213-7.
- Zitvogel, L., L. Apetoh, et al. (2008). "Immunological aspects of cancer chemotherapy." Nat Rev Immunol **8**(1): 59-73.
- Zocchi, M. R., M. Ferrarini, et al. (1994). "T-cell receptor V delta gene usage by tumour reactive gamma delta T lymphocytes infiltrating human lung cancer." Immunology **81**(2): 234-9.
- Zocchi, M. R. and A. Poggi (2004). "Role of gammadelta T lymphocytes in tumor defense." Front Biosci **9**: 2588-604.
- Zou, W. (2005). "Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance." Nat Rev Cancer **5**(4): 263-74.
- Zou, W. (2006). "Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy." Nat Rev Immunol **6**(4): 295-307.
- Zwirner, N. W., K. Dole, et al. (1999). "Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes." Hum Immunol **60**(4): 323-30.

Annexes

ANNEXES

- ◆ Article soumis à publication
- ◆ Liste des publications et communications

Functional characterization of a chimeric soluble Fas ligand polymer with in vivo anti-tumor activity

Sophie DABURON¹, Christel DEVAUD¹, Pierre COSTET², Laure GARRIGUE-ANTAR³,
Mike MAILLASSON³, Nathalie HARGOUS¹, Delphine LAPAILLERIE⁴, Marc BONNEU⁴,
François MOREAU-GAUDRY⁵, Julie DECHANET-MERVILLE¹, Patrick LEGEMBRE¹,
Myriam CAPONE¹, Jean-François MOREAU^{1,6}, and Jean-Luc TAUPIN^{1,6}.

Affiliations:

¹UMR CNRS 5164 Université de Bordeaux 2, 33076 Bordeaux, France, ²Animalerie spécialisée, Université de Bordeaux 2, 33076 Bordeaux, France, ³INSERM UMR892, IFR26, Université de Nantes, IRTUN, 44007 Nantes, France ⁴Plateforme génomique fonctionnelle, Université de Bordeaux 2, 33076 Bordeaux, France, ⁵Laboratoire de Biochimie, CHU de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France, ⁶Laboratoire d'Immunologie, CHU de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France.

Running title: Fas conformational change during activation by FasL

Keywords: Fas , CD95, FasL, apoptosis, conformation, cancer

Footnotes:

This work was supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (grant 3798), and from the Ligue Contre le Cancer (Comités des Landes et de la Dordogne).

C. Devaud is supported by a grant from the MENRT.

Corresponding author: Pr Jean-Luc TAUPIN, CNRS UMR 5164, Université de Bordeaux 2,
146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France. Tel : +33-5-57-57-14-71

Fax: +33-5-57-57-14-72 e-mail: jean-luc.taupin@chu-bordeaux.fr

Abstract

Binding of ligand FasL to its receptor Fas triggers apoptosis via the caspase cascade. FasL itself is homotrimeric, and a productive apoptotic signal requires that FasL be oligomerized beyond the homotrimeric state. We generated a series of FasL chimeras by fusing FasL to domains of the Leukemia Inhibitory Factor receptor gp190 which confer homotypic oligomerization, and analyzed the capacity of these soluble chimeras to trigger cell death. We observed that the most efficient FasL chimera, called IgFasL, was also the most polymeric, as it reached the size of a dodecamer. Using a cellular model, we investigated the structure-function relationships of the FasL/Fas interactions, and we demonstrated that the Fas-mediated apoptotic signal did not solely rely on ligand-mediated receptor aggregation, but also required a conformational change of the Fas receptor. When injected into mice, IgFasL did not trigger any liver injury at a dose which displayed anti-tumor activity in a model of human tumor transplanted to immunodeficient animals, suggesting a potential therapeutic use.

Abbreviations

CBD : Cytokine-binding Domain

cFasL : cleaved FasL

ASAT : Aspartate amino transferase

ALAT : Alanine amino transferase

IL : Interleukin

mAb : monoclonal antibody

sFasL : soluble fasL

TNF : Tumor Necrosis Factor

Introduction

FasL (CD95L) is a type II homotrimeric transmembrane protein of the TNF (Tumor Necrosis Factor) family of cytokines (1). FasL is expressed on activated T lymphocytes and natural killer cells, as a weapon to eliminate transformed and infected cells expressing the transmembrane receptor Fas (CD95/APO-1) (2). The triggering of Fas initially appeared as a promising approach to treat cancer but an agonistic anti-Fas antibody triggered fulminant lethal hepatitis upon injection in mice, precluding the use of Fas inducers for a therapeutical purpose in human (3).

Cleavage of membrane-bound FasL by a metalloprotease (4, 5) generates soluble homotrimeric FasL (sFasL), which is weakly apoptotic, and competes with membrane FasL for cell killing (6, 7). Interestingly, upon cross-linking with antibodies, sFasL recovers its proapoptotic activity, and a FasL hexamer appears as the smallest functional form (8). Similarly, agonistic anti-Fas monoclonal antibodies (mAb) are mostly of the IgM or the self-aggregating IgG3 isotypes.

Our general aims were to develop new isoforms of functional FasL which do not require any crosslinking agent to become cytotoxic, to use them for deciphering the functional requirements leading to Fas activation, and to test them for *in vivo* anti-tumor activity. To reach the first goal, we fused the ectodomain of FasL to the modules of the extracellular domain of the Leukemia Inhibitory Factor (LIF) cytokine receptor gp190 (9) which display a propensity to self-associate (10, 11). The gp190 belongs to the family of the hematopoietin receptors, characterized by the extracellular consensus cytokine binding domain (CBD). The gp190 harbors two CBDs (D1 and D2) separated by an immunoglobulin-like (Ig) module. Therefore, the trimeric structure of the sFasL moiety, combined to the propensity of the gp190 modules to self-associate, could lead to differently aggregated sFasL chimeras with distinct apoptotic abilities.

To reach the second goal, we hypothesized that the distinct sizes of the gp190 modules (i.e. around 20, 40 and 100 kDa for Ig, D2 and D1IgD2 respectively), could exert different steric effects, distinctly impinging on the ability to trigger a productive apoptotic signal independently of the polymerization of FasL. In addition, given that Fas activation requires oligomers beyond the trimeric stage, we reasoned that either aggregation of the trimers, or a particular conformational change within a single trimer triggered by a polymeric ligand, or both, is mandatory. Therefore, we wondered whether anti-Fas antibody, naturally occurring sFasL and our chimeras, would be able to stimulate a chimeric Fas receptor which would only require dimerization to transmit a signal, and whether or not this property would correlate with the ability to trigger cell apoptosis. To explore this possibility, we used the gp130 signal transducing cytokine receptor, another member of the hematopoietin receptors, which is pre-assembled as dimers (12) and requires a ligand-induced conformational change to become activated. Gp130 triggers cytokine-dependent proliferation of various cell lines via the Jak-STAT pathway (13). We fused transmembrane and intracellular regions of gp130 to the extracellular region of Fas, generating the Fas-gp130 receptor, and expressed it in the BA/F3 cell line.

To reach our third goal, *in vivo* toxicity in normal mouse, and ability to counteract tumor development in a model of human solid tumor transplanted into immunodeficient mice were explored for our most efficient sFasL chimera.

Materials and methods

Antibodies and reagents

Anti-FasL mAb 14C2 and 10F2 used for the FasL ELISA (14), IgG anti-human Fas mAb 5D7 (14), isotype-matched negative controls 1F10 (IgG) and 10C9 (IgM) mAbs (15) were all generated in the laboratory. Chimeric Fas-Fc receptor was produced in the laboratory and was affinity-purified on protein A. Anti-FasL mAb (G247) used for immunoblots and anti-human Fas non agonistic mAb DX2 were purchased from BD Biosciences (Le-Pont-De-Claix, France). Recombinant sFasL (recFasL) was purchased from Alexis Corporation (Coger, Paris, France), and used with its cross-linking “enhancer” reagent, as recommended by the manufacturer. Anti-human Fas agonistic mAb 7C11 (IgM) was from Immunotech (Marseille, France). Anti-murine Fas agonistic mAb (JO2) was from Bender MedSystems (Vienna, Austria).

Construction of the FasL chimeras

The isolation of the gp190 receptor modules Ig, D2 and D1IgD2 was described previously (10). They were fused to the extracellular domain of hFasL (amino acids 108 to 281) isolated by PCR. To generate the Fas-gp130 chimera, the Fas extracellular region and the transmembrane and intracellular domains of gp130 were isolated by site-directed mutagenesis and fused together.

Cell lines and transfections

The cells were grown in a 5 % CO₂ incubator at 37°C without antibiotics in medium supplemented with 8% FCS (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France). Culture medium was

RPMI for the human Jurkat T-lymphoma and the BA/F3 pro-B-lymphocytic murine cell lines, and DMEM for the human skin carcinoma A431 and the simian epithelial COS cell lines.

COS cells were transiently transfected using the DEAE-dextran method, with 5 µg of plasmid DNA, and supernatants were harvested 5 days later. Large scale production of IgFasL was performed in serum-free Opti-MEM medium (Invitrogen).

The BA/F3 culture medium was supplemented with 10% WEHI cell-conditioned medium as a source of murine interleukin-3. BA/F3 cells ($5 \cdot 10^6$ cells in 300 µl) were electroporated (BTM 830 electroporator, BTX Instruments, Holliston, MA). G418 at 1 µg/ml (Invitrogen) was added at day 1. The G418-resistant cells were cloned by limiting dilution in the presence of murine IL-3. Stable transfectants were selected for membrane expression of the Fas-gp130 molecule by flow cytometry with the anti-Fas antibody 5D7. BA/F3 cell proliferation was estimated using the MTT proliferation assay, as described previously (10), after three washes of the cells to remove IL-3. The maximum value and the blank value were obtained with a saturating concentration of IL-3 or without IL3, respectively.

The BA/F3, Jurkat, COS and A431 cell lines were obtained respectively in 1991, 1995, 1992 and 2004 from Drs D'Andrea (16), Anderson (17), Kaufman (18) and Nagata (19). They are mycoplasma-tested every 6 months by PCR (20) and Hoechst 33258 staining (21). Absence of cross-contamination is verified almost daily by morphology check for all the cell lines, and by growth curve analysis in the presence and absence of IL-3 for the BA/F3 cell line.

ELISA for sFasL

FasL was quantified in cell culture supernatants using a conformation-dependent home made sandwich ELISA based on mAb 14C2 (10 µg/ml) as a capture antibody and biotinylated

mAb 10F2 (1 µg/ml) as a tracer. All steps were performed exactly as reported for our anti-human LIF ELISA (22).

Western blot analysis

Supernatants from transfected cells were harvested and debris were removed by centrifugation. FasL was quantified and 100 ng of the FasL protein were resuspended in 5x Laemmli buffer and separated by SDS-PAGE on 12 % gels. Proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Amersham, Buckinghamshire, England) and immunoblots were performed as previously described (23). The anti-FasL mAb G247 (1 µg/ml) was incubated overnight at 4°C. BN-PAGE was carried out as described by Schagger (24) with the following modifications. A separating 4–18% w/v acrylamide linear gradient was used. Before loading, 1 µL of sample buffer (500 mM 6-amino-*n*-caproic acid, 5% w/v Serva Blue G) was added to the sample. The gel was run overnight at 4°C with 1 W. Thyroglobulin (669 kDa) and BSA (66 kDa) were used as size standards (Sigma).

Surface plasmon resonance analysis of the FasL chimeras binding to Fas

The experiments were carried out on a BIAcore 3000 optical biosensor (GE healthcare, Chalfont, UK). The FasL chimeras were produced as COS supernatants in Opti-MEM medium, concentrated 100 times, dialyzed against PBS and sterilized by filtration. Recombinant Fas-Fc (R&Dsystems, Minneapolis, MN) was covalently coupled to a carboxymethyl dextran flow cell (CM5, BIAcore) following the manufacturer's recommendations. The level of immobilization was 2,000 resonance units (RU). Binding of the FasL chimeras was assayed at concentrations ranging from 0.2 to 100 nM for IgFasL, 0.2 to 44 nM for cFasL, 0.2 to 37.5 nM for D2FasL, and 0.25 to 8 nM for D1IgD2FasL, in Hepes-buffered saline, at a 30 µl/min flow rate. Association was monitored for 5 min before

initiating the dissociation phase for another 11 min with Hepes-buffered saline. The flow cell was regenerated with 4M MgCl₂. The sensorgrams were analyzed using the BIAeval 4.1 software (BIAcore). The background of the Opti-MEM medium was at 30 RU.

Cell cytotoxicity assays

The cytotoxic activity of the FasL chimeras was measured using the MTT viability assay as previously described (14). The percent of specific cytotoxic activity of FasL was calculated as follows: $100 - (\text{experimental absorbance} - \text{background absorbance}) / (\text{control absorbance} - \text{background absorbance}) \times 100$.

Immunoprecipitation experiments

For ³⁵S metabolic labelling experiments, COS cells were transfected and the radioactive substrate (³⁵S-Translabel, ICN Pharmaceuticals, Orsay) was added at day 3 for an overnight incubation. The supernatants (500 µl) were incubated with 5 µg of anti-FasL mAb 14C2 or 5 µg of purified Fas-Fc for 2 h before 40 µl of protein G beads (Sigma) were added for 1 h at 4°C. The beads were pelleted and washed 3 times with 1 ml of washing buffer (50 mM Tris, 1mM EDTA, 150 mM sodium chloride, 0,2% Nonidet P-40, pH 8), and then resuspended in 40 µl of 5x Laemmli's buffer, boiled 5 min and the proteins were separated by SDS-PAGE using 12% gels.

Gel filtration experiments

The molecular size of the FasL constructs was determined using the size exclusion S-200-HR and S-300-HR Sephacryl columns (Amersham Pharmacia, Orsay, France). COS supernatants were concentrated with Centricon-30 (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) to reach 2 µg/ml for each sFasL form. One microgram was loaded onto a column and

eluted in PBS at 0.3 ml/min. Fractions were analyzed for the presence of FasL protein by ELISA and for cytotoxicity using the MTT assay.

FasL purification and mice injection

Experiments with normal Balb/cByJCr1 mice used immunoaffinity purified IgFasL. Supernatant from transfected COS cells (500 mL) was immunoprecipitated using 1 ml of anti-FasL mAb (14C2)-coupled NHS-activated sepharose beads (Amersham), overnight at 4°C. Beads were pelleted and washed in PBS, and IgFasL was eluted at pH 2 (50 mM glycine, 1 M NaCl). The eluate was immediately neutralized by adding 0.25 volume of 1 M Tris-HCl buffer at pH 8. After overnight dialysis against PBS, FasL was quantified by ELISA. Male BALB/cByJCr1 mice (8 wk old) were injected intraperitoneally with 500 µl PBS containing 10 µg of IgFasL, or of anti-Fas agonistic mAb JO2, or with PBS alone. Blood was collected at 6 and 30 h for liver enzymes measurement. The mice were euthanased at 30 h post-injection.

For tumor experiments, COS cells were transfected with IgFasL or empty vector as a control, and grown in Opti-MEM medium. Supernatants were harvested at day 5, centrifuged, concentrated 60 times against polyethylene glycol flakes, adjusted to 100 µg/ml and sterilized by filtration. Immunodeficient Rag^{-/-}γc^{-/-} mice, a gift from Dr Di Santo (25), were used at 7-10 weeks of age, and housed in appropriate animal facility under pathogen-free conditions. At day 0, mice received 10⁵ A431 cells in 0.1 ml of culture medium subcutaneously into the right flank. Injections of IgFasL (10 µg in 0.1ml) or control were performed after tumor implantation, either subcutaneously at days 2 and 7, or intraperitoneally everyday between days 0 and 7, then at days 9, 11 and 14. Tumor growth was monitored by measuring maximal and minimal diameters with a calliper, three times a week, and tumor volume was estimated with the formula: tumor volume (mm³)= length (mm) x width² (mm).

Statistical analysis of tumor growth

The Mann Whitney test was used for the comparison between the two groups in the experiment with subcutaneous injection of IgFasL. The Kaplan-Meier analysis was used to establish the survival curves without cancer, and comparison between the two groups was made using the log-rank test. Analyses were performed with Statview Software (Abacus Concepts, Berkeley, CA). For all experiments, a $p \leq 0.05$ was considered significant.

Results

Generation and production of soluble potentially multimeric FasL/gp190 chimeras

We fused the Ig, D2 and D1IgD2 modules of gp190 to the FasL extracellular region (Figures 1A and 1B). The constructs were expressed in COS cells and the secreted molecules were quantified using a FasL-specific ELISA. To measure their ability to trigger cell death, we incubated serial dilutions of the supernatants from chimeric FasL, control mock-transfected and wild-type FasL transfected cells with Fas-sensitive Jurkat cells. A commercially available FasL (recFasL) was also tested as a highly active reference. IgFasL was the strongest death inducer among our chimeras and was as powerful as recFasL (Figure 1C). D2FasL and D1IgD2FasL were respectively 12.5 and 125 times less potent than IgFasL. As already known, spontaneously cleaved membrane FasL had almost no activity (6, 7). The concentration of the anti-Fas agonistic IgM antibody 7C11 required to kill 50% of the Jurkat cells was at 2 ng/ml (results not shown) (14, 23, 26).

Biochemical characterization of the FasL/gp190 chimeras

Identical amounts of the ³⁵S-labeled FasL constructs were separated by SDS-PAGE (Figure 2A, left panel) and the molecular mass of each chimera was determined under reducing conditions (Figure 2D). We also performed native gel electrophoresis (BN-PAGE) in non-reducing conditions (Figure 2A, right panel), and observed that IgFasL, D2FasL and D1IgD2FasL all displayed much higher molecular weights than expected from the SDS-PAGE analysis (Figure 2D). The three chimeras were also analyzed by gel filtration chromatography (Figure 2B). Elution fractions were analyzed for the presence of FasL by ELISA (Figure 2B, upper panel) and for cytotoxic activity against the Jurkat cell line (Figure 2B, lower panel). We confirmed that the metalloprotease-cleaved FasL is a non cytotoxic

homotrimer, whereas D2FasL and D1IgD2FasL behaved as hexamers. In contrast to D2FasL, D1IgD2FasL did not kill the Jurkat cells, probably because it was not concentrated enough in this assay, as it is ten times less efficient than D2FasL (see also Figure 1C). IgFasL existed under two distinct forms corresponding to a high molecular weight dodecamer and to a smaller hexameric form. Both were cytotoxic, which is consistent with previously published results for soluble FasL in the case of the hexamer (8).

The affinity of the FasL chimeras for Fas was measured using the surface plasmon resonance Biacore® method, against recombinant Fas-Fc immobilized on a chip. IgFasL, D2FasL, D1IgD2FasL and sFasL as a control, were produced as supernatants in COS cells cultured in serum-free medium, concentrated 100 times, and dialysed against PBS. The sensorgrams are depicted in Figure 2C and the association and dissociation constants are presented in Table 1. The K_d for the three chimeras were very close to each other, ranging from 11.6 nM for IgFasL, to 25.6 nM for D1IgD2FasL and to 38.5 nM for D2FasL. They were inversely correlated with the degree of polymerisation of the construct, and two to six times higher than for non-chimeric cFasL ($K_d = 69.4$ nM). Therefore, the small differences between the chimeras did not significantly alter the ability of the FasL moiety to bind to Fas, nor did it explain the strong discrepancies in their abilities to trigger apoptosis.

FasL chimeras and agonistic antibody differentially act on Fas conformation.

To determine whether a conformational change in the Fas receptor is required to produce the apoptotic signal, we generated a fusion protein between the extracellular region of Fas and the transmembrane and intracellular region of the gp130 hematopoietin receptor (Figure 3A) which we expressed in the IL-3 dependent BA/F3 murine cell line. This cell line relies on exogenously added cytokines to survive and proliferate, and also lacks membrane expression of murine Fas as shown by flow cytometry staining with the JO2 antibody (Figure 3B, upper panel). In the presence of FasL, stable expression of the chimera was expected to

keep the cells proliferating through the activation of the gp130 pathway. The membrane expression of the Fas-gp130 chimera was verified using flow cytometry, and the absence of murine Fas on the transfectants was confirmed (see Figure 3B, lower panel, for the representative clone used in the proliferation experiments). In the absence of IL-3, the BA/F3 Fas-gp130 cells did not proliferate, demonstrating that the Fas-gp130 chimera by itself was not able to sustain cell growth (Figure 3C).

We then analyzed the effect on cell survival and proliferation of serial dilutions of the 7C11 agonistic anti-Fas antibody, of the FasL chimeras, and of spontaneously cleaved FasL (cFasL) (Figure 3C). Cell viability was expressed as the percentage of the maximal proliferation triggered by a saturating concentration of IL-3. We observed that the strongly apoptotic 7C11 mAb was not able to sustain cell proliferation. In contrast, the pro-apoptotic IgFasL and D2FasL triggered a strong and quantitatively comparable proliferative signal, although D2FasL was 12.5 times less efficient than IgFasL for killing the Jurkat cells (see Figure 1C). D1IgD2-FasL, which is hexameric like D2FasL but only weakly triggers cell death (see Figure 1C), was unable to sustain cell proliferation. Cleaved FasL, which as a non apoptotic homotrimer is unable to aggregate the pre-associated Fas homotrimers, nevertheless triggered a proliferative signal comparable to that of D2FasL and IgD2FasL. The discrepancy between the polymeric apoptotic antibody 7C11 and the non apoptotic trimeric cFasL demonstrated that the proliferative signal did not require aggregation of Fas, and suggested that the triggering of Fas may also include a ligand-induced conformational change of the receptor itself.

Anti-tumor activity of IgFasL

The IgFasL chimera exerted its cytotoxic activity against various human tumor cells from distinct origins, both hematopoietic (CEM and H9 T-lymphoma cells, SKW6.4 and JY

B-lymphoma cells, with C50 ranging from 0.01 to 0.1 $\mu\text{g/ml}$), and non-hematopoietic (A431 melanoma cells, with C50 = 0.15 $\mu\text{g/ml}$) (results not shown).

To determine the hepatotoxicity of IgFasL, we injected the ligand in mice and we analyzed in peripheral blood the markers of liver injury aspartate amino transferase (ASAT) and alanine amino transferase (ALAT). Mice were injected intraperitoneally with 10 μg (0.7 $\mu\text{g/g}$) of affinity-purified IgFasL diluted in PBS. As controls, one mouse was injected with an identical volume of PBS and another one was left untreated. As a positive control, two mice were injected intraperitoneally with 10 μg of the agonistic anti-murine Fas antibody JO2 in the same volume of PBS. One of these mice developed a fulminant hepatitis and was sacrificed 6 hours after antibody injection. The anti-Fas JO2 mAb triggered a rapid and considerable increase of both serum amino transferases, whereas sera from the negative control mice and mice injected with the purified IgFasL did not show any sign of liver cytolysis (Table 2).

The anti-tumor activity of IgFasL was estimated in a mouse model, using human A431 cells transplanted subcutaneously to Rag^{-/-} $\gamma\text{c}^{-/-}$ immunodeficient mice. In a first experiment (Figure 4A), we analyzed whether IgFasL injected locally would control tumor growth. For that, 10⁵ A431 cells were injected to two groups of 6 mice. Then the mice received two local subcutaneous injections of either IgFasL (a non toxic amount of 10 μg in the form of a serum-free concentrated supernatant) or IgFasL-free control, at days 2 and 7 after tumor implantation. Tumor growth was regularly measured until day 21, and the evolution of tumor volumes is depicted in Figure 4A. The local administration of IgFasL significantly reduced tumor growth, in comparison to the mice injected with the control without IgFasL, but the effect vanished when the injections were stopped. We next analyzed whether injection of IgFasL at a distance from the tumor site would have a similar effect. For that, 10⁵ A431 cells were injected to two groups of 10 mice, and two independent experiments were performed.

The mice received intraperitoneal injections of either IgFasL (10 µg) or IgFasL-free control, everyday from day 0 to day 7, and thereafter at days 9, 11 and 14 only. Tumor size was measured regularly until day 35. The survival of the mice without detectable tumor is presented in Figure 4B, and shows that IgFasL is able to significantly ($p = 0.02$) lower tumor growth and improve animal survival, as 25% of the mice having received IgFasL remain tumor-free at a time where the control mice having received medium alone are all dead from tumor overgrowth. Therefore, these in vivo preliminary experiments demonstrate that the in vitro biological properties of IgFasL are conserved in vivo.

Discussion

Our IgFasL, D2FasL and D1IgD2FasL chimeras allowed us to analyze the structure-function relationships enabling FasL to activate Fas. The cytotoxic activity strongly depended on both the polymerization level of the chimera and the size of its constitutive monomers, more than on the affinity for Fas, which was very close for all three. Indeed, the most efficient construct was IgFasL, the most polymeric (dodecameric) but also the shortest one at the monomeric level. However, it is noteworthy that hexameric D1IgD2FasL was 10 times less cytotoxic than hexameric D2FasL, suggesting that the polymerization degree is not the only parameter to be important. In line with this, the IgM agonistic antibody 7C11 displays ten potential binding sites for Fas, and therefore should behave closely to the dodecameric IgFasL. However, we recently demonstrated that IgFasL can trigger apoptosis in cells harboring a mutation in the Fas death domain at the hemizygous state, which were completely insensitive to the agonistic antibody (23). Therefore, our results confirmed that the extent of FasL oligomerization is essential but not sufficient for triggering the apoptotic signal. We therefore hypothesized that a Fas conformational change might be required as well.

We explored this possibility with the cellular assay using the Fas-gp130 chimeric receptor. Trimeric cFasL, IgFasL and hexameric D2FasL efficiently triggered proliferation, but hexameric D1IgD2-FasL did not. It is possible that the voluminous D1IgD2 domain impairs the conformational change in the gp130 domain while maintaining Fas binding. This could similarly explain why it lacks cytotoxicity towards wild-type Fas. The agonistic anti-Fas antibody is also unable to trigger cell proliferation through Fas-gp130, although it efficiently triggers apoptosis (14, 26). As for D1IgD2FasL, this could be explained by structural constraints due to the IgM isotype. The apoptotic effect of the IgM mAb would then result from a large aggregation of Fas trimers, leading to caspase activation. In line with this, the non apoptotic cFasL is expected to trigger strong cell proliferation, as it is Fas natural

ligand and as such must display the best fit for this receptor. As IgFasL is capable of triggering the adequate Fas conformational change and is also polymeric, this would therefore explain why it can kill cells which normally resist to the agonistic antibodies (23). These results overall confirm our reported finding that FasL and antibodies do not stimulate identically the Fas signalling machinery (26), and confirm the requirement of minimal Fas aggregation by a multimeric ligand trigger (8).

The IgFasL chimera demonstrated a very potent apoptotic activity, in the absence of any cross-linking enhancing agent. Using experiments in mouse, we detected no liver damage after intravenous injection. Although these findings seem in contradiction with data showing that Fas engagement in mice induce an acute liver injury, it is noteworthy that these reports used in fact the anti-Fas JO2 agonistic antibody and not FasL (3, 27-30). The liver destruction observed following injection of anti-Fas antibodies may simply be the consequence of an antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity reaction, as the production of inflammatory cytokines by Fc receptor-bearing Kupffer cells has been observed (31). In addition, our results confirm another report, which showed that injection of a polymeric leucine-zipper chimeric FasL in rats only triggered a mild liver damage (32). Therefore, we predict that all forms of polymeric FasL which would depend on antibody-mediated cross-linking will be toxic. Using a transplanted human tumor mouse model, we then demonstrated an anti-tumor effect of a non-toxic dose of IgFasL, administered several times, locally or intraperitoneally at a distance from the tumor site. Therefore, IgFasL also demonstrated *in vivo* activity, by reducing tumor development. Although more experiments and higher doses are still required to better describe IgFasL toxicity and activity, it appears that for a future therapeutic use in cancer treatment, the design of soluble FasL forms spontaneously reaching a high degree of polymerization should also consider their ability to trigger the adequate Fas receptor conformational adaptation.

References

1. Bodmer, J. L., Schneider, P., and Tschopp, J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci*, 27: 19-26, 2002.
2. Krueger, A., Fas, S. C., Baumann, S., and Krammer, P. H. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol Rev*, 193: 58-69, 2003.
3. Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T., and Nagata, S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*, 364: 806-809, 1993.
4. Kayagaki, N., Kawasaki, A., Ebata, T., Ohmoto, H., Ikeda, S., Inoue, S., Yoshino, K., Okumura, K., and Yagita, H. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med*, 182: 1777-1783, 1995.
5. Mariani, S. M., Matiba, B., Baumler, C., and Krammer, P. H. Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases. *Eur J Immunol*, 25: 2303-2307, 1995.
6. Suda, T., Hashimoto, H., Tanaka, M., Ochi, T., and Nagata, S. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med*, 186: 2045-2050, 1997.
7. Schneider, P., Holler, N., Bodmer, J. L., Hahne, M., Frei, K., Fontana, A., and Tschopp, J. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med*, 187: 1205-1213, 1998.
8. Holler, N., Tardivel, A., Kovacovics-Bankowski, M., Hertig, S., Gaide, O., Martinon, F., Tinel, A., Deperthes, D., Calderara, S., Schulthess, T., Engel, J., Schneider, P., and Tschopp, J. Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol*, 23: 1428-1440, 2003.
9. Gearing, D. P., Thut, C. J., VandeBos, T., Gimpel, S. D., Delaney, P. B., King, J., Price, V., Cosman, D., and Beckmann, M. P. Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *Embo J*, 10: 2839-2848, 1991.
10. Taupin, J. L., Miossec, V., Pitard, V., Blanchard, F., Daburon, S., Raheer, S., Jacques, Y., Godard, A., and Moreau, J. F. Binding of leukemia inhibitory factor (LIF) to mutants of its low affinity receptor, gp190, reveals a LIF binding site outside and interactions between the two cytokine binding domains. *J Biol Chem*, 274: 14482-14489, 1999.
11. Voisin, M. B., Bitard, J., Daburon, S., Moreau, J. F., and Taupin, J. L. Separate functions for the two modules of the membrane-proximal cytokine binding domain of glycoprotein 190, the leukemia inhibitory factor low affinity receptor, in ligand binding and receptor activation. *J Biol Chem*, 277: 13682-13692, 2002.
12. Tenhumberg, S., Schuster, B., Zhu, L., Kovaleva, M., Scheller, J., Kallen, K. J., and Rose-John, S. gp130 dimerization in the absence of ligand: preformed cytokine receptor complexes. *Biochem Biophys Res Commun*, 346: 649-657, 2006.
13. Boulanger, M. J. and Garcia, K. C. Shared cytokine signaling receptors: structural insights from the gp130 system. *Adv Protein Chem*, 68: 107-146, 2004.
14. Legembre, P., Moreau, P., Daburon, S., Moreau, J. F., and Taupin, J. L. Potentiation of Fas-mediated apoptosis by an engineered glycosylphosphatidylinositol-linked Fas. *Cell Death Differ*, 9: 329-339, 2002.
15. Taupin, J. L., Acres, B., Dott, K., Schmitt, D., Kieny, M. P., Gualde, N., and Moreau, J. F. Immunogenicity of HILDA/LIF either in a soluble or in a membrane anchored form expressed in vivo by recombinant vaccinia viruses. *Scand J Immunol*, 38: 293-301, 1993.
16. D'Andrea, A. D., Yoshimura, A., Youssoufian, H., Zon, L. I., Koo, J. W., and Lodish, H. F. The cytoplasmic region of the erythropoietin receptor contains nonoverlapping positive and negative growth-regulatory domains. *Mol Cell Biol*, 11: 1980-1987, 1991.
17. Tian, Q., Taupin, J., Elledge, S., Robertson, M., and Anderson, P. Fas-activated serine/threonine kinase (FAST) phosphorylates TIA-1 during Fas-mediated apoptosis. *J Exp Med*, 182: 865-874, 1995.
18. Messier, T. L., Pittman, D. D., Long, G. L., Kaufman, R. J., and Church, W. R. Cloning and expression in COS-1 cells of a full-length cDNA encoding human coagulation factor X. *Gene*, 99: 291-294, 1991.
19. Nagata, S., Onda, M., Numata, Y., Santora, K., Beers, R., Kreitman, R. J., and Pastan, I. Novel anti-CD30 recombinant immunotoxins containing disulfide-stabilized Fv fragments. *Clin Cancer Res*, 8: 2345-2355, 2002.
20. Uphoff, C. C. and Drexler, H. G. Detection of mycoplasma contaminations. *Methods Mol Biol*, 290: 13-23, 2005.

21. Chen, T. R. In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp Cell Res*, *104*: 255-262, 1977.
22. Taupin, J. L., Gualde, N., and Moreau, J. F. A monoclonal antibody based elisa for quantitation of human leukaemia inhibitory factor. *Cytokine*, *9*: 112-118, 1997.
23. Beneteau, M., Daburon, S., Moreau, J. F., Taupin, J. L., and Legembre, P. Dominant-negative Fas mutation is reversed by down-expression of c-FLIP. *Cancer Res*, *67*: 108-115, 2007.
24. Schagger, H. Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta*, *1555*: 154-159, 2002.
25. Goldman, J. P., Blundell, M. P., Lopes, L., Kinnon, C., Di Santo, J. P., and Thrasher, A. J. Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor gamma chain. *Br J Haematol*, *103*: 335-342, 1998.
26. Legembre, P., Beneteau, M., Daburon, S., Moreau, J. F., and Taupin, J. L. Cutting edge: SDS-stable Fas microaggregates: an early event of Fas activation occurring with agonistic anti-Fas antibody but not with Fas ligand. *J Immunol*, *171*: 5659-5662, 2003.
27. Chida, Y., Sudo, N., Takaki, A., and Kubo, C. The hepatic sympathetic nerve plays a critical role in preventing Fas induced liver injury in mice. *Gut*, *54*: 994-1002, 2005.
28. Descamps, D., Vigant, F., Esselin, S., Connault, E., Opolon, P., Perricaudet, M., and Benihoud, K. Expression of non-signaling membrane-anchored death receptors protects murine livers in different models of hepatitis. *Hepatology*, *44*: 399-409, 2006.
29. Krautwald, S., Ziegler, E., Tiede, K., Pust, R., and Kunzendorf, U. Transduction of the TAT-FLIP fusion protein results in transient resistance to Fas-induced apoptosis in vivo. *J Biol Chem*, *279*: 44005-44011, 2004.
30. Song, E., Lee, S. K., Wang, J., Ince, N., Ouyang, N., Min, J., Chen, J., Shankar, P., and Lieberman, J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med*, *9*: 347-351, 2003.
31. Matsuda, Y., Toda, M., Kato, T., Kuribayashi, K., and Kakimi, K. Fulminant liver failure triggered by therapeutic antibody treatment in a mouse model. *Int J Oncol*, *29*: 1119-1125, 2006.
32. Shiraishi, T., Suzuyama, K., Okamoto, H., Mineta, T., Tabuchi, K., Nakayama, K., Shimizu, Y., Tohma, J., Ogihara, T., Naba, H., Mochizuki, H., and Nagata, S. Increased cytotoxicity of soluble Fas ligand by fusing isoleucine zipper motif. *Biochem Biophys Res Commun*, *322*: 197-202, 2004.

Titles and legends to figures

Figure 1. Obtention and functional characteristics of the FasL/gp190 chimeras.

Panel A: Modules constituting gp190 and FasL are depicted as mature proteins. EC, TM and IC represent the extracellular, transmembrane and intracellular domains, respectively. N and C represent the N- and C-terminal regions. The numbers depict the domain boundaries used to create the chimeras. Cleaved FasL (cFasL) is spontaneously generated by a metalloprotease cleaving between aminoacids 126 and 127. **Panel B:** Representation of the cleaved FasL (cFasL) and the gp190/FasL chimeras. **Panel C:** Serial dilutions of supernatants from COS cells transfected with the FasL constructs or the empty vector (control) were incubated with Jurkat cells. Cell death was measured using the MTT assay. As a positive control, we used the commercially available antibody-cross-linked FasL (recFasL). Calculated C50 are indicated on the graph. Results from one representative experiment out of 5 are depicted.

Figure 2. Biochemical characterization of the FasL/gp190 chimeras.

Panel A: Supernatants from COS cells transfected with the FasL constructs were quantified by ELISA and 10 µg of FasL protein were loaded per lane. Migrations were performed under reducing (SDS-PAGE) or non-reducing (BN-PAGE) conditions. FasL was revealed by immunoblot. **Panel B:** 2 µg of FasL construct were loaded on the gel filtration column. FasL was quantified by ELISA in elution fractions, and cytotoxicity was measured using the MTT assay. **Panel C:** Affinity measurement using Biacore®. Fas-Fc was immobilized on the chip, before the indicated soluble FasL constructs were analyzed. A range of concentrations was tested for each analyte, but only the graph obtained with the highest concentration is displayed. **Panel D:** The apparent molecular weights and degree of oligo/polymerization of

the FasL chimeras were estimated from the non denaturing gel electrophoresis and gel filtration experiments.

Figure 3. FasL/gp190 chimeras and agonistic antibodies differentially act on Fas conformation.

Panel A: Description of the model used to analyze the requirement for a Fas conformational change during its activation. The Fas-gp130 hybrid receptor is stably expressed in the IL-3 dependent BA/F3 cell line. **Panel B:** Cell surface staining of parent BA/F3 cells (upper panel) and on a representative clone stably expressing the Fas-gp130 chimera (lower panel), with an isotype-matched control (dotted line), anti-murine Fas JO2 (dashed line) and anti-human Fas DX2 (continuous line). **Panel C:** Fas-gp130 BA/F3 cells were incubated with the indicated Fas triggers or controls, and proliferation was measured using a MTT assay. Results are expressed as percentages of the maximum proliferation obtained with a saturating IL-3 concentration. Proliferation of parent and transfected cells was also measured in the absence of any IL-3 or Fas trigger. Values are the mean \pm sd of 3 independent experiments.

Figure 4. Anti-tumor activity of IgFasL.

Panel A: Tumor growth in mice having received subcutaneously 10^5 A431 cells at day 0, and 0.1 mL of concentrated IgFasL (white boxes) or IgFasL-free control (grey boxes) locally at days 2 and 7 (n = 6 mice per group). Tumor volumes are expressed in mm^3 . Values are presented as median, 25th and 75th percentiles (horizontal line, bottom and top of boxes), and 10th and 90th percentiles (bottom and top range bars) (**p=0.04, * p=0.05). **Panel B:** Kaplan-Meier analysis of cumulative survival without cancer of mice bearing A431 cells xenograft

treated with IgFasL (black circles) or IgFasL-free control (black squares) ($p=0.02$). $n= 20$ mice per group, from two experiments pooled.

Titles and legends to tables

Table 1. Association/dissociation constants of the soluble FasL chimeras.

Table 2. IgFasL does not induce liver damage.

Mice were injected with the indicated ligands as described in Materials and Methods. Blood samples were harvested at the indicated time points and the levels of alanine amino transferase (ALAT) and aspartate amino transferase (ASAT) were measured in the serum.

Figure 1

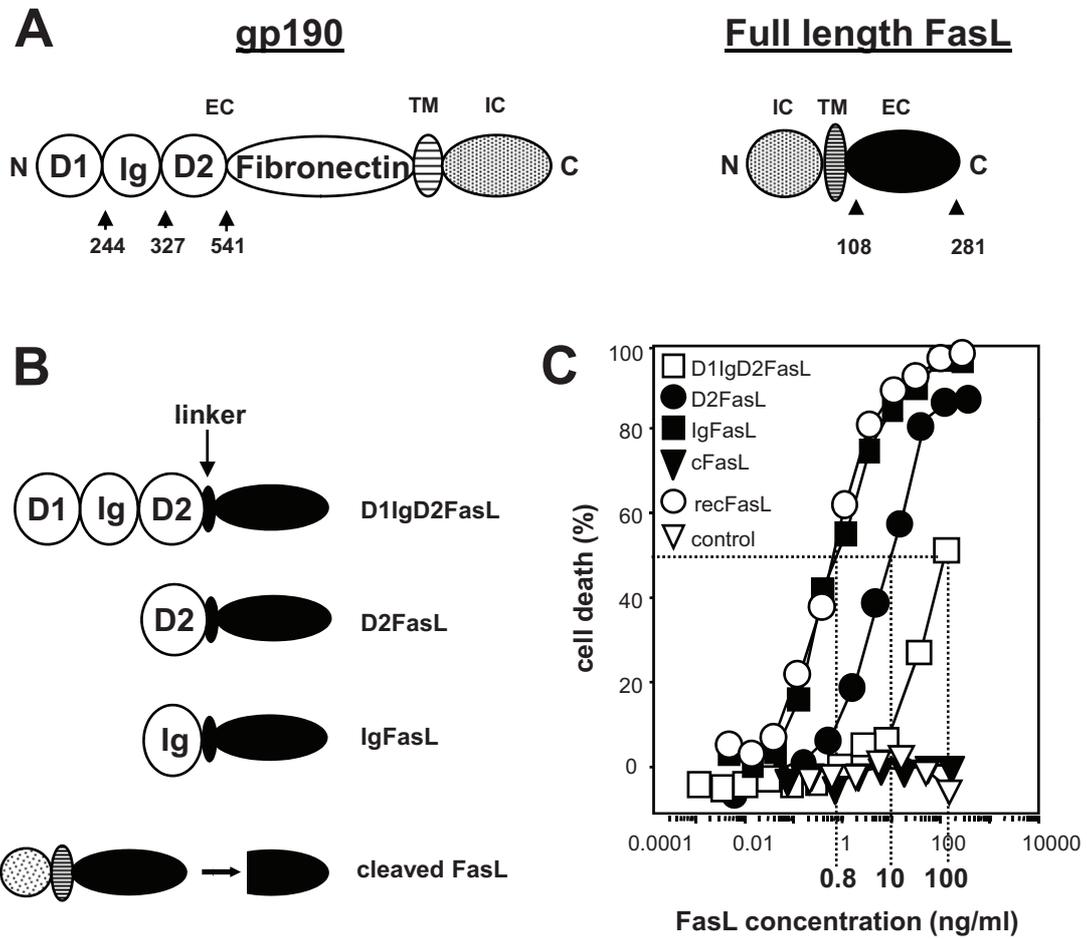


Figure 2

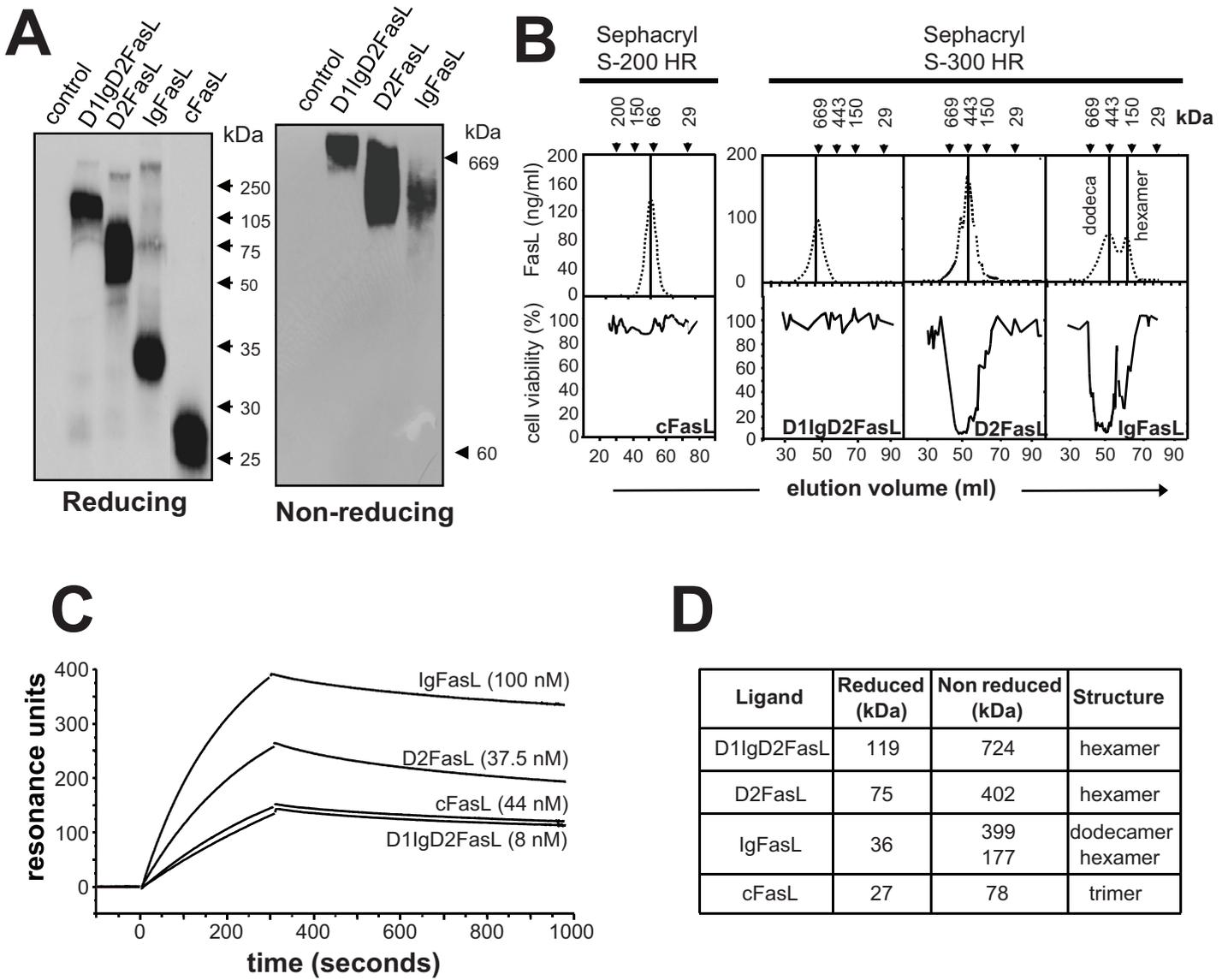


Figure 3

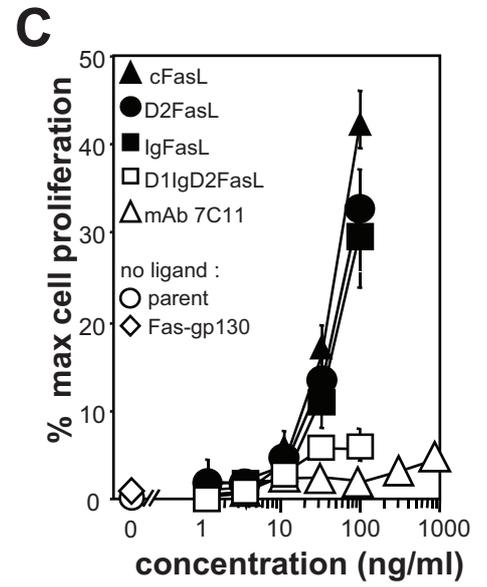
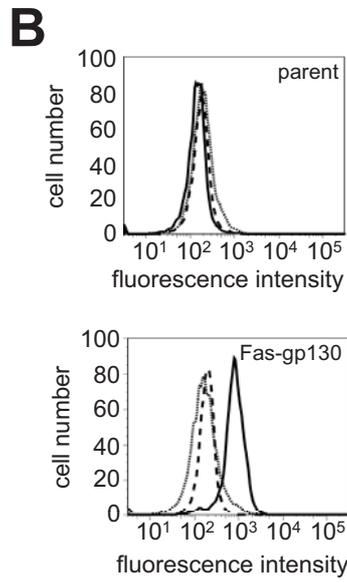
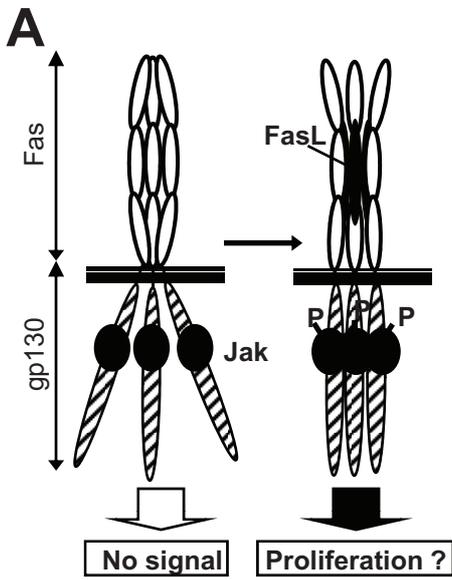
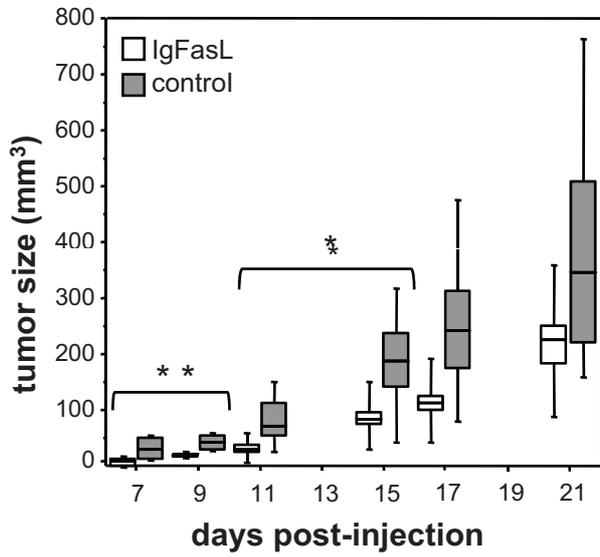


Figure 4

A



B

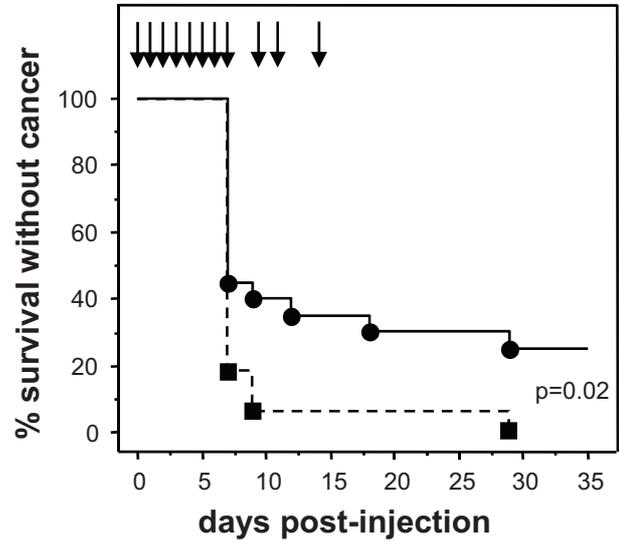


Table 1

Ligand	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)	Chi²
D1IgD2FasL	1.3×10^5	3.3×10^{-3}	2.56×10^{-8}	8.34
D2FasL	1.6×10^5	6.0×10^{-3}	3.85×10^{-8}	3.37
IgFasL	2.5×10^4	4.1×10^{-4}	1.16×10^{-8}	2.75
cFasL	8.4×10^4	5.9×10^{-3}	6.94×10^{-8}	16

Table 2

Fas trigger	ASAT (IU/ml)		ALAT (IU/ml)	
	6 hours	30 hours	6 hours	30 hours
Control (no PBS)	66	48	43	27
Control (PBS)	84	61	49	58
Anti-Fas (JO2) (mice 1,2)	12 383, 1 419	ND ¹ , 1 650	876, 27	ND ¹ , 6 197
IgFasL (mice 1, 2 and 3)	81, 80, 69	63, 205, 82	55, 31, 96	37, 50, 58

¹ not determined, euthanised before reaching time point

Liste des publications et communications

Publications

- **Devaud C**, Bilhere E, Loizon S, Pitard V, Behr C, Moreau J.F, Déchanet-Merville J and Capone M. *Anti-tumor activity of cytomegalovirus-induced V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells in a mouse tumor xenograft model.* **Cancer Research** 2009; 69: (9). May 1, 3971-78.
- **Devaud C**, Couillaud F, Rousseau B, Netzer S, Costet P, Moreau JF, Déchanet-Merville J, Capone M. *Anti-metastatic potential of human $\gamma\delta$ T cells in an orthotopic mouse xenograft model of colon carcinoma.* Manuscrit en préparation
- Daburon S, **Devaud C**, Costet P, Garrigue L, Maillason M, Hargous N, Lapaillerie D, Capone M, Bonneu M, Moreau-Gaudry F, Moreau J.F, Déchanet-Merville J and Taupin J.L. *Functional characterization of a chimeric soluble FasL polymer with in vivo anti-tumor activity.* Soumis à Cancer Research

Bulletins publiés:

- Résumé de communication orale paru dans le bulletin de la SFI N°117, Janvier 2008. *Etude du potentiel anti-tumoral de lymphocytes T $\gamma\delta$ réactifs contre le cytomegalovirus (**Devaud C et al**).*
- Résumé du Keystone Symposia sur *mobilizing cellular immunity for cancer therapy*, January 2009 dans l'Utah dans le bulletin de la SFI N°120, septembre 2009.

Rapport:

Ecriture d'un nouveau chapitre de thèse (NCT) pour l'association Bernard Grégory. Ce rapport consistait en un bilan de mon projet de thèse et de mes compétences.

Communications Orales

- **Devaud C**, Bilhere E, Couillaud F, Rousseau B, Netzer S, Pitard V, Moreau J.F, Déchanet-Merville J and Capone M. *Etude in vivo du rôle anti-tumoral de lymphocytes T gamma delta V delta 2 négatifs contre des tumeurs coliques-* **3^{ème} journée Doc' meeting de l'IFR66 (juin 2009) à Bordeaux, 1^{er} prix communication orale.**
- **Devaud C**, Bilhere E, Couillaud F, Rousseau B, Netzer S, Pitard V, Moreau J.F, Déchanet-Merville J and Capone M. *Etude in vivo du rôle anti-tumoral de lymphocytes T gamma delta dans un modèle animal-* **4^{ème} journée Cancéropôle Grand Sud-Ouest (octobre 2008) à Montpellier.**
- **Devaud C**, Bilhere E, Couillaud F, Netzer S, Pitard V, Loizon S, Berh C, Moreau J.F, Déchanet-Merville J and Capone M. *Delayed growth of human colon tumors in mice by distant injections of CMV-specific V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T lymphocytes-* **International $\gamma\delta$ T cell conference (mai 2008) à Marseille.**
- **Devaud C**, Bilhere E, Couillaud F, Rousseau B, Netzer S, Pitard V, Moreau J.F, Déchanet-Merville J and Capone M. *Growth inhibition of human colon tumors in mice by distant*

injections of CMV-specific V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T lymphocytes - **Annual Congress of French Society of Immunology (SFI) à Lyon (novembre 2007), prix de communication orale.**

Communications Affichées

• **Devaud C**, Bilhere E, Couillaud F, Rousseau B, Netzer S, Pitard V, Moreau J.F, Déchanet-Merville J and Capone M. *Delayed growth of human colon tumors in mice by distant injections of CMV-specific V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T lymphocytes* - **9^{ème} journée de l'Ecole doctorale Bordeaux 1 et 2 (Avril 2009) à Arcachon, 1^{er} prix poster.**

• **Devaud C**, Bilhere E, Couillaud F, Rousseau B, Netzer S, Pitard V, Loizon S, Berh C, Moreau J.F, Déchanet-Merville J and Capone M. *Delayed growth of human colon tumors in mice by distant injections of CMV-specific V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T lymphocytes* - **Keystone Symposia sur mobilizing cellular immunity for cancer therapy (Janvier 2009) dans l'Utah (USA).** Bourse de mobilité de la SFI pour participer à ce congrès.

• **Devaud C**, Bilhere E, Couillaud F, Rousseau B, Netzer S, Pitard V, Moreau J.F, Déchanet-Merville J and Capone M. *Etude in vivo du rôle anti-tumoral de lymphocytes T gamma delta Vdelta 2 négatifs contre des tumeurs coliques-* **Journée scientifique de l'IFR 66 (décembre 2008) à Talence.**

• **Devaud C**, Bilhere E, Couillaud F, Rousseau B, Netzer S, Pitard V, Moreau J.F, Déchanet-Merville J and Capone M. *Etude de la migration de lymphocytes T $\gamma\delta$, réactifs contre le cytomegalovirus, vers des cellules tumorales* - **2^{ème} journée Doc' meeting de l'IFR66 (juin 2008) à Bordeaux.**

• **Devaud C**, Bilhere E, Couillaud F, Rousseau B, Netzer S, Pitard V, Moreau J.F, Déchanet-Merville J and Capone M. *Etude de la migration de lymphocytes T $\gamma\delta$, réactifs contre le cytomegalovirus, vers des cellules tumorales* - **8^{ème} journée de l'Ecole doctorale Bordeaux 1 et 2 (Avril 2008) à Arcachon.**

• **Devaud C**, Bilhere E, Couillaud F, Rousseau B, Netzer S, Pitard V, Moreau J.F, Déchanet-Merville J and Capone M. *Etude de la migration de lymphocytes T $\gamma\delta$, réactifs contre le cytomegalovirus, vers des cellules tumorales* - **Journée scientifique de l'IFR 66 (décembre 2007) à Pessac.**

• **Devaud C**, Bilhere E, Couillaud F, Rousseau B, Netzer S, Pitard V, Moreau J.F, Déchanet-Merville J and Capone M. *Growth inhibition of human colon tumors in mice by distant injections of CMV-specific V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T lymphocytes* - **Annual Congress of French Society of Immunology (SFI) à Lyon (novembre 2007).**

• **Devaud C**, Bilhere E, Couillaud F, Rousseau B, Netzer S, Pitard V, Moreau J.F, Déchanet-Merville J and Capone M. *Etude de la migration de lymphocytes T $\gamma\delta$, réactifs contre le cytomegalovirus, vers des cellules tumorales-* **3^{ème} journée Cancéropôle Grand Sud-Ouest (octobre 2007) à Bordeaux, 2^{ème} prix poster.**

• **Devaud C**, Bilhere E, Couillaud F, Rousseau B, Netzer S, Pitard V, Moreau J.F, Déchanet-Merville J and Capone M. *Etude de la migration de lymphocytes T $\gamma\delta$, réactifs contre le cytomegalovirus, vers des cellules tumorales-* **2^{ème} journée Doc' meeting de l'IFR66 (juin 2007) à Bordeaux.**

• **Devaud C**, Bilhere E, Couillaud F, Rousseau B, Netzer S, Pitard V, Moreau J.F, Déchanet-Merville J and Capone M. *Etude de la migration de lymphocytes T $\gamma\delta$, réactifs contre le cytomegalovirus, vers des cellules tumorales*- **7^{ème} journée de l'Ecole doctorale Bordeaux 1 et 2 (Avril 2007) à Arcachon.**

• **Devaud C**, Bilhere E, Couillaud F, Rousseau B, Netzer S, Pitard V, Moreau J.F, Déchanet-Merville J and Capone M. *Etude de la migration de lymphocytes T $\gamma\delta$, réactifs contre le cytomegalovirus, vers des cellules tumorales*- **Journée scientifique de l'IFR66 de Bordeaux 2 (décembre 2006) à Pessac, 1er prix poster.**