

## **Immunologie des tumeurs**

### **I.**

(d'après Byrne and Halliday (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:396 ; Byrne and Halliday (2003) *Int.J.Cancer* 106:736 ; Halliday and Le (2001) *Intern. Immunol.* 13:1147 ; Lucas and Halliday (1999) *Immunology* 97:130)

Les raisons pour lesquelles certaines tumeurs sont détectées par le système immunitaire et détruites alors que d'autres persistent et se développent, restent encore aujourd'hui inexplicables. L'immunogénicité propre des tumeurs mais également les mécanismes d'échappement développés par celles-ci jouent un rôle déterminant. Les auteurs ont ici étudié spécifiquement ces données dans différents modèles tumoraux utilisant deux types de lignées cellulaires tumorales dérivées de carcinomes : la première capable de se développer après injection chez la souris (désignée comme « progressive ») alors que la seconde (désignée comme « régressive ») est rejetée spontanément chez les souris immunocompétentes.

Les données dans les autres modèles tumoraux, notamment ceux des mélanomes, suggèrent fortement que le système immunitaire joue un rôle prépondérant dans la régression des tumeurs. Dans ce sens, il a pu être mis en évidence chez la souris, par des techniques d'immunohistochimie, une infiltration importante des carcinomes « régressifs » par les cellules CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, en comparaison avec les carcinomes de type « progressifs ». Reste à comprendre les mécanismes favorisant ou limitant, selon le type de tumeur, la réponse anti-tumorale.

Les auteurs ont cherché à caractériser la nature du microenvironnement cytokinique au sein des tumeurs obtenues à partir de patients présentant un carcinome des cellules basales (BCC) de type progressif ou régressif. Les mécanismes effecteurs mis en œuvre pour la régression tumorale sont ainsi analysés. 10 tumeurs régressives vs 10 tumeurs non-régressives ont été analysées par une technique sensible de RT-PCR quantitative.

**Question 1.** *Décrivez le profil cytokinique observé dans les différents échantillons (Figure 1) et proposez des mécanismes effecteurs pouvant être impliqués dans la réponse anti-tumorale.*

Dans le cas des carcinomes, la réponse anti-tumorale primaire est déclenchée après activation des lymphocytes T naïfs par les antigènes tumoraux présentés par les cellules de Langerhans (LC) au niveau des ganglions lymphatiques drainants.

Les étapes d'infiltration des LC au niveau de la tumeur, leur migration jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires drainants apparaissent donc déterminantes pour le déclenchement des réponses immunitaires.

La migration des LC a pu être étudiée et visualisée par les auteurs après badigeonnage de la peau par du FITC (molécule fluorescente).

**Question 2.** *Déterminez à partir de la Figure 2, les facteurs influençant la migration des LC.*

**Question 3.** *Justifiez l'utilisation des souris nude (nu/nu) dans la Figure 3.*

Question 4. D'après les Figure 3 et Figure 4, donnez une explication quant à la différence d'évolution des deux types de tumeurs (progressives et régressives) chez les souris immunocompétentes.

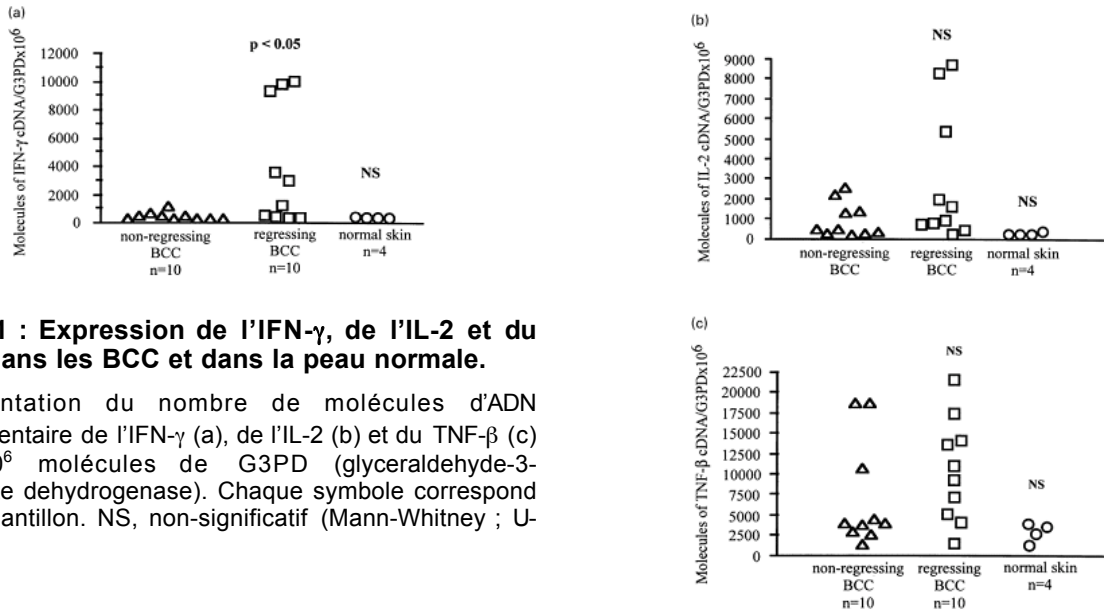


Figure 1 : Expression de l'IFN- $\gamma$ , de l'IL-2 et du TNF- $\beta$  dans les BCC et dans la peau normale.

Représentation du nombre de molécules d'ADN complémentaire de l'IFN- $\gamma$  (a), de l'IL-2 (b) et du TNF- $\beta$  (c) pour  $10^6$  molécules de G3PD (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Chaque symbole correspond à un échantillon. NS, non-significatif (Mann-Whitney ; U-test)

Figure 2 :

Les souris sont traitées pendant 5 jours avec une pommade contrôle ou contenant du surnageant tumoral récolté in vitro à partir des cultures des cellules de carcinome de type T7 (de type progressive). 24h après, les souris sont badigeonnées avec du FITC dilué à 0,5% dans un solvant. 18h plus tard, les feuilletts épidermiques sont prélevés, marqués par un anticorps spécifique du CMH-II. Après lecture du marquage, le pourcentage de migration des LC est déterminé pour chaque groupe par comparaison avec les souris badigeonnées avec du solvant seul.

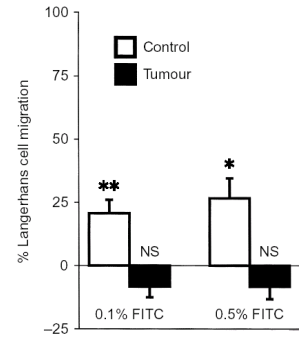


Figure 3 :

Différentes lignées de cellules tumorales « régressives » ou « progressives » sont injectées dans des souris BALB/c nu/nu. Lorsque les tumeurs atteignent 10mm de diamètre, la moitié des souris sont badigeonnées avec une solution FITC 1%, l'autre moitié avec du solvant seul. Les souris contrôles ne reçoivent pas de tumeur. La migration des LC est déterminée comme précédemment.

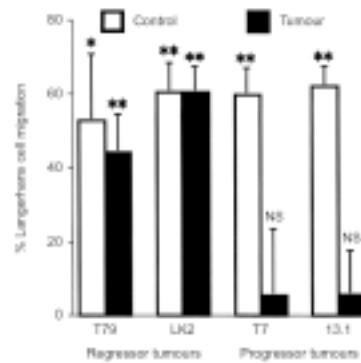


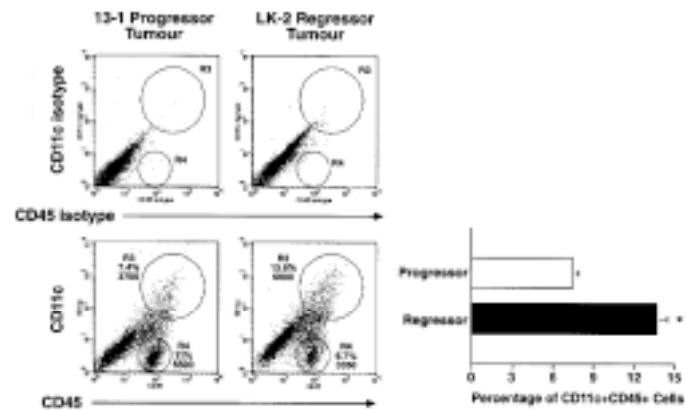
Figure 4 :

(A)

(A) Les cellules dendritiques infiltrant les tumeurs progressives ou régressives sont identifiées par cytométrie de flux à l'aide des anticorps spécifiques du CD11c et du CD45 (région R3). Les anticorps isotypiques sont utilisés en parallèle pour contrôler la spécificité des anticorps et placer correctement les fenêtres d'analyses.

(B)

(B) Le pourcentage moyen (n=7) de DC infiltrant les tumeurs est ici représenté.

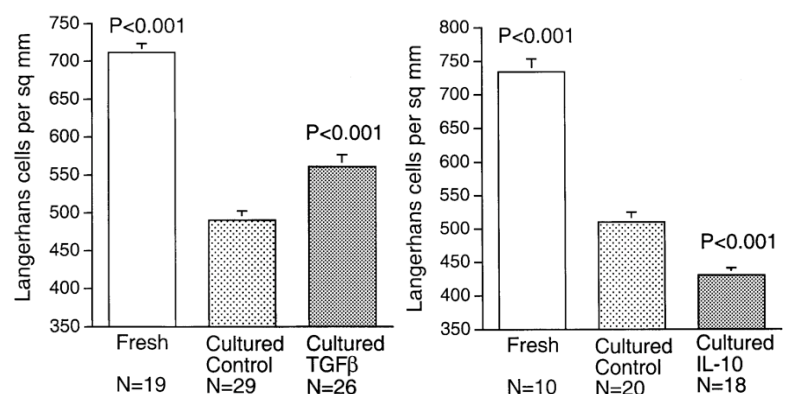


De nombreuses cytokines, produites au niveau de la peau, sont connues pour agir sur la maturation et la migration des LC. Le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , le GM-CSF et l'IL-10 peuvent toutes influencer la maturation ou la migration des LC.

**Figure 5 :**

(A) De la peau de souris est prélevée, l'épiderme est soit isolé immédiatement et marqué spécifiquement pour les LC (fresh), soit mis en culture pendant 3H en l'absence (cultured control) ou en présence de TGF- $\beta$  à 50ng/ml (cultured TGF- $\beta$ ). Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM des LC révélées dans l'épiderme.

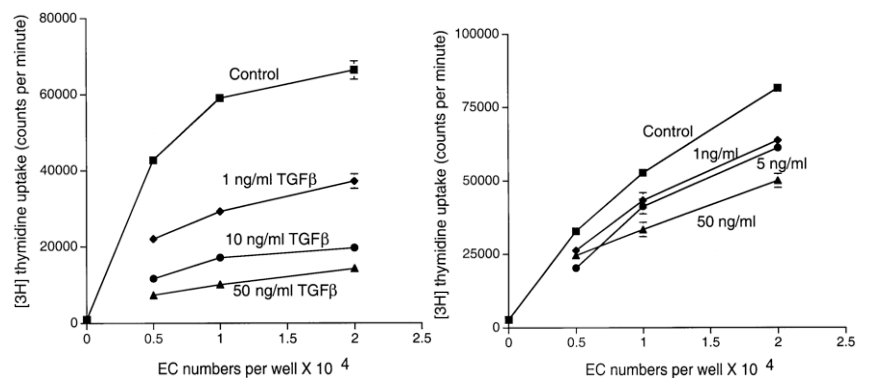
(B) Des expériences identiques ont été réalisées avec de l'IL-10 (5 ng/ml).



**Figure 6 :**

(A) Les cellules épidermales (EC) sont mises en culture, à des concentrations variables, pendant 3 jours en l'absence (contrôle) ou en présence de 1, 10 ou 50ng/ml de TGF-b1. Les cellules sont ensuite lavées plusieurs fois et co-cultivées en présence de splénocytes allogéniques déplétés en monocytes. La prolifération cellulaire est déterminée par incorporation de Thymidine tritiée. La moyenne est déterminée à partir de 12 cultures distinctes.

(B) Des expériences identiques ont été réalisées en présence de 1, 5 ou 50 ng/ml d'IL-10.



**Question 5.** Révélez, d'après les Figure 5 et Figure 6, l'action du TGF- $\beta$  et de l'IL-10 sur la migration et l'état d'activation des cellules LC ?

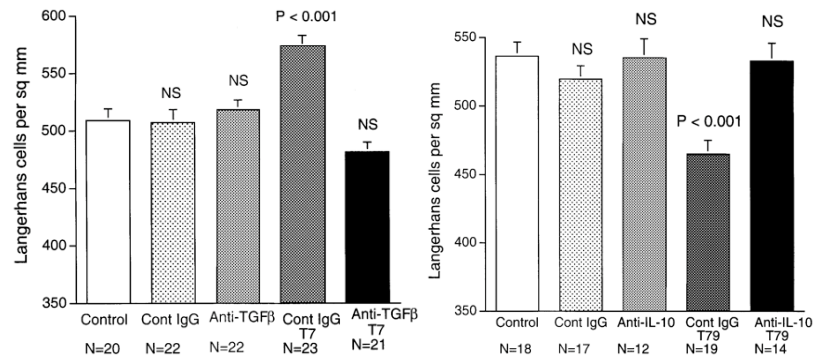
**Question 6.** Dans ce même type d'expérience, quel serait selon vous l'effet des anticorps spécifiques du TGF- $\beta$  ou de l'IL-10 sur la prolifération des lymphocytes allogéniques mis en contact avec les cellules épithéliales allogéniques (traitées au préalable par les anticorps cités)?

**Question 7. Proposez des expériences qui permettraient de caractériser le profil cytokinique spécifique des cellules tumorales de type progressives ou régressives.**

Pour révéler directement l'action des cytokines sécrétées par les cellules tumorales (de type progressives ou régressives) sur les LC, les auteurs ont mis en culture des échantillons de peau en présence des surnageants obtenus à partir des cultures des lignées tumorales (**Figure 7**).

**Figure 7 :**

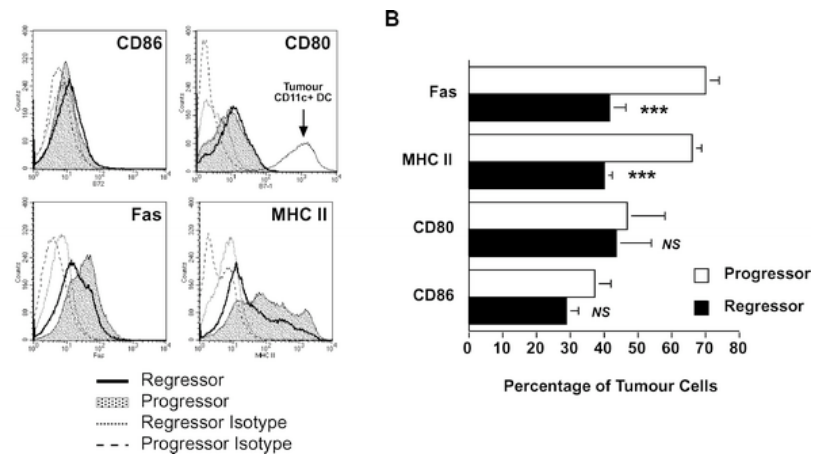
La peau est mis en culture pendant 3h en l'absence ou en présence du surnageant des lignées progressives T7 (A) ou des lignées régressives T79 (B). Les anticorps contrôles IgG de lapin ou ceux dirigés contre le TGF- $\beta$  ou l'IL-10 sont ajoutés dans certaines cultures. Les feuilletts de l'épiderme sont ensuite isolés et marqués spécifiquement pour révéler les LC. La numération moyenne, calculée à partir de 3 expériences indépendantes, est ici représentée.



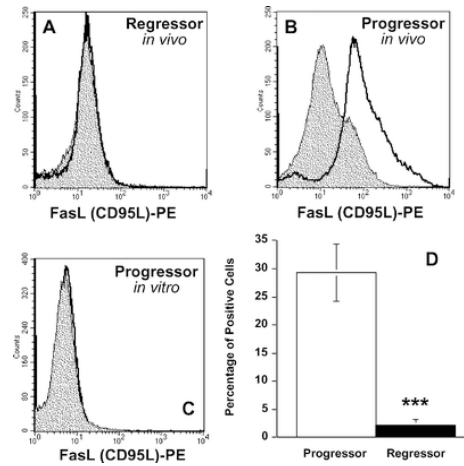
Il est maintenant établi que certaines cellules tumorales ont la particularité de pouvoir développer des mécanismes d'échappement au système immunitaire. Les auteurs se sont ici intéressés, dans leur modèle de tumeurs régressives ou progressives, aux mécanismes d'échappements éventuels et plus particulièrement à l'implication de FasL.

**Figure 8 : Expression du CD80, CD86, Fas et MCH II par les cellules tumorales « progressives » et « régressives ».**

Il est précisé que les cellules tumorales régressives prélevées chez la souris sont marquées plus fortement par l'annexin-V que les cellules tumorales progressives (résultats non-montrés ici)



**Figure 9 : Expression de FasL par les cellules tumorales « progressives » et « régressives ».**



**Question 8.** *D'après les Figure 7, Figure 8 et Figure 9, précisez dans votre interprétation expliquant le caractère progressif ou régressif de ces tumeurs, les différents mécanismes et molécules impliqués.*

**Question 9.** *Expliquer la différence d'expression de FasL entre les cellules tumorales prélevées in vivo et celles in vitro (Figure 9). Proposez des expériences complémentaires cherchant à élucider cette différence.*