



**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Immunologie
(Ecole doctorale Physiologie et Physiopathologie)

Présentée par

Mlle Claire GALAND

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

« Etude de la présence et du rôle des lymphocytes Th17 dans le micro-environnement des lymphomes B murins »

soutenue le 18/11/2011

devant le jury composé de :

M. le Professeur Adrien Six
M. le Docteur Paul Walker
M. le Professeur Eric Tartour
Mme le Docteur Nadine Cerf-Bensussan
M. le Professeur Thierry Molina
Mme le Professeur Catherine Sautès-Fridman
M. le Professeur Sylvain Fisson

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Co-Directrice de Thèse
Co-Directeur de Thèse

Laboratoire d'accueil :

Centre de Recherche des Cordeliers - UMRS 872

Equipe 13 « micro-environnement immunitaire et tumeurs » - Pr. C. Sautès-Fridman

15, rue de l'Ecole de Médecine

75006 Paris

Remerciements

Je remercie Hervé Fridman pour son accueil au sein du Centre de Recherche des Cordeliers. Les discussions scientifiques que nous avons partagé ont été essentielles à l'avancé de mes travaux de recherche. J'ai découvert le monde en salle café à travers vos récits de voyages.

Je remercie Catherine Fridman de m'avoir accueillie au sein de l'équipe 13 « micro-environnement immunitaire et tumeurs » et d'avoir accepté d'être co-directrice de ma Thèse. Les réunions dans ce bureau qui m'intimidait beaucoup au début m'ont toujours apporté un recul nécessaire sur mes résultats. Merci aussi pour vos précieux conseils pour la suite de mon parcours dans la Recherche.

Je remercie Sylvain Fisson de m'avoir accueillie dans la « PIOL team » et d'avoir supervisé ce travail. Merci aussi d'avoir cru en moi pour reprendre le sujet du PIOL et le faire évoluer. J'ai grâce à toi appris énormément sur le plan scientifique et technique, et développer une autonomie indispensable pour la suite de mes projets. Nos échanges m'ont beaucoup apporté même si nos 2 caractères n'ont pas toujours été « en phase » !

Je remercie le Pr Adrien Six, le Dr Paul Walker, le Pr Eric Tartour, le Dr Nadine Cerf-Bensussan et le Pr Thierry Molina d'avoir accepté de faire partie de mon jury de Thèse. Je remercie spécialement mes 2 rapporteurs de Thèse, le Dr Walker et le Pr Tartour, pour leurs conseils en vue de l'amélioration de mon manuscrit.

Je tiens à remercier Jean-Luc Teillaud pour son soutien tout au long des ces années de Thèse et tout particulièrement lors du « creux » du début de 3^{ème} année. Vos remarques et vos encouragements ont eu raison de cette mauvaise période.

Je remercie le reste de la « PIOL team », membres présents ou passés vous resterez toujours des PIOL girls même Jérémie ! Merci Sabrina de toujours avoir été présente pour répondre à mes questions, pour discuter Science et surtout pour les fous rires à la recherche du fil de suture à l'animalerie par -15°C. Merci Jérémie pour la meilleure blague de tous les temps. Merci Lucile (la reine de la gamelle) et Hanane (et tes bras de bébé) : mes copines pour toujours, notre trio de choc m'a fait vivre des moments inoubliables.

Merci beaucoup à tous les membres des équipes 13, 14 et 15 présents ou passés pour la bonne ambiance et le soutien apporté par chacun d'eux. Merci pour les conseils techniques de Mélanie et Tessa, je ne vous embêterai plus avec mes bandes de PCR. Merci à Véro et Jérôme pour vos justes remarques en réunions de labo. Thank you

very much Lubka and Diya for your nice advices to correct my English. Merci à Chris pour m'avoir fait prendre conscience de la contenance d'une bouteille d'Evian. Merci aussi à Charlotte qui nous a re-boosté à coup de calories enrobées dans des gâteaux irrésistibles ! Merci à Romain, Lucile et Caro de relever les défis culinaires les plus exotiques ! Merci Jérémy d'être Lorientais.

Merci à ma collègue de bureau préférée. Je suis heureuse de finir cette Thèse à tes côtés ... sans que mon bureau n'ait été submergé de café ou de posters du Complément! Tes ronchonchons et tes petits mots doux me manqueront.

Je remercie les stagiaires qui ont du me supporter pendant des semaines entières : merci Séverine et ton « gilles-de-la-tourette-de-l'animalerie » qui permettait de finir les manips, merci Amélie pour ta gentillesse et merci Meriem pour ta volonté sans faille.

Je remercie aussi les membres de l'équipe 16 pour votre gentillesse infinie et pour m'avoir toujours laissé fouiner dans vos frigos! Merci Cyril pour les bonnes parties de rigolades et les commentaires en réunion du Conseil...

Merci Jules pour m'avoir guidée sur le chemin de l'allergie. Merci aussi à Marie, Constance, Malika et tous les autres du CRC avec qui nous avons partagé de bons moments entre « jeunes chercheurs ».

Merci à Marie-Paule qui m'a mis le pied à l'étriller ! Merci à Tony d'avoir pris le relai.

Merci à mes amis du M2 : Hélène, Seb et Vincent. Merci aux bretons chers à mon cœur qui ont vu tant de week-end reportés. Merci à Nico. Et merci à mes parents de m'avoir poussée à faire tant d'études !

Résumé

Le principal cancer hématologique est le lymphome B non-hodgkinien (LNH) dont la forme la plus courante est le lymphome B diffus à grande cellule (DLBCL). La présence d'un infiltrat lymphocytaire T dans le micro-environnement d'un LNH-B nodal a été clairement associée à un bon pronostic vital des patients. Le LNH-B peut se développer dans divers tissus dont certains organes immunologiquement privilégiés, comme les yeux et le cerveau, où les réponses immunitaires sont inhibées ou retardées. Mon projet de thèse a consisté à étudier les interactions tumeur-micro-environnement immunitaire dans des sites de privilège immunitaire.

Nous avons comparé les infiltrats immunitaires de lymphomes B murins à grandes cellules intra-splénique, intra-cérébral et intra-oculaire par cytométrie en flux. Les lymphocytes T (LT), majoritairement CD4⁺, infiltreront les lymphomes B quelles que soient leurs localisations. Les Th17, une sous-population lymphocytaire CD4⁺ produisant de l'IL-17, sont présents dans les 3 sites tumoraux et nous avons démontré leur rôle anti-tumoral dans le lymphome intra-oculaire.

Cependant, nous avons mis en évidence l'impact suppresseur des Treg sur les LT effecteurs dans les organes immunologiquement privilégiés uniquement, par stimulation *ex vivo* des LT et déplétion *in vivo* des Treg. Lorsque cette inhibition est levée, la progression tumorale est ralentie et d'autres sous-populations T CD4⁺ sont favorisées en fonction de la localisation de la tumeur : les Th2 dans l'œil et les Th17 dans le cerveau.

L'ensemble de ces données montre l'importance des LT effecteurs dans le contrôle du développement du lymphome B à grandes cellules y compris dans les sites immunologiquement privilégiés. Une piste importante à explorer serait de stimuler les LT effecteurs en tenant compte de la localisation pour améliorer le traitement des DLBCL.

Mots clés : LNH ; DLBCL ; micro-environnement immunitaire ; Th17 ; IL-17 ; IL-21 ; Treg ; privilège immun ; œil ; cerveau

Abstract

« Characterization of presence and role of Th17 lymphocytes in murine B-cell lymphomas microenvironment »

Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) is the main B cell non hodgkin lymphoma (NHL) subtype which is the most common form of hematologic malignancy. A rich T-cell infiltrate in the B-NHL microenvironment is clearly associated with a good survival rate. B-NHL could take origin in different kind of tissues of which immune privileged sites as eyes and brain where immune reactions are inhibited or delayed. My PhD project was to study tumor-immune microenvironment interactions in immune privileged sites.

We studied immune infiltrate in intrasplenic, intracerebral or intraocular large B-cell murine models with flow cytometry. T lymphocytes, mainly composed of CD4⁺ T cells, infiltrate B-cell lymphomas independently of the localization. Th17 cells, an IL-17-producing CD4⁺ T cell sub-population, are present in the micro-environment of the three tumor sites and we demonstrated their anti-tumor role in the intraocular lymphoma.

Nevertheless, we highlighted the suppressor impact of Treg on effector T cells only in immune privileged sites, by *ex vivo* stimulation and *in vivo* Treg depletion. When the inhibition was unactivated, tumor growth slowed and other CD4⁺ T-cells sub-populations are favored : Th2 in eyes and Th17 in brain.

Overall, these data showed the strong importance of effector T cells for the large B cell lymphoma growth control, including in immune privileged sites. Stimulating effector T cells, taking to account tumor localization, should be further investigated to enhance DLBCL treatment.

Key words : NHL; DLBCL; immune microenvironment; Th17; IL-17; IL-21; Treg; immune privilege; eye; brain

Abréviations

A

ABC : activated B-cell like ; (lymphome) à cellules ressemblant à des lymphocytes B activés

ACAID : anterior chamber-associated immune deviation ; déviation de la réponse immune associée à la chambre antérieure (de l'oeil)

ADCC : antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity ; cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps

AID : activation-induced cytidine deaminase ; cytidine déaminase induite par l'activation

B

Bcl : B-cell lymphoma protein

BHE : barrière hémato-encéphalique

BL : Burkitt lymphoma ; lymphome de Burkitt

C

CCL, CXCL : ligand de chimiokine

CCR : récepteur de chimiokine

CD : cluster de différenciation

CGH : comparative genomic hybridization (array) ; test d'hybridation génomique comparative

CHOP : chimiothérapie à base de Cyclophosphamide, Doxorubicine Hydrochloride, Vincristine (Oncovin) et Prednisone

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellule présentatrice d'antigènes

CTL : cytotoxic T-lymphocyte ; lymphocyte T cytotoxique

CTLA : CTL-associated antigen ; antigène associé aux CTL

D

DAMP : danger signals molecular pattern ; motif moléculaire associé à la mort cellulaire

DC : cellule dendritique

DLBCL : diffuse large B-cell lymphoma ; lymphome B diffus à grandes cellules

E

EAE : encéphalomyélite auto-immune expérimentale

EAU : experimental autoimmune uveitis ; uvéite auto-immune expérimentale

EBV : virus d'Epstein-Barr

EGF : epidermal growth factor ; facteur de croissance épidermique

F

FGF : fibroblast growth factor ; facteur de croissance fibroblastique

FL : follicular lymphoma ; lymphome folliculaire

Foxp : Forkhead box protein

G

GCB : germinal center B-cell like ; (lymphome) à cellules ressemblant à des lymphocytes du centre germinatif

GFP : green fluorescent protein ; protéine fluorescente verte

GM-CSF : granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

H

HHV8 : virus de l'herpès humain 8

HIES : hyperimmunoglobulin E syndrome ; Syndrome d'hyper IgE

hu : humain

I

IDO : indoleamine 2,3-dioxygenase

IFN : interferon

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

IPEX : immuno-dérégulation associée à une polyendocrinopathie et une entéropathie liées au chromosome X

iTreg : Treg induit

K

KSHV : Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ; Sarcome de Kaposi associé au virus de l'herpès

L

LB : lymphocyte B

LH : lymphome hodgkinien

LNH : lymphome non-hodgkinien

LT : lymphocyte T

M

MALT : mucosa-associated lymphoid tissue ; Tissu lymphoïde associé aux muqueuses

MICI : maladies chroniques inflammatoires de l'intestin

ML : mantle lymphoma ; lymphome du manteau

mu : murin

MZL : marginal zone lymphoma ; lymphome systémique de la zone marginale

N

NFkB : nuclear factor kappa B

NK : natural killer

nTreg : Treg naturel

O

OMS : organisation mondiale de la santé

P

PBML : primary mediastinal B-cell lymphoma ; lymphome de type B mediastinal primitif

PBS : phosphate buffer saline

PCNSL : primary central nervous system lymphoma ; lymphome primitif du système nerveux central

PIOL : primary intraocular lymphoma ; lymphome intrao-culaire primitif

R

RA : rheumatoid arthritis ; polyarthrite rhumatoïde

ROR : RAR-related orphan receptor

S

SIDA : syndrome d'immuno-déficience acquise

SLE : systemic lupus erythematosus; lupus érythémateux disséminé

SNC : système nerveux central

T

TCR : T-cell receptor ; récepteur du lymphocyte T

Teff : (lymphocyte) T effecteur

TGF : tumor growth factor ; facteur de croissance tumoral

Th : (lymphocyte) T helper ; T auxiliaire

TNF : tumor necrosis factor ; facteur de nécrose tumoral

Treg : (lymphocyte) T régulateur

V

VEGF : vascular endothelial growth factor ; facteur de croissance vasculaire endothélial

VIP : vaso-intestinal peptide ; peptide vaso-intestinal

Table des Matières

Remerciements	3
Résumé	5
Abstract	6
Abréviations	7
Table des Matières.....	10
Introduction	14
1 - Les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL)	14
1.1. Introduction générale des lymphomes.....	14
1.1.1. Classification	15
1.1.2. Epidémiologie.....	15
1.2. Nosologie des DLBCL.....	16
1.2.1. Stade de développement : morphologie et phénotype.....	17
1.2.2. Anomalies moléculaires	17
1.2.3. Localisation	20
1.2.4. Conclusion sur la nosologie des DLBCL	21
1.3. Epidémiologie	22
1.4. Etiologie	23
1.5. Diagnostic de la maladie	24
1.6. Thérapie.....	25
1.7. Les modèles murins de lymphomes B.....	26
2 - Le micro-environnement immunitaire des DLBCL	28
2.1. Généralités sur le micro-environnement immunitaire des tumeurs solides.....	28
2.1.1. Le stroma et les cellules vasculaires	29
2.1.2. Le micro-environnement immunitaire	29

2.1.2.1	Rôle du système immunitaire dans les tumeurs.....	29
2.1.2.2	Déclenchement des réponses immunitaires envers la tumeur	30
2.1.2.3	Les acteurs de l'immunité anti-tumorale	32
2.1.2.4	Les acteurs suppresseurs de l'immunité anti-tumorale	35
2.1.2.5	Les mécanismes de l'hôte modulant l'immuno-suppression des réponses anti-tumorales	37
2.1.3.	Le pronostic associé aux cellules immunitaires.....	38
2.2.	Le micro-environnement des lymphomes à grandes cellules B.....	38
2.2.1.	Localisation nodale	39
2.2.2.	Localisation extranodale	40
2.3.	Le micro-environnement des lymphomes dans un site immunologiquement privilégié	40
2.3.1.	Définition du privilège immunitaire	40
2.3.2.	Le lymphome primitif du système nerveux central (PCNSL)	41
2.3.3.	Le lymphome testiculaire.....	42
2.4.	Conclusions sur le micro-environnement des DLBCL	42
3 –	Les lymphocytes Th17.....	44
3.1.	Identification des Th17	44
3.1.1.	Description phénotypique et polarisation.....	44
3.1.2.	Caractéristiques inflammatoires des cytokines Th17.....	46
3.1.3.	Autres sources des cytokines Th17.....	47
3.2.	Rôle des Th17 dans les désordres immunitaires	48
3.2.1.	Th17 et maladies auto-immunes	49
3.2.2.	Th17 et allergies.....	50
3.3.	Th17 et immunité anti-microbienne	51
3.4.	Rôle des Th17 dans les cancers.....	52
3.4.1.	Généralités.....	52
3.4.2.	Présence et rôle des Th17 dans les lymphomes B.....	57
3.4.3.	Balance Th17/Treg dans les cancers.....	57

3.4.2.1 Mécanismes d'action immuno-suppressive	57
3.4.2.2 Rôle des Treg dans les cancers.....	59
3.4.2.3 Rôle des Treg dans les lymphomes B	60
3.4.2.4 Rôle de la balance Th17/Treg dans les cancers.....	60
4 – Objectifs de la thèse	63
Résultats	65
I. Etude du micro-environnement immunitaire du lymphome B chez la souris – Impact de la localisation du lymphome.....	65
a. Article 1.....	65
b. Résultats non publiés 1.....	67
II. Présence et rôle des Th17 et de leurs cytokines dans le PIOL.....	68
a. Article 2.....	68
b. Résultats non publiés 2.....	70
i. Molécules favorables aux Th17 dans l'œil de souris.....	70
ii. Effet de l'IL-21 sur la différenciation des cellules tumorales	70
iii. Traitement des souris PIOL par l'IL-21.....	71
III. Impact de la localisation du lymphome B sur le rôle des Treg et des Th17 envers la tumeur (résultats non publiés).....	75
a. Rôle des Treg dans le lymphome B en fonction de sa localisation	75
b. Rôle de l'IL-17 dans le lymphome B en fonction de sa localisation	77
Discussion	79
I. Etat du micro-environnement immunitaire des lymphomes de type DLBCL en fonction de la localisation.....	79
II. Présence des lymphocytes Th17 dans le micro-environnement du PIOL	80
III. Rôle des lymphocytes Th17 dans le micro-environnement du PIOL.....	81
IV. Rôle de la balance Treg/Th17 dans le micro-environnement du lymphome B en fonction de sa localisation	82
Conclusion et perspectives	84

Bibliographie	86
Annexes	100
I. Article « Cytokine profile in human eyes with intraocular lymphoma: contribution of a new cytokine combination for differential diagnosis with uveitis ».....	100
II. Revue « Murine models of B cell lymphomas : promising tools for designing cancer therapies »	101
III. Article « Naturally occurring CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells participate in but do not govern immune escape in primary intraocular lymphoma ».....	102
IV. Matériel et méthodes.....	103

Introduction

1 - Les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL)

1.1. Introduction générale des lymphomes

Les lymphomes sont des cancers hématopoïétiques d'origine lymphocytaire. Ils présentent une dérégulation du cycle cellulaire et une prolifération autonome liés à des altérations génétiques (activation ou inactivation de gène) (de Jong and Enblad, 2008). Les lymphomes représentent respectivement 3 et 4% des cancers dans le monde chez l'homme et la femme (Roman and Smith, 2011) et 32% des hémopathies malignes (Smith et al., 2010) (Figure 1).

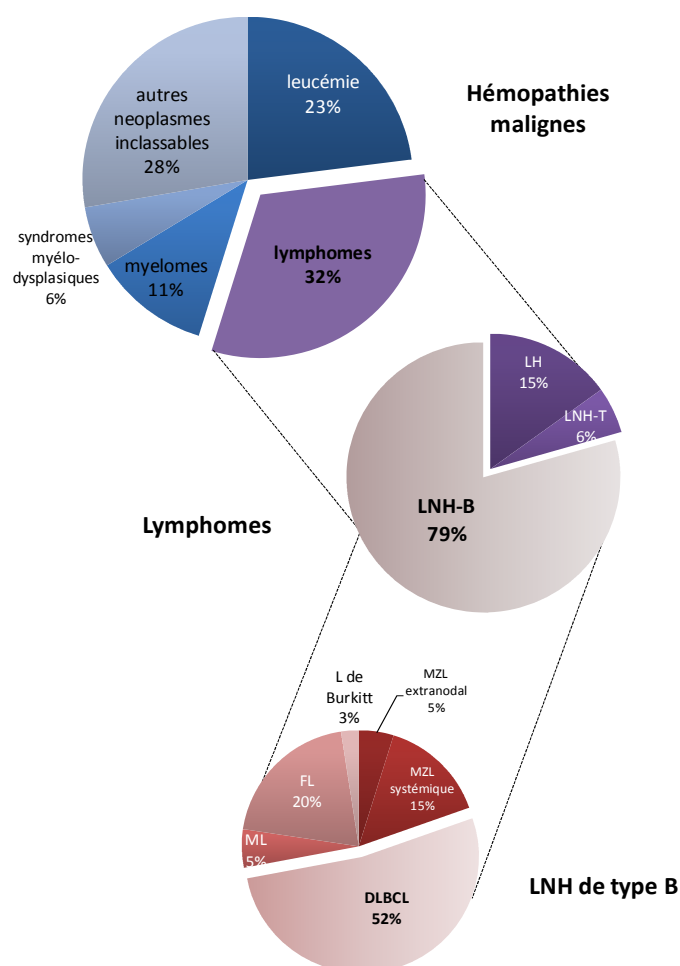


Figure 1. Répartitions des différents types de lymphomes parmi les hémopathies malignes. Les lymphomes représentent le type de néoplasme hématologique le plus répandu. Au sein des lymphomes, ce sont les lymphomes non-hodgkiniens de type B (LNH-B) qui sont majoritaires. Parmi les LNH de type B, les DLBCL en représentent plus de la moitié (Smith et al., 2010).

1.1.1. Classification

La classification des lymphomes de l'organisation mondiale de la santé (OMS ou WHO en anglais) tient compte de l'origine cellulaire de la tumeur (cellule B, T ou NK) et de l'apparente maturité, appelé **stade de développement**, de la cellule (immature, blastique ou stades plus avancés). Du fait du caractère très hétérogène de ces tumeurs et des progrès constants concernant leur description, cette classification est mise à jour régulièrement afin d'améliorer le diagnostic et le traitement des patients (Armitage, 2005). En 2008, ont été ajoutés des critères d'appréciation des premières étapes de **transformation néoplasique (anomalies moléculaires)**, d'âge d'apparition de la maladie, d'impact spécifique du **site de la maladie** et de reconnaissance des catégories de lymphomes inclassables (Jaffe, 2009).

Les 2 grands types de lymphomes sont les lymphomes hodgkiniens (LH) et les lymphomes non hodgkiniens (LNH). Cette caractérisation est basée sur des critères morphologiques, cliniques et évolutifs. La présence de grosses cellules atypiques, malignes, binucléées, avec des nucléoles proéminents et un immuno-phénotype B, CD15⁺, CD25⁺, CD30⁺, nommées cellules de Reed-Sternberg, est déterminante dans le diagnostic du LH. Nous nous focaliserons ici sur les LNH de type B. Ces néoplasmes sont les plus courants (Figure 1) et se développent principalement dans les ganglions lymphatiques où ils sont appelés lymphomes nodaux. Le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL), le lymphome folliculaire (FL), le lymphome de la zone marginale (MZL), le lymphome à cellules du manteau (ML) et le lymphome de Burkitt (BL) sont les LNH de type B les plus fréquents (Figure 1).

1.1.2. Épidémiologie

En 2008, parmi les 12,68 millions de cas de cancers détectés dans le monde, près de 500000 étaient des lymphomes (Roman and Smith, 2011). Leur incidence varie fortement en fonction de leur géolocalisation. Notamment, une différence apparaît entre pays développés comme en Amérique du nord, en Europe de l'Ouest et en Océanie, et pays en voie de développement comme en Asie et en Afrique. L'incidence standardisée par l'âge des LNH représentent respectivement 10,3 et 6,6 pour 100000, par an chez l'homme et la femme vivant dans des pays développés. Cette incidence est de 4,3 et 2,6 dans des pays moins développés (Müller et al., 2004). Bien que **l'incidence globale** des lymphomes ait doublé entre 1970 et 1990 dans les pays développés (Alexander et al., 2007), elle **n'évolue plus** depuis. Le sous-type de LNH le plus courant est le DLBCL. Il représente plus de la moitié des LNH de type B (Smith et al., 2010) (Figure 1).

1.2. Nosologie des DLBCL

Les DLBCL sont un groupe de lymphomes hétérogènes. Ils correspondent à la prolifération diffuse de larges cellules lymphoïdes B néoplasiques. Ces cellules possèdent un noyau de taille égale ou excédant celle du noyau de macrophages ou encore, de taille 2 fois supérieure à celle d'un noyau de lymphocyte normal (Gurbuxani et al., 2009). Selon l'OMS (Tableau 1), les DLBCL sont listés et dénommés selon les critères ajoutés années après années. Parmi les différentes propositions de remise à jour de la classification des DLBCL, Gurbuxani et al. se focalisent sur 3 grands groupes de critères (Tableau 1) : (i) les critères classiques tels que l'histologie, le phénotype ou le génotype, dépendants du stade de développement (ii) les anomalies moléculaires notamment les associations virales (iii) le site de développement.

Tableau 1. Classification actuelle des lymphomes diffus à larges cellules. Les DLBCL sont classés officiellement par l'OMS, colonne de gauche. Gurbuxani et al., colonne de droite, se proposent de les classer selon plusieurs critères : les observations classiques, le site de développement, les associations virales et les inclassables. D'après Jaffe et al., 2010 et Gurbuxani et al., 2009.

Mature B-cell neoplasma	
Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma	
B-cell prolymphocytic leukemia	
Splenic marginal zone lymphoma	
Hairy cell leukemia	
<i>Splenic lymphoma/leukemia, unclassifiable</i>	
<i>Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma</i>	
<i>Hairy cell leukemia-variant</i>	
Lymphoplasmacytic lymphoma	
Waldenström macroglobulinemia	
Heavy chain diseases	
Alpha heavy chain disease	
Gamma heavy chain disease	
Mu heavy chain disease	
Plasma cell myeloma	
Solitary plasmacytoma of bone	
Extravascular plasmacytoma	
Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	
Nodal marginal zone B-cell lymphoma (MZL)	
<i>Pediatric type nodal MZL</i>	
Follicular lymphoma	
<i>Pediatric type follicular lymphoma</i>	
Primary cutaneous follicle center lymphoma	
Mantle cell lymphoma	
Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), not otherwise specified	
T cell/histiocyte rich large B-cell lymphoma	
<i>DLBCL associated with chronic inflammation</i>	
<i>Epstein-Barr virus (EBV)+ DLBCL of the elderly</i>	
Lymphomatoid granulomatosis	
Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma	
Intravascular large B-cell lymphoma	
Primary cutaneous DLBCL, leg type	
ALK+ large B-cell lymphoma	
Plasmablastic lymphoma	
Primary effusion lymphoma	
Large B-cell lymphoma arising in HHV8-associated multicentric Castelman disease	
Burkitt lymphoma	
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma	
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma	
Large B-cell lymphoms	
Categories and Types of Large B-Cell Lymphoma	
• Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL), Not Otherwise Specified ○ Morphologic: centroblastic, immunoblastic, anaplastic, other ○ Immunophenotype/gene expression: germinal center-derived, activated B cell, other ○ Molecular/genetic: <i>BCL6</i>, <i>BCL2</i>, <i>c-MYC</i>, other • Large B-Cell Lymphoma Specified by Site ○ Primary mediastinal large B-cell lymphoma ○ Intravascular large B-cell lymphoma ○ Primary large B-cell lymphoma of bone ○ DLBCL of the central nervous system ○ Primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type • Large B-Cell Lymphoma Specified by Histology, Phenotype, or Genotype ○ T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma ○ Anaplastic lymphoma kinase-positive large B-cell lymphoma ○ De novo, CD5+ large B-cell lymphoma • Large B-Cell Lymphoma (LBCL) Associated With Epstein-Barr Virus and/or Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus/Human Herpesvirus 8 ○ EBV+ diffuse large B-cell lymphoma of the elderly ○ DLBCL associated with chronic inflammation ○ Pyothorax-associated lymphoma ○ Plasmablastic lymphoma ○ Primary effusion lymphoma ○ LBCL arising in HHV8+ multicentric Castelman disease and HHV8+ plasmablastic lymphoma ○ Lymphomatoid granulomatosis • Unclassifiable Types ○ LBCL with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma ○ LBCL with features intermediate between DLBCL and Hodgkin lymphoma	

1.2.1. Stade de développement : morphologie et phénotype

Pour Lenz et Staudt, l'agressivité néoplasique des lymphomes non-hodgkiniens de type B dépend des caractéristiques biologiques de la cellule lymphomateuse. Ces caractéristiques sont conservées à partir de la cellule normale d'origine et donc le stade de différenciation de la cellule importe de manière considérable. Ainsi, une cellule s'étant engagée dans une voie néoplasique lorsqu'elle était au stade centroblaste gardera certaines caractéristiques de cette étape, de même pour le stade plasmablaste. De ce fait, la **classification des lymphomes** peut se faire **d'un point de vue morphologique**. Les variants morphologiques les plus communs sont centroblastique, immunoblastique et anaplasique. Le variant centroblastique est le plus courant, ces cellules sont de taille moyenne à large. Le variant immunoblastique est caractérisé par des cellules larges. Le variant anaplasique possède des cellules de larges (Gurbuxani et al., 2009). Les variants moins communs sont le sous-type plasmablastique, celui riche en lymphocytes T et celui positif pour l'enzyme kinase du lymphome anaplasique (De Paepe and De Wolf-Peeters, 2007).

La caractérisation des cellules lymphomateuses peut être faite **d'un point de vue phénotypique** en fonction des marqueurs de surface qu'elles arborent ou intra-cellulaires. Les marqueurs CD19 (cluster de différenciation 19), CD20, CD22, CD79a, PAX5 et les immunoglobulines de surface sont retrouvés sur les cellules normales. Les marqueurs CD10 et IRF4/MUM1 sont aussi caractéristiques des lymphomes B dans, respectivement, 30 à 40% et 40 à 50% des cas (Gurbuxani et al., 2009).

Enfin, le développement de nouveaux outils, comme les puces à ADN, ont permis de mettre à jour différents **profils d'expression des gènes** des DLBCL. Trois types de DLBCL sont alors reconnus : ABC (activated B-cell like), pour les cellules ayant un profil caractéristique des lymphocytes B mémoire activés du sang, GCB (germinal center B-cell like), des lymphocytes B normaux du centre germinatif et PBML (primary B-cell mediastinal lymphoma), le lymphome de type B médiastinal primitif dont les cellules ressemblent à des lymphocytes B du thymus (Alizadeh et al., 2000; Rosenwald et al., 2003).

1.2.2. Anomalies moléculaires

Les cellules lymphomateuses acquièrent, au cours de leur transformation en néoplasme, des caractéristiques nécessaires à leur survie et leur prolifération infinie. Certaines étapes de la différenciation lymphocytaire sont clés dans le mécanisme de néogénèse. Par exemple, pendant le développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse, une cassure de l'ADN double brin a lieu au moment de la recombinaison VDJ. Cette cassure est normalement

suivie d'un processus de réparation de l'ADN. Cependant, elles sont aussi un risque accru de translocations chromosomiques pouvant être à l'origine de la néogénèse.

Les grandes anomalies moléculaires rencontrées dans les lymphomes sont les mutations, les translocations, les amplifications et les délétions impliquant des gains ou pertes de fonction de gènes (Delsol, 2010). Plusieurs gènes sont décrits dans la littérature concernant les lymphomes pour être couramment transloqués, ou bien les protéines pour lesquelles ils codent sont surexprimées, dont voici, ci-dessous, les plus courants. RAG1, RAG2 sont 2 enzymes recombinases qui ont pour fonction de casser l'ADN double brin pour que puisse s'effectuer la recombinaison VDJ pendant le réarrangement des immunoglobulines (Ig). Bcl-6 (B-cell lymphoma protein 6), impliquée dans 35 à 40% des cas de lymphome, est une protéine anti-apoptotique impliquée dans la progression du cycle cellulaire, les réponses aux dommages de l'ADN et à la mort cellulaire. Bcl-2 est aussi une protéine anti-apoptotique. Elle est transloquée dans 13% des cas et amplifiée dans 24% des cas. Myc est un oncogène impliqué dans 15% des DLBCL. La surexpression de Fas, molécule apoptotique et l'inactivation de p53, gène suppresseur de tumeur, sont rencontrées respectivement dans 20% et 16% de ces lymphomes. AID (activation-induced cytidine déaminase) est une enzyme requise dans la commutation de classe des Ig et dans l'hypermutation somatique de ces Ig mais est aussi une source de dommage de l'ADN. 45% des DLBCL possèdent des hyper-mutations somatiques ciblant une partie des gènes cités ci-dessus (Gurbuxani et al., 2009; Lenz and Staudt, 2010).

NFkB (nuclear factor kappa B) est un facteur de transcription impliqué dans des activités anti-apoptotique lorsqu'il est activé. Dans les DLBCL, il peut être activé de manière constitutive. Ce facteur peut être déterminant pour le caractère néoplasique : l'inhibition de NFkB peut tuer les cellules tumorales. De plus, NF-kB est un inducteur de cytokines telles que l'interleuline 6 (IL-6) et l'IL-10. En plus de leur caractère immuno-modulateur, ces molécules induisent des signaux autocrines aux cellules lymphomateuses (Gurbuxani et al., 2009; Lenz and Staudt, 2010).

La présence de génome viral est aussi une perturbation moléculaire pouvant orienter le diagnostic (voir plus loin chapitre 1.4).

La sous-classe ABC voit NF-kB s'activer à cause de l'activation constitutive de l'enzyme IκB kinase qui bloque l'action de l'inhibiteur de NF-kB, IκB, en la phosphorylant (Figure 2). Ces lymphomes contiennent de grandes quantités d'enzyme AID. Ils sont aussi caractérisés par la surexpression de Bcl-2 (due à la mutation de la région de chromosome 18q21-q22), la perte de BLIMP1, répresseur de transcription (par mutation de 6q21-q22), la délétion de p16, un inhibiteur de sénescence et l'inactivation de p53. Ce sous-type de DLBCL n'a en

général pas effectué sa commutation de classe et exprime des IgM. **Le sous-type GCB** a souvent effectué son switch isotypique. Il n'exprime pas IRF4/MUM1 car il est à un degré de différenciation avancé mais possède les marqueurs Bcl-6 et CD10 reflétant l'origine GC du lymphome (De Paepe and De Wolf-Peeters, 2007) (Figure 2). Le facteur de transcription NF- κ B est activé de manière constitutive dans le sous-type GCB mais ce sous-type de DLBCL en serait moins dépendant que les ABC. La translocation t(14 ;18) sur (q32 ;q21) en est quasiment spécifique. Elle fait surexprimer Bcl-2 en plaçant son gène sous le contrôle du promoteur du locus des chaînes lourdes des Ig. D'autres lésions géniques sont fréquentes dans les GCB, comme les mutations de p53 et le gain de la région 12q12. **Le sous-type PBML** a des caractéristiques proches du lymphome de Hodgkin comme l'amplification de la région chromosomique 9p24 qui active la voie JAK-STAT anti-apoptotique. Il a une origine thymique révélée par l'expression de l'ARN messager *MAL*. Ce type de DLBCL exprime aussi NF- κ B dont l'activation est constitutive (Lenz and Staudt, 2010) (Figure 2).

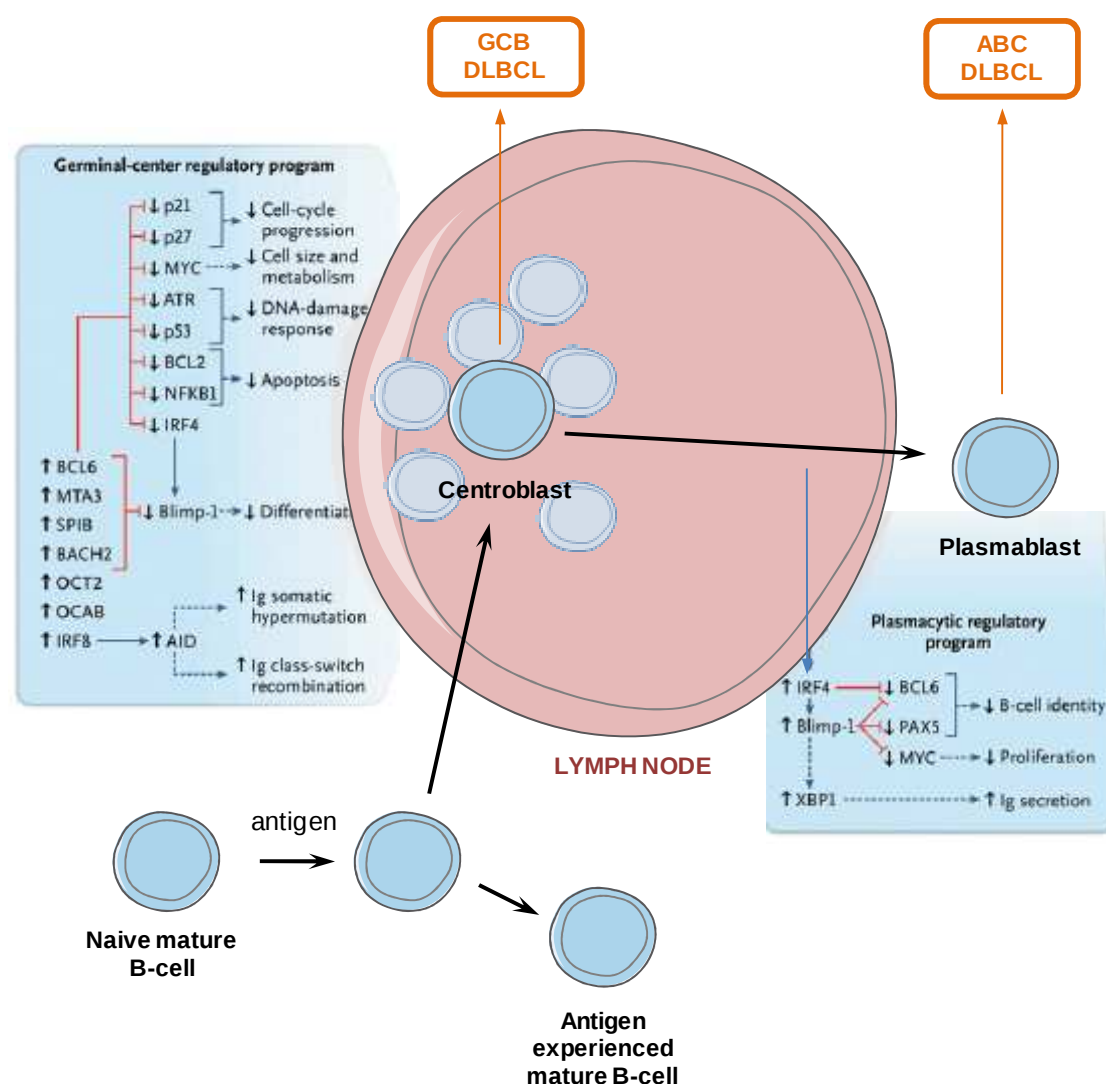


Figure 2. Lymphogenèse des DLBCL. Les cellules lymphomateuses dépendent, pour leurs caractéristiques propres, du stade de développement auquel était la cellule normale dont elles sont issues. Elles dépendent aussi des anomalies moléculaires à la base de la cancérisation et de la localisation de cette cellule d'origine. D'après Lenz et Staudt, 2010.

1.2.3. Localisation

Contrairement aux lymphomes de type T, la classification de l'OMS n'implique pas la localisation pour les lymphomes de type B. Cependant, l'apparition des DLBCL se produit dans différents organes et leur comportement clinique pourrait en dépendre (López-Guillermo et al., 2005).

La localisation primaire la plus commune (deux tiers des DLBCL environ) se situe au sein des ganglions lymphatiques. Elle est appelée nodale (Groves et al., 2000). La rate, autre organe lymphoïde secondaire, est aussi le siège de DLBCL (Zucca, 2008). Dans ces environnements lymphoïdes, les cellules tumorales sont en relation avec de nombreuses cellules immunitaires.

La présentation extranodale, dans les tissus non lymphoïdes, bien que peu connue est pourtant banale. Elle concerne un tiers des cas de DLBCL primitifs (Zucca, 2008). Ces DLBCL ont pour site de développement primaire la peau, le système nerveux central (SNC) dont l'œil, les testicules, le sein, les os, la cavité orale, le tractus gastro-intestinal et les glandes thyroïde et parotide (Alexander et al., 2007; Zucca, 2008; Gurbuxani et al., 2009). Le lymphome intra-vasculaire de type B est défini par la présence de grosses cellules confinées à la lumière des vaisseaux. Ceci peut se produire au niveau du rein et du foie principalement (Zucca, 2008).

Quand le SNC est le siège primitif de DLBCL, ces derniers sont nommés PCNSL (primary central nervous system lymphoma). Ce lymphome touche le cerveau, les leptoméniges et rarement la moëlle épinière (Gerstner and Batchelor, 2010). Il est souvent associé au sous-type ABC et GCB pour les autres. En effet, ces tumeurs expriment communément IRF4/MUM1, Bcl-6 et CD10 (Gurbuxani et al., 2009). Lorsqu'un DLBCL se développe initialement dans l'œil à partir d'un lymphocyte B, il est appelé lymphome intra-oculaire primitif (PIOL). L'œil, en tant qu'annexe embryonnaire du cerveau, fait partie du SNC. Les PIOL appartiennent donc aux PCNSL. Premièrement décrit par Cooper and Ricker en 1951 en tant que « reticulum cell sarcoma », ce terme sera changé pour PIOL plus tard à cause de l'origine lymphoïde des cellules. La protéine anti-apoptotique Bcl-2 est exprimée dans la majorité des PCNSL et une translocation de Bcl-2 a été rapportée dans des cas très agressifs de PIOL (Chan, 2003).

Il est à noter que les tumeurs ayant comme origine le SNC ou les testicules se développent dans un milieu immun privilégié (voir plus loin chapitre 2.3).

La difficulté principale pour classer des lymphomes nodaux/extranodaux est la caractérisation des patients dont les 2 territoires sont colonisés. Cette colonisation est souvent due à une prise en charge tardive des patients. Cependant, il pourrait bien exister une différence moléculaire entre les 2 catégories. Des études ont montré que l'altération de Bcl-2, le gain de 18q et l'infiltration de la moëlle épinière sont plus fréquents dans les lymphomes nodaux. Au contraire, l'altération de c-Myc, Bcl-6, FAS ainsi que le profil GCB CD10⁺ sont plus courant dans les lymphomes extranodaux (López-Guillermo et al., 2005). Une autre difficulté provient du manque de données.

1.2.4. Conclusion sur la nosologie des DLBCL

Pour Lenz et Staudt, stade de développement, localisation et anomalies moléculaires du lymphome sont liés (Figure 2) et donc à mieux considérer pour une meilleure prise en charge

des patients. Anomalies moléculaires et stade de développement sont bien pris en compte par la dernière classification de l'OMS. **Le paramètre restant en retrait est la localisation de la tumeur.** Plusieurs auteurs tendent à démontrer que cette caractéristique est d'autant plus importante à présent que la classification des DLBCL sert à identifier la maladie mais aussi à administrer le traitement optimal du patient.

1.3. Epidémiologie

Les DLBCL représentent plus de la moitié des LNH de type B (Figure 1), leur incidence augmente d'1% par an depuis 1992, elle était de 898 cas sur 100000 personnes en 2006 (Flowers et al., 2010). Bien que les lymphomes nodaux voient leur **incidence** n'augmenter que faiblement d'1,7 à 2,5% par an, celle **des lymphomes extranodaux a augmenté** de manière conséquente ces 40 dernières années dans les pays occidentaux de 3 à 6.9% par an (Chiu and Weisenburger, 2003).

Les lymphomes extranodaux connaissant la croissance la plus forte sont les PCNSL : 224%. L'incidence des PCNSL aux Etats-Unis a triplé en 20 ans entre les années 70, 0,027 cas pour 100 000 personnes, et les années 90, 1 cas pour 100000 personnes par an (Chan, 2003). Parallèlement aux cas d'immuno-déficiences comme le SIDA, les atteintes chez les individus immuno-compétents est aussi en constante augmentation (Schultz and Bovi, 2010). Ce cancer est très agressif. C'est le lymphome extranodal qui a le taux de survie le plus bas : à 2 ans, 37 % des patients, seulement, survivent (Tableau 2). Parmi les PCNSL, le PIOL à une survie à 5 ans basse : 5% des patients.

Le lymphome testiculaire représente 1,5% des lymphomes B extranodaux alors que le lymphome du SNC, lui, est plus commun : 4 à 5% de cette catégorie (Feller et al., 2004). Le lymphome du sein est estimé à 2% des LNH extranodaux (Zucca, 2008). Celui de l'os est de l'ordre de 4 à 5 % des LNH extranodaux (Gurbuxani et al., 2009) mais il est plutôt de bas grade de malignité, sa survie globale à 5 ans se positionne entre 60 et 70% (Tableau 2).

Le pronostic vital du sous-type GCB est meilleur que celui du sous-type ABC ou PBML, 76% de survie à 5 ans contre 16% (Alizadeh et al., 2000). Du fait, CD10, caractéristique du sous-type GCB, est un marqueur pronostique favorable dans le cas des DLBCL (De Paepe and De Wolf-Peeters, 2007).

Tableau 2. Survie des patients atteints de DLBCL extranodal. La survie globale des DLBCL varie fortement en fonction de la localisation de la maladie. Cette variation est observée en comparant les survies à 2, 5 ou 10 ans des patients. Adapté de Zucca, Gurbuxani. Abréviations : CI, intervalle de confiance ; DLBCL, lymphome diffus à grandes cellules B ; nr, non renseigné. D'après Zucca, 2008 et Gurbuxani et al., 2009.

Site, histologie	Nb de patients stade I-II/total	Survie globale (95% CI)
Estomac , DLBCL	219/312	À 5 ans : 75% (nr)
Intestin , DLBCL	40/87	À 5 ans : 68% (55-78%)
Sein , DLBCL	193/204	À 5 ans : 63% (55-70%); à 10 ans : 47% (38-56%)
Testicules , DLBCL	294/373	À 5 ans : 48% (42-53%); à 10 ans : 27% (21-33%)
CNS , DLBCL	370/370	À 2 ans : 37% (nr) ; à 10 ans : 10% (nr)
Peau , leg type, DLBCL	-	À 5 ans : 41% (nr)
Os , DLBCL	-	À 5 ans : 60-70% (nr)
Médiastin , DLBCL	-	À 5 ans : 44% (nr)

1.4. Etiologie

Les causes du développement de lymphomes seraient hétérogènes. Des facteurs ayant fait l'objet d'une attention particulière n'ont pas pu être clairement impliqué, c'est le cas des pesticides ou autres produits chimiques et des facteurs hormonaux. Le rôle de l'alimentation est aussi très controversé (Alexander et al., 2007). Par contre, un lien étroit a été démontré entre certaines maladies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde, lupus, syndrome de Sjögren, maladie cœliaque) et LNH (Verkarre et al., 2004; Smedby et al., 2006). De plus, la localisation du lymphome en découlant serait associée à la localisation de la maladie. Par exemple, la maladie cœliaque est associée à un risque plus élevé de LNH gastro-intestinal.

Une des hypothèses les plus étudiée pour l'induction de lymphomagenèse est **l'association à une infection microbienne**. Bien que les lymphocytes B soient les cellules immunitaires les plus difficilement infectables *in vitro*, plusieurs virus ont été impliqués. Les plus décrits sont le virus d'Epstein-Barr (EBV) et le virus de l'herpès humain 8 (HHV8 ou KSHV, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus), deux virus appartenant à la même famille, transmis par la salive et infectant les amygdales. Ce sont les génomes de ces virus qui peuvent être retrouvés dans les cellules tumorales et y créer des anomalies moléculaires de l'ADN. **L'EBV** est fortement associé aux lymphomes liés au SIDA (syndrome d'immuno-déficience acquise). En effet, il induit, *in vitro*, la prolifération infinie de lymphocytes B après infection en régulant de manière positive Bcl-2, Bcl-x (une autre protéine anti-apoptotique), cycline D2 (une protéine du cycle cellulaire) et en inactivant le gène répresseur de tumeur p53. Mais les patients atteints du SIDA ne représentaient qu'environ 10% des cas de LNH avant

l'apparition de la thérapie anti-rétrovirale qui a, depuis, réduit cette proportion (Alexander, 2007). De même, le **HHV8** serait lié à la pathogénèse de certains lymphomes (notamment des PCNSL dont certains cas de PIOL). Ce virus est très lymphotrophique par le pouvoir codant de son génome pour une protéine homologue de cycline D1 qui intervient dans le contrôle du cycle cellulaire et par la surexpression de Bcl-2. Un parasite, ***Toxoplasma gondi***, pourrait lui aussi jouer un rôle dans le développement du PIOL (2 patients positifs sur 16 testés par Chan en 2003). En effet, il représente la source majeure d'infection de la chambre postérieure de l'œil. De plus, une bactérie, ***Borrelia burgdorferi***, responsable de la maladie de Lyme, a été associée à des lymphomes cutanés (Jelić and Filipović-Ljesković, 1999). Il est à noter que le rôle de ces microbes ne serait seulement que le fait de rares cas isolés dans les organes immunologiquement privilégiés comme le cerveau, l'œil ou les testicules car la probabilité d'infection est maigre chez des patients immuno-compétents (Chan, 2003). Une infection dans ces sites induit l'infiltration de cellules inflammatoires notamment de cellules B. L'environnement immuno-suppresseur de ces organes pourrait être plus permissif à la tumorigénèse en supprimant les réponses immunitaires anti-tumorales (McKenna and Chen, 2010).

Malgré la découverte de ces nombreux facteurs favorisant la lymphomagenèse, **la plupart des lymphomes restent d'origine inexpliquée** (Alexander et al., 2007). Dans le cas des PCNSL, pour Chan, la principale cause d'augmentation de ces lymphomes est l'augmentation du nombre des patients immuno-déficients ou bénéficiant de traitements immuno-suppresseurs (Chan, 2003). Pour d'autres, ceci est le résultat de l'amélioration des modes de dépistage et de l'évolution du mode de vie.

1.5. Diagnostic de la maladie

Les DLBCL comme tous LNH sont généralement diagnostiqués suivant une période de grossissement local ou généralisé (Alexander et al., 2007). La validation de ce diagnostic est faite par analyse anatomo-pathologique d'après les critères morphologiques, cités auparavant chapitre 1.2.1 et par immunohistochimie d'après les critères phénotypiques, cités auparavant chapitre 1.2.1. Le diagnostic peut être complété par FISH multicolore, par CGH (hybridation génomique comparative) ou par analyse de transcriptome par puce à ADN. Ces techniques sont parfois associées à de l'immuno-histochimie (Delsol, 2010).

Les lymphomes extranodaux touchant le SNC sont plus difficiles à diagnostiquer. Notamment, le PIOL est souvent mal diagnostiqué à cause de sa ressemblance avec l'uvéïte,

maladie inflammatoire plus courante, et de la fragilité des cellules tumorales. Dans les deux cas, des cellules immunitaires sont présentes dans l'œil ainsi que des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6. De ce fait, au laboratoire, nous nous sommes intéressés à améliorer le diagnostic de cette maladie. Nous avons trouvé un nouveau marqueur diagnostique, une autre cytokine pro-inflammatoire : l'interféron gamma (IFN γ). L'IFN γ associé à l'IL-6 et l'IL-10 discrimine de manière plus juste les patients atteints de PIOL (voir article en annexe I).

1.6. Thérapie

La chimiothérapie standard utilisée dans le traitement des DLBCL est la chimiothérapie CHOP (Cyclophosphamide, Doxorubicine Hydrochloride, Vincristine et Prednisone). La cinétique d'injection et les doses injectées varient, entre autres, en fonction de l'âge du patient et du stade clinique de la maladie (Brusamolino, 2009). La plupart des patients répondent initialement à la chimiothérapie seule mais moins de la moitié sont en rémission durable (Alizadeh et al., 2000). La dernière grande avancée concernant le traitement des DLBCL a été de coupler la chimiothérapie CHOP aux anticorps anti-CD20 (tel que le rituximab) induisant une meilleure survie des patients : de 40% à 67% (Brusamolino, 2009). De multiples **stratégies émergentes** de polythérapies ont vu le jour avec l'amélioration de la caractérisation moléculaire des DLBCL. Un type de traitement consiste à bloquer l'activation de NF-kB en jouant sur la kinase de I κ B par exemple avec un inhibiteur de la classe des carbolènes (MLX105), ou bien en inhibant la dégradation de I κ B en ciblant les ubiquitines ligase ou encore en ciblant directement le protéasome par le Bortezomib (Lenz and Staudt, 2010). Le ciblage de la voie NF-kB n'est que peu efficace pour les GCB (13% de réponse au bortezomib par exemple) alors que les ABC y répondent majoritairement (85%) (Dunleavy et al., 2009). La radiothérapie est dorénavant évitée à cause de ces effets secondaires, notamment le développement de tumeurs secondaires. Elle est seulement mise en œuvre chez les patients réfractaires aux traitements déjà cités ou dans des immunothérapies associant un anticorps monoclonal dirigé contre la tumeur avec un radioisotope (Ahmed et al., 2010).

La prise en charge des DLBCL extranodaux peut différer. Les PCNSCL sont couramment traités par une chimiothérapie à base de méthotrexate. Ce traitement passe à travers la barrière hémato-encéphalique (Chan, 2003). Pour le PIOL, l'énucléation a été testée mais n'est plus pratiquée aujourd'hui car la migration des cellules lymphomateuses au niveau cérébral précédait souvent l'opération. Le traitement majeur du lymphome testiculaire

consiste en l'ablation du testicule colonisé par les cellules tumorales mais ceci est fréquemment insuffisant. Par exemple, ces patients peuvent subir un traitement prophylactique de radiation du testicule controlatéral et, comme la rechute courante de ce lymphome se passe au niveau du SNC, des injections intra-thécales de méthotrexate plus CHOP plus anticorps anti-CD20 (Zucca, 2008).

Les patients non répondant aux traitements ont parfois la possibilité d'être traités par greffe de moelle osseuse (Alizadeh et al., 2000) ou bien par greffe autologue de cellules souches (Zucca, 2008).

Lenz et Staudt soulignent l'importance du microenvironnement cellulaire, et notamment immunitaire, dans les lymphomes et déplorent le manque de connaissance qui y est associé.

1.7. Les modèles murins de lymphomes B

Plusieurs modèles murins de lymphomes B sont couramment utilisés. Ces modèles sont souvent xénogéniques, ils consistent en une greffe d'une tumeur humaine dans un organisme immuno-déficient, pour notamment tester les drogues humaines. Quelques modèles spontanés ont été développés dans le but d'étudier les anomalies moléculaires de la souris et les comparer à l'homme. Enfin, des modèles syngéniques ont été mis en place pour se rapprocher encore plus de la pathologie humaine. L'ablation d'un ganglion lymphatique de patient permet l'étude de l'environnement local des lymphomes nodaux mais les prélèvements de certains lymphomes extranodaux sont de faible volume et plus rares. Donc les modèles murins sont d'une utilité majeure dans la caractérisation du micro-environnement cellulaire de ce type de tumeur.

De nombreuses lignées cellulaires lymphomateuses B existent (voir revue en annexe II). Par exemple, la lignée cellulaire A20 est un lymphome de type B d'haplotype H-2^d dérivée d'un sarcome réticulaire (reticulum cell sarcoma) spontané trouvé chez une souris BALB/c AnN âgée de plus de 15 mois (Kim et al., 1979). Le sarcome réticulaire est aujourd'hui appelé lymphome à grande cellule. Cette lignée est alors proche du DLBCL humain.

Pour étudier le micro-environnement immunitaire tumoral, un modèle syngénique est le mieux adapté. Les réponses immunitaires s'y déroulant nous donnent des pistes de recherche chez l'homme plus fiables que dans les autres modèles car elles sont d'abord dirigées contre les caractéristiques tumorales des cellules injectées et non contre leur caractéristique d'espèce. De plus, la localisation a aussi une importance réelle pour refléter l'environnement tumoral chez l'homme. Or, la plupart des auteurs utilisent, pour la lignée

A20 notamment, des localisations sous-cutanées qui n'ont jamais été rapportées chez l'homme pour le DLBCL.

Le modèle du PIOL, par exemple, développé au laboratoire regroupe ces 3 éléments importants : il est syngénique dans une localisation véritable chez une souris immuno-compétente. Il consiste en l'injection intra-oculaire de lymphome B murin (cellules A20.IIA-GFP (green fluorescent protein)) chez des souris adultes BALB/c immuno-compétentes. Le développement de la tumeur est systématique dans toutes les souris qui meurent au bout de 50 à 60 jours (Touitou et al., 2007). De plus, ce modèle est proche de la pathologie humaine tant par son infiltration rétinienne que par son environnement cytokinique et ses métastases cérébrales.

2 - Le micro-environnement immunitaire des DLBCL

2.1. Généralités sur le micro-environnement immunitaire des tumeurs solides

Le devenir d'une tumeur a longtemps été considéré comme étant entièrement dû aux cellules tumorales. Dorénavant, l'idée minimaliste d'une tumeur se développant complètement au dépend de son hôte est abandonnée. Il est clair que la tumeur interagit avec l'hôte par l'intermédiaire du micro-environnement cellulaire se créant autour d'elle (Hanahan and Weinberg, 2011). Le micro-environnement tumoral est généralement composé de stroma, de cellules vasculaires et de cellules immunitaires (Ruffell et al., 2010) (Figure 3).

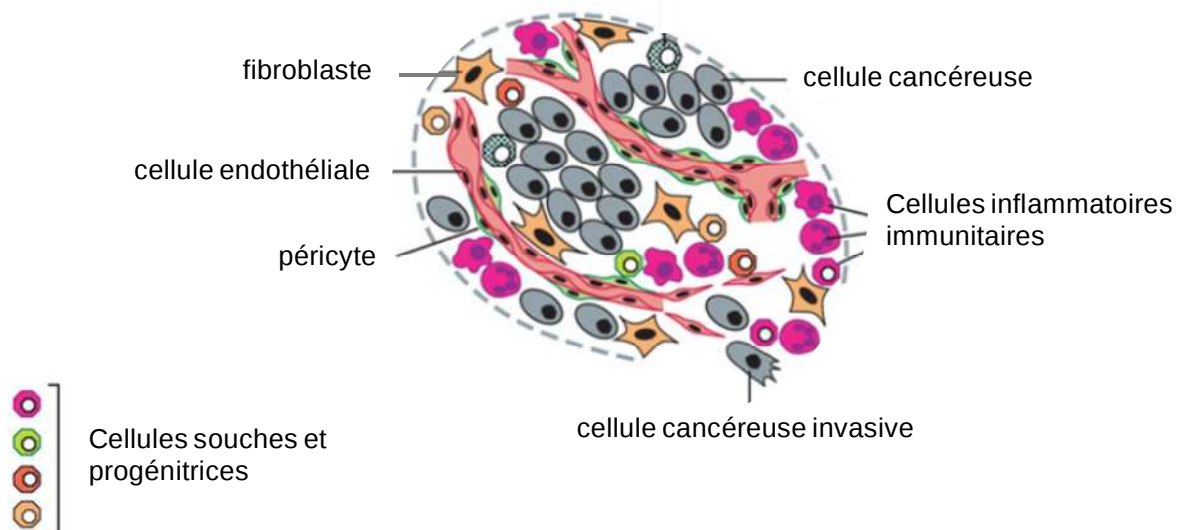


Figure 3. Les cellules tumorales face à leur environnement cellulaire. Le micro-environnement tumoral est composé des cellules tumorales, des cellules fibroblastiques et immunitaires, de vaisseaux sanguins et lymphatiques et de matrice extra-cellulaire. D'après Hanahan et Weinberg, 2011.

2.1.1. Le stroma et les cellules vasculaires

Le compartiment tumoral est souvent entouré d'une partie mésenchymateuse appelé stroma. Le stroma est constitué de fibroblastes et de matrice extracellulaire. Les fibroblastes associés à la tumeur sont responsables de la fibrose pathologique impliquée dans le développement tumoral (Hanahan and Weinberg, 2011). Dans le stroma et la tumeur, la néo-angiogénèse et la néo-lymphangiogénèse forment les vaisseaux sanguins et lymphatiques nécessaires à la prolifération tumorale (Holopainen et al., 2011) (Figure 3).

2.1.2. Le micro-environnement immunitaire

2.1.2.1 Rôle du système immunitaire dans les tumeurs

D'un côté, les réactions inflammatoires ont été décrites comme favorisant la croissance tumorale. Ceci est démontré dans les phénomènes d'inflammation chronique, comme dans l'infection par *Helicobacter pylori* et le cancer de l'estomac, dans les maladies auto-immunes, démontré par l'association de la maladie coéliquaue et du lymphome des MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) ainsi que dans les cas d'agressions chimiques liant par exemple la fumée de cigarette et le cancer du poumon (Fridman et al., 2011).

D'un autre côté, l'équipe de Schreiber, par la définition du concept d'immuno-surveillance, prend le parti qu'une reconnaissance des cellules tumorales par les cellules immunitaires existe et qu'une destruction de la tumeur peut s'en suivre. Ce concept a été suggéré depuis une centaine d'années d'abord par Paul Ehrlich puis par Frank Macfarlane Burnet et Lewis Thomas. Cependant la démonstration n'en a été probante que dans les années 90 avec l'avènement des modèles murins génétiquement modifiés pour le compartiment immunitaire. Une des expériences le démontrant étant celle de Shankaran et coll. qui ont montré qu'une tumeur induite par le méthylcholanthrène, un carcinogène chimique, prolifère plus rapidement et est plus agressive chez une souris immuno-déficiente que chez une souris immuno-compétente (Shankaran et al., 2001) (Figure 4).

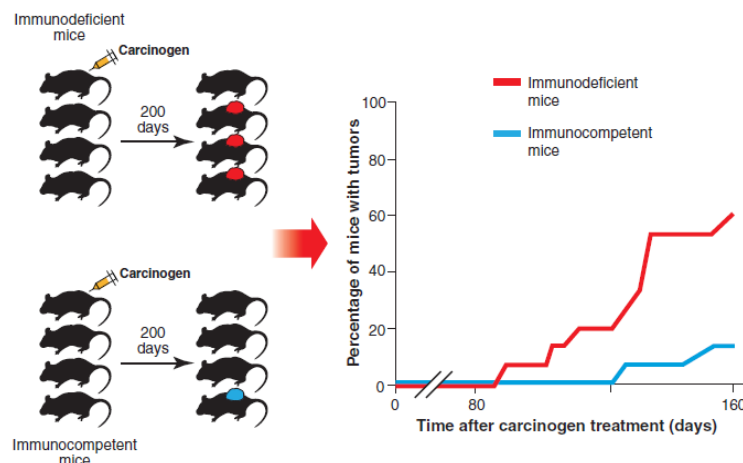


Figure 4. L'importance du système immunitaire dans le contrôle du développement tumoral. A gauche, des souris immuno-déficientes ou immuno-compétentes ont reçu un carcinogène (le méthyl-choloanthrène). Le nombre de souris porteuses de tumeurs en fonction du temps est montré à droite. D'après (Vesely et al., 2011).

2.1.2.2 Déclenchement des réponses immunitaires envers la tumeur

L'élimination de cellules tumorales est en général le fruit de la coopération entre l'immunité adaptative (les lymphocytes) et l'immunité innée. Les processus par lesquels le système immunitaire prend connaissance de la présence de la tumeur ne sont pas clairs. Trois mécanismes peuvent être mis en jeu. Des molécules sécrétées par la tumeur dans ses phases précoces de développement, comme l'IFN de type I, de même que les molécules libérées par des cellules tumorales mourantes nommées DAMP (danger signals molecular patterns) sont considérés comme des **signaux de danger** par les cellules de l'immunité innée dont les cellules dendritiques (Figure 5). Certaines molécules de surface des tumeurs sont des ligands « de stress » liant des récepteurs de cellules de l'immunité innée comme MICA/B. Les molécules activant les cellules de l'immunité innée ainsi que les cellules dendritiques/macrophages induisent le relargage par ces cellules de cytokines pro-inflammatoires déclenchant l'induction de réponses immunitaires adaptatives.

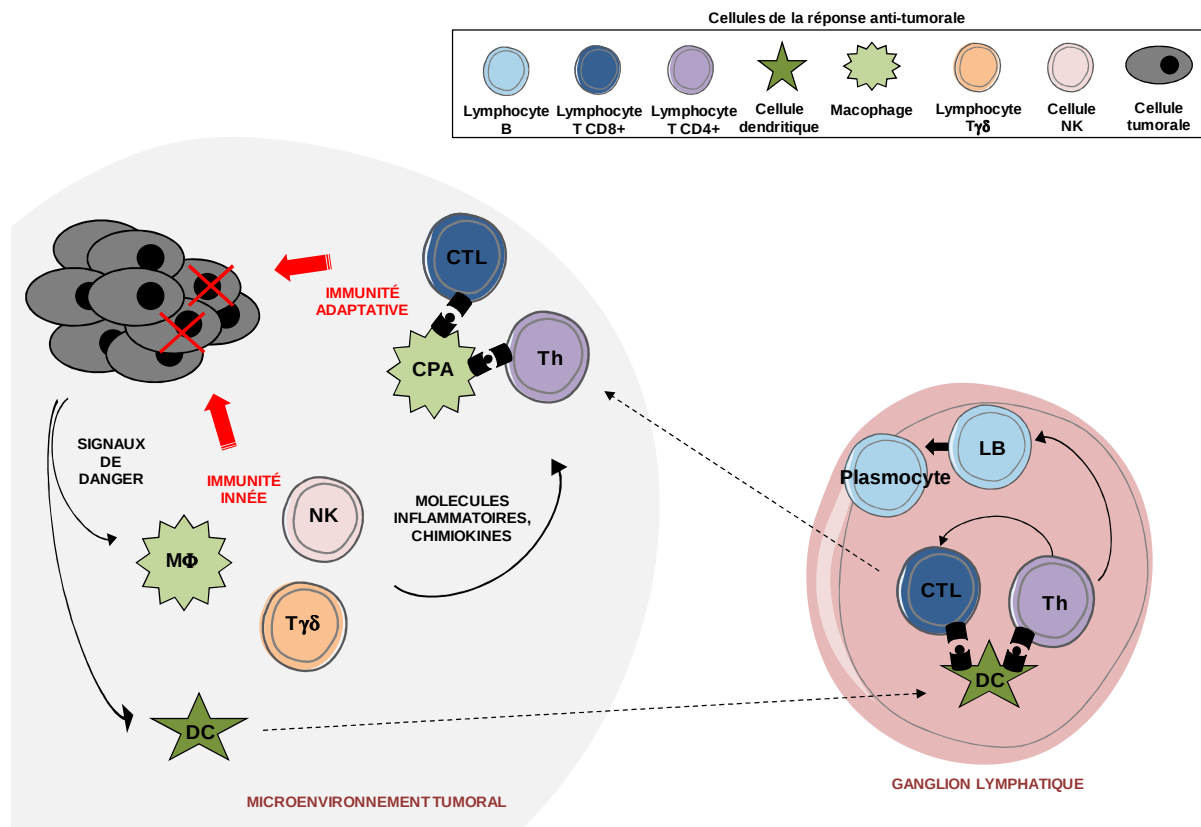


Figure 5. Les cellules tumorales face à la réponse anti-tumorale du système immunitaire. Les réponses anti-tumorales sont engendrées par des signaux de danger en provenance de la tumeur. Ces signaux mettant en alerte les cellules de l'immunité innée (macrophages, cellules dendritiques (DC), cellules NK (natural killer), lymphocyte T $\gamma\delta$) et font migrer les DC dans les ganglions. Les lymphocytes présents dans les ganglions et spécifiques des peptides tumoraux présentés par les DC s'activent. Les lymphocytes effecteurs tels que les lymphocytes Th (T auxiliaires ou helper) et CTL (lymphocyte cytotoxique) migrent alors dans le micro-environnement tumoral afin d'éliminer la tumeur.

La théorie de l'immunogénicité des tumeurs a été développée suite à la découverte de l'existence de molécules de surface reconnues par le système immunitaire, les antigènes tumoraux (OLD and BOYSE, 1964). Les antigènes tumoraux sont de différents types. Ils peuvent être issus d'une expression protéique aberrante comme les antigènes onco-fœtaux normalement exprimés uniquement à des phases précoces du développement ou comme des antigènes retrouvés en condition physiologique uniquement dans les gonades (exemple : NY-ESO-1). Ils peuvent aussi être d'origine virale ou simplement surexprimés comme Her2. D'autres sont des glycolipides ou des glycoprotéines altérées (exemple : MUC-1). Ce sont les cellules de l'immunité adaptative qui reconnaissent ces caractéristiques propres à la tumeur. Ces cellules sont les seules alors à pouvoir développer des réponses mémoires, prévenant les rechutes de la maladie.

2.1.2.3 Les acteurs de l'immunité anti-tumorale

Les tumeurs se développent dans les tissus et par conséquent, les premières cellules à leur contact sont les cellules résidentes propres à chaque tissu, par exemple les cellules de l'immunité innée. Dans un second temps, des cellules infiltrant les tissus tumoraux, par exemple les lymphocytes.

Les **cellules Natural Killer** (NK) sont impliquées dans la destruction directe des cellules tumorales. Elles sont capables de relarguer des molécules de type perforine et granzyme. Les cellules NK sont non spécifiques de l'antigène et non restreintes au CMH, d'ailleurs, elles attaquent les cellules dépourvues de CMH I. Leur efficacité dépend de récepteurs de surface de la tumeur auxquels elles se lient et qui ont la capacité de les activer ou de les inhiber (Platonova et al., 2011). La reconnaissance de la partie Fc d'anticorps fixés à des antigènes tumoraux via leur récepteur CD16 va permettre le mécanisme d'ADCC c'est-à-dire de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps.

Les **cellules NKT** restreintes au CD1d sont des régulateurs important des réponses inflammatoires dans les modèles de cancer murin avec des mécanismes d'action proches des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺. Leur action ne dépend pas de la production de perforine mais d'IFN γ (Terabe and Berzofsky, 2008). Bien que possédant le récepteur des cellules T (TCR) et le marqueur CD3, elles appartiennent à l'immunité innée car elles réagissent rapidement à la reconnaissance d'antigènes lipidiques (comme α -GalCer ou des sulfatides) associés au CD1d de manière non spécifique (Godfrey and Rossjohn, 2011).

Les **lymphocytes T $\gamma\delta$** sont des cellules lymphoïdes de l'immunité innée reconnaissant des phosphoantigènes par leurs TCR et des ligands de type NK. Ils seraient capables de tuer de nombreux types de cellules cancéreuses (leucémie, lymphome, mélanome...) par la sécrétion d'IFN γ (Gomes et al., 2010).

Parmi les cellules myéloïdes, les macrophages (CD11b⁺ Ly6G⁻) et les neutrophiles (CD11b⁺ Ly6G⁺, Ly6C⁻) sont les principaux acteurs anti-tumoraux. Pour chacune de ces populations, il existe 2 sortes de phénotypes : inflammatoire « 1 » et immuno-suppresseur « 2 ». Le type 1 est anti-tumoral et le type 2 est pro-tumoral (Mantovani et al., 2002; Fridlender et al., 2009). Les **macrophages** pro-inflammatoires, M1, sont phagocytaires. Ils participent à l'élimination de la tumeur par opsonisation des cellules tumorales et présentation des antigènes tumoraux aux lymphocytes T (LT) CD4⁺. Ils agissent aussi par ADCC comme les NK ainsi que par relargage d'enzymes lysosomiales, de métabolites oxygénés et de TNF α (tumor necrosis factor) (Mantovani et al., 2002). Les **cellules dendritiques** exercent en

partie leur rôle anti-tumoral dans la présentation des antigènes tumoraux aux LT CD4⁺ via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) II et par leur importance dans la polarisation et le maintien du phénotype de ces cellules via la sécrétion de cytokines clés (par exemple IL-23 dans le maintien du phénotype Th17). Les **neutrophiles** de type 1, associés aux tumeurs, exercent leur action anti-tumorale chez la souris via l'expression de cytokines (IL-12, TNF α , GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), VEGF) et chimiokines (CCL3, CXCL9, CXCL10) pour recruter et activer les cellules T CD8⁺, entre autres, et via leur capacité directe à tuer les cellules tumorales par la sécrétion de défensines et de dérivés chlorés (Di Carlo et al., 2001; Fridlender et al., 2009). Les **mastocytes** aussi peuvent être des cellules régulant l'inflammation. Leur rôle dans l'immunité anti-tumorale consisterait principalement à induire une cytotoxicité cellulaire par la sécrétion de TNF α (Oldford et al., 2010).

Les **lymphocytes T CD8⁺** cytotoxiques (CTL) sont, comme les NK, des cellules impliquées dans la destruction directe des cellules tumorales à travers la sécrétion de perforines et de granzymes. Ces cellules sont notamment activées par les cellules dendritiques effectuant une cross-présentation d'antigènes tumoraux, c'est-à-dire la présentation par le CMH I d'antigènes endocytés (Flinsenberg et al., 2011). Les CTL vont ensuite effectuer leur action anti-tumorale envers les cellules présentant des antigènes tumoraux présentés par le CMH I. Le transfert adoptif de CTL de patients, amplifiés *in vitro*, est un type d'immunothérapie fonctionnant efficacement. Cependant, cette technique est coûteuse et le développement de maladies auto-immunes y est fortement associé (June, 2007).

Les **lymphocytes T CD4⁺**, appelés T auxiliaires et aussi T helper (Th), ont pour fonction principale de réguler positivement ou négativement d'autres cellules immunitaires. Pendant de nombreuses années les immunologistes ont divisé la différenciation des cellules Th naïves (Th0) en 2 voies uniques aboutissant chacune à une sous-population : les Th1 et les Th2. Ce paradigme Th1/Th2 développé dans les années 80 (Mosmann and Coffman, 1989) était fondé sur le profil cytokinique de ces lymphocytes T effecteurs. Les lymphocytes **Th1** ont été décrits favorisant l'immunité cellulaire et les **Th2** favorisant l'immunité humorale. Cependant, leurs mécanismes d'actions se révèlent complexes. De plus, une autre population cellulaire pro-inflammatoire est décrite depuis 2005, les **Th17**, interagissant avec l'immunité innée et adaptative, cellulaire et humorale (Harrington et al., 2005). D'autres Th pro-inflammatoires ont été recensés depuis dont les Th9 et les Th22. Cependant, leur caractérisation s'avère

dépendante du modèle ou de la maladie, voire de la cinétique à laquelle elles sont décrites. **La caractérisation des LT CD4⁺ est établie sur la base des cytokines qu'ils sécrètent.** Les Th1 produisent principalement de l'IL-2, du TNF α et de l'IFN γ (Figure 6) et expriment le facteur de transcription T-bet (Szabo et al., 2000). Leur polarisation de Th0 en Th1 est induite, après présentation antigénique spécifique, par l'IL-12. Les Th1 sont impliqués dans la cytotoxicité cellulaire dépendante du complément, dans l'activation de la fonction effectrice cytotoxique des macrophages, des cellules Natural Killer (NK) et des CTL. L'IL-4 induit la polarisation des Th0 en Th2. Ils sécrètent en majorité de l'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 (Figure 6) et leur facteur de transcription spécifique se nomme GATA-3 (Zheng and Flavell, 1997). Les lymphocytes Th2 ont la capacité d'activer les éosinophiles et les mastocytes. Ils fournissent aussi une aide aux lymphocytes B, pour la sécrétion d'Ig, par un signal activateur et sont donc impliqués dans la réponse immunitaire à médiation humorale. Les lymphocytes Th17 ont été décrits comme des cellules T CD4⁺ productrices d'IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22 (Ouyang et al., 2008) (Figure 6) caractérisées par les facteurs de transcription STAT-3 et ROR γ t (RAR-related orphan receptor gamma t). Le rôle des Th17 dans l'immunité anti-tumorale est controversé (voir plus loin chapitre 3.4). De part leur rôle inflammatoire, les Th ont une grande importance dans le contrôle du développement tumoral (Hung et al., 1998).

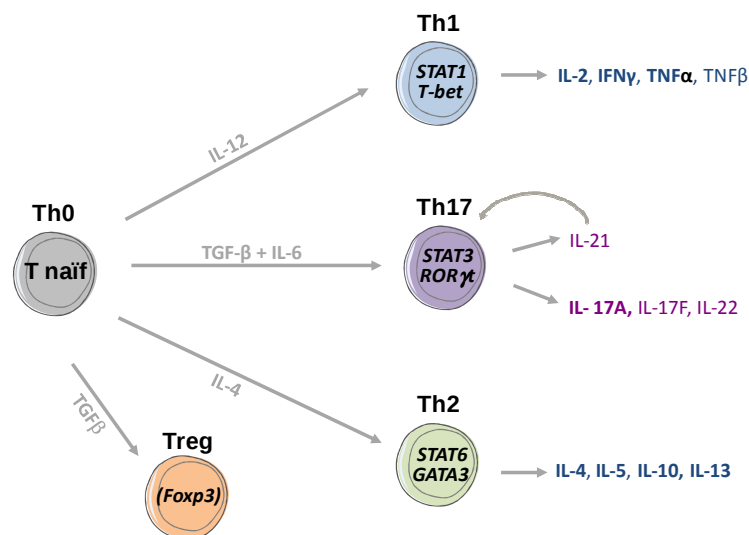


Figure 6. Les différentes voies de polarisation des lymphocytes T CD4⁺ chez la souris. La polarisation des LT naïfs (Th0) dépend des cytokines présentes dans le micro-environnement : l'IL-12 induit des Th1, l'IL-4 des Th2, le TGF β (tumor growth factor beta) seul des Treg et la combinaison TGF β +IL-6 des Th17. Ces cellules polarisées sont caractérisées par les cytokines qu'elles sécrètent.

Les **lymphocytes B (LB)** sont en général peu nombreux dans les tumeurs, mis à part dans les structures lymphoïdes tertiaires (Dieu-Nosjean et al., 2008). Leur activation dans les structures lymphoïdes induit leur différenciation en plasmocytes sécréteurs d'anticorps anti-antigène tumoral intra-cellulaire ou membranaire. Ces anticorps relargués dans la circulation vont permettre les mécanismes d'ADCC, d'opsonisation et le blocage de récepteur de la tumeur pour des facteurs de croissance.

La mémoire immunitaire est nécessaire à une élimination de la tumeur à long terme. Elle est rendue possible par l'émergence de lymphocytes T et B « mémoires ». Elle est activement recherchée en immunothérapie à cause du problème des nombreuses rechutes des tumeurs. Le lymphome est notamment un des cancers récidivant le plus.

2.1.2.4 Les acteurs suppresseurs de l'immunité anti-tumorale

Cependant, dans certains cas, l'élimination par les cellules immunitaires n'est pas efficace et la tumeur prolifère. La tumeur échappe au contrôle de l'hôte par 2 grands mécanismes. Le premier est l'**immunoediting**, le système immunitaire ne reconnaît plus la tumeur comme du non-soi. Cette régulation est le fruit d'une sélection des clones les moins immunogènes (Vesely et al., 2011). Le deuxième mécanisme est la capacité de détourner les réponses immunitaires à son avantage en favorisant l'**immuno-suppression**. Dans ces 2 cas la tumeur va soit entrer en phase d'équilibre avec le système immunitaire, soit échapper complètement à son contrôle et proliférer.

Dans le cas du détournement des mécanismes anti-tumoraux de l'hôte, l'action de certaines cellules immunitaires peut être bénéfique à la tumeur en lui procurant une aide à la prolifération et à la néoangiogénèse. La littérature liste les macrophages, les neutrophiles, les mastocytes ainsi que certains lymphocytes T et B dans cette action pro-tumorale (Ruffell et al., 2010).

Les **lymphocytes T régulateurs** naturels (nTreg) sont différenciés dans le thymus. Ils sont de phénotype CD4⁺ CD25^{hi} et principalement Foxp3⁺ (forkhead box protein 3). Ils nécessitent un contact cellulaire pour être efficaces et sécrètent du TGFβ. Les Treg induits (iTreg) se différencient localement à partir de LT naïfs (Figure 6) quand une stimulation du récepteur au TGFβ à leur surface active la transcription du gène *FOXP3*. Les Tr1, sécréteurs d'IL-10, et les Th3, sécréteurs de TGFβ, sont des iTreg mais n'expriment que transitoirement le Foxp3. Ils agissent en absence de contact cellulaire direct (Yamazaki and Steinman, 2009). Les Treg suppriment l'action des lymphocytes T spécifiques de la tumeur principalement par la sécrétion de molécules immuno-régulatrices, IL-10 et TGFβ, suppriment la fonction des

cellules présentatrices d'antigènes (CPA) par la voie CTLA-4 (CTL-associated antigen4), hydrolisent l'ATP extracellulaire par CD39 et CD73 et transfèrent les cAMP inhibiteurs aux LT effecteurs via des jonctions gap (Sakaguchi et al., 2009). Des environnements immuno-suppresseurs leur sont souvent favorables, par exemple l'induction d'IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) par la tumeur permet de stabiliser le phénotype Treg (Sharma et al., 2010).

Les **cellules myéloïdes suppressives** forment une population cellulaire hétérogène immature très commune dans les cancers. Elles peuvent avoir adopté un phénotype monocyttaire (Ly6C⁺) ou granulocytaire (Ly6G⁺). Il a été démontré que ces cellules peuvent infiltrer les tumeurs et se différencier en macrophages matures ou neutrophiles (Hanahan and Weinberg, 2011). Elles peuvent alors être la source des **M2** ou **N2**. Même sans différenciation au préalable, ces cellules peuvent réguler les réponses immunitaires. Leur production d'oxyde nitrique dépendante de l'IFN γ et leur synthèse d'arginase dépendante de l'IL-4 induisent la perte de la chaîne zeta du CD3 ce qui résulte en l'inhibition des cellules T (Fridlender et al., 2009; Yang et al., 2010) et de promouvoir la néo-angiogénèse (Mantovani et al., 2002). Elles sont aussi capables d'inhiber l'action des cellules NK (Hanahan and Weinberg, 2011). De plus, les **macrophages Foxp3⁺**, une population de macrophages suppresseurs nouvellement décrite, pourraient supprimer la prolifération des lymphocytes T via la sécrétion de prostaglandine 2 et favoriser la croissance tumorale. Les mastocytes sont capables de mobiliser ces cellules suppressives dans la tumeur (Yang et al., 2010).

Les **cellules NKT** possèdent elles aussi un « type II » immuno-suppresseur. Les cellules NKT sont notamment les régulatrices de l'immunité anti-tumorale du fibrosarcome 15-12M où la rechute tumorale ne survient pas lorsque le CD1d est muté (Terabe and Berzofsky, 2008). Ces cellules, CD4⁺, agissent via la sécrétion d'IL-13 sur des cellules myéloïdes CD11b⁺ Ly6C⁺ sécrétant à leur tour du TGF β inhibiteur de cellules immunitaires telles que les CTL.

Un autre mécanisme inhibant le système immunitaire est la **sécrétion par la tumeur de molécules immuno-régulatrices** comme le TGF β 1 et l'IL-10. Le TGF β 1, notamment, est sécrété par de nombreuses tumeurs (Fridlender et al., 2009). Cette molécule aurait un impact sur les cellules CTL, macrophages (influence le stade de différenciation M1, inflammatoire, en M2, immunosuppresseur), neutrophiles (de même que pour les macrophages, de N1 en N2). Le TGF β 1 inhibe aussi la venue des neutrophiles, lymphocytes et cellules NK dans un environnement où il est en forte concentration. Cette action passerait par une diminution des possibilités de diapédèse des cellules du sang vers le lieu de l'inflammation.

D'autres molécules clés dans l'action pro-tumorale sont l'EGF (epidermal growth factor) qui est un facteur de croissance pour la tumeur, le VEGF et le FGF2 (fibroblast growth factor) qui sont des molécules pro-angiogéniques, des chimiokines et cytokines amplifiant le phénomène inflammatoire (Hanahan and Weinberg, 2011).

La tumeur est aussi capable d'inhiber les réponses immunitaires par l'expression de **molécules de surface**. L'activation des NK est régulée négativement lorsque la cellule tumorale exprime des ligands inhibiteurs comme le NKG2A (molécule de CMH I non classique) (Platonova et al., 2011).

2.1.2.5 Les mécanismes de l'hôte modulant l'immuno-suppression des réponses anti-tumorales

Bien que la tumeur tente de détourner tous les mécanismes de l'hôte anti-tumoraux, de nombreux autres facteurs entrent en compte. Ils ne sont pas liés directement au développement tumoral. Notamment, l'état global de santé du patient intervient ainsi que les exemples suivant.

Récemment l'hypothèse de l'existence d'un lien entre allergie et tumeur a été émise. Alors que les réponses d'hypersensibilité envers un antigène extérieur sont de l'ordre des lymphocytes Th2 et que ces cellules n'ont pas d'impact majeur dans l'immunité anti-tumorale, aucun lien ne semblait se dessiner. Cependant, des études ont montré que les personnes allergiques avaient moins de risque de développer des cancers et notamment pour les LNH (Elmasri et al., 2010). Le travail de Yang étaye cette hypothèse. Il existe 2 types de récepteurs pour l'histamine : le récepteur 1 active, entre autres, les Th1 et le récepteur 2 régule l'action des Th1 et Th2. Les cellules sécrétant l'histamine sont les mastocytes et les cellules myéloïdes immatures. Dans le cas des tumeurs, **l'histamine empêcherait le détournement des réponses immunitaires par la tumeur** en régulant l'immunité pro-tumorale d'origine myéloïde (Yang et al., 2011).

Les **iNKT**, présentant un TCR invariant, sont capables de moduler d'autres cellules immunitaires comme les DC, LB, LT et neutrophiles. Notamment, les iNKT vont entrer en relation avec des neutrophiles de type N2 dans le micro-environnement tumoral, bloquer leur sécrétion d'IL-10 et favoriser celle d'IL-12, **désinhibant et stimulant les lymphocytes T cytotoxiques** (Matarollo and Smyth, 2010).

2.1.3. Le pronostic associé aux cellules immunitaires

Les réactions immunitaires peuvent avoir un effet pro-tumoral ou un effet anti-tumoral dépendant de la tumeur ou même du patient. Ceci se compliquant lorsque des cellules immuno-suppressives entrent en jeu. Afin d'évaluer le statut du patient pour lui administrer le meilleur traitement, la **recherche de marqueurs pronostiques** au sein du micro-environnement immunitaire est actuellement un enjeu majeur.

Les **LT** retrouvés dans la tumeur sont associés à un **bon pronostic** dans le cas des cancers du poumon non à petites cellules, du sein, ovarien, de la tête et du cou, de l'œsophage, urothelial, colorectal et du LNH (Bindea et al., 2011). Dans le cas du cancer colorectal, les cellules impliquées sont les lymphocytes T cytotoxiques, mémoires et les Th1 (Pagès et al., 2009). Cependant, la valeur pronostique des **Treg** varie d'une tumeur à l'autre. Ils sont associés à une **survie des patients réduite** dans les cancers ovariens et les hépatocarcinomes. Au contraire, ils sont les témoins d'une **survie prolongée** dans les cancers colorectaux, de la tête et du cou et de lymphomes (Bindea et al., 2011). Aussi, le CD25 soluble, d'origine Treg probable, est associé à un mauvais pronostic dans les lymphomes B (Lindqvist et al., 2010).

Ceci peut être modulé en fonction des compartiments cellulaires. En effet, Porrata et coll. ont montré l'importance du ratio neutrophiles/lymphocytes pour la prédiction de la survie des patients atteints de DLBCL (Porrata et al., 2010).

Les macrophages sont, eux, associés à un mauvais pronostic pour de nombreux cancers (Mantovani et al., 2002; Chen et al., 2005) notamment les lymphomes de type B (Farinha and Gascoyne, 2005). Les mastocytes n'ont pas un rôle clairement défini dans tous les cancers. Ils sont associés à un bon pronostic dans le cancer de la prostate et du sein (Oldford et al., 2010).

La grande densité des NK n'est pas révélatrice d'une meilleure survie. La survie des patients dépendrait plus du phénotype et de la fonctionnalité de ces cellules (Platonova et al., 2011).

2.2. Le micro-environnement des lymphomes à grandes cellules B

La présence des cellules immunitaires dans le micro-environnement des lymphomes B est généralement de bonne valeur pronostique pour la survie des patients. Le micro-

environnement tumoral joue un rôle dans le devenir clinique du patient, la sévérité de la maladie et la réponse aux thérapies (Dave et al., 2004; Drach et al., 2005; de Jong and Enblad, 2008).

Les cellules lymphomateuses B sécrètent en règle générale de l'IL-10. Or cette cytokine est un facteur immuno-suppresseur. Elle inhibe entre autres les réponses lymphocytaires T qui pourraient être mises en place par l'organisme pour lutter contre la tumeur et diminue l'expression du CMH I. Le micro-environnement immunitaire des DLBCL n'est que très peu étudié. Ce sont les lymphomes nodaux, folliculaires qui sont les plus connus. Yang et al. ont montré que les LNH de type B, dont les DLBCL, ont un micro-environnement immuno-suppresseur.

2.2.1. Localisation nodale

Les lymphomes les plus étudiés pour leur micro-environnement immunitaire sont les lymphomes nodaux non DLBCL dont le lymphome folliculaire intra-ganglionnaire et le lymphome de Hodgkin. Nous ne traiterons pas ici des lymphomes Hodgkiniens du fait de leurs caractéristiques cellulaires et cliniques très particulières.

L'environnement des lymphomes nodaux humain est composé de nombreuses cellules immunitaires de par leur localisation ganglionnaire. Dans les lymphomes folliculaires, 3 principaux types de cellules immunitaires sont observés : les cellules dendritiques folliculaires (CD21⁺ CD23⁺), des macrophages (CD68⁺), des monocytes (CD14⁺) et des lymphocytes T (CD3⁺ CD4⁺ CD57⁺ PD1⁺ CXCL13⁺) caractéristiques des centres germinatifs (Carbone et al., 2009; Mueller et al., 2007). Cette tumeur dépendrait particulièrement de son environnement pour croître à long terme. En effet, les cellules tumorales auraient besoin d'entrer en contact avec les cellules dendritiques folliculaires pour continuer leur prolifération (Kagami et al., 2001), aussi les monocytes favoriseraient leur survie et leur prolifération (Mueller et al., 2007). De plus, ce type de lymphome induirait la conversion de LT CD4⁺ conventionnels en Treg (Ai et al., 2009), augmentant la proportion de Treg (CD4⁺ Foxp3⁺) parmi les LT CD4⁺ jusqu'à 40%.

La pathogenèse et le diagnostic des lymphomes folliculaires sont fortement associés à des « signatures » immunitaires. Les lymphocytes T, et plus particulièrement leur nombre, sont inversement corrélés à la progression tumorale (Dave et al., 2004; Osborne and Byers, 2011).

2.2.2. Localisation extranodale

Quelques études chez la souris décrivent le micro-environnement immunitaire de lymphomes B de type DLBCL extranodaux. Grille et coll. montrent la présence d'un **infiltrat lymphocytaire, majoritairement CD4⁺**, dont 10% de Th1, 5% de Th2 et 15% de Treg (CD4⁺ CD25^{hi} Foxp3⁺) dans le micro-environnement d'un lymphome B murin issu de la lignée A20 injectée par voie sous-cutanée (Grille et al., 2010). Le modèle de souris knock-out pour la perforine montre, lui, que l'incidence des lymphomes spontanés y est plus élevée (Juszczynski et al., 2008). La perforine étant une protéine sécrétée par les NK et les CTL, ces résultats indiquent que ces cellules sont probablement impliquées dans le contrôle de la prolifération des cellules lymphomateuses. Les lymphomes se situant dans le cerveau, l'œil et les testicules sont confrontés à un micro-environnement particulier faisant l'objet du chapitre suivant (2.3).

2.3. Le micro-environnement des lymphomes dans un site immunologiquement privilégié

2.3.1. Définition du privilège immun

Le privilège immun a été défini par Medawar en 1948 (MEDAWAR, 1948). Il estimait qu'une localisation anatomique est immunologiquement privilégiée si on peut y transplanter avec succès n'importe quel tissu. Ainsi, un site qui ne rejette pas une greffe non compatible avec l'hôte, par l'action du système immunitaire, suit cette définition. Cette théorie a évolué depuis et à présent on estime qu'un tel territoire faisant face à une infection, par exemple, voit les réponses immunitaires diminuées ou mettant plus de temps à se développer par rapport au reste de l'organisme (Niederkorn, 2006). Le rôle de cet immuno-privilège est de protéger les tissus ayant une capacité de renouvellement limitée. Plusieurs organes bénéficient de ce phénomène tels que les yeux, le cerveau, l'utérus gestant et les gonades. Des cas de DLBCL localisés dans l'œil, le cerveau et les testicules ont été rapportés dans la littérature (Zucca, 2008). Nous nous intéresserons donc plus particulièrement à ces sites.

Le privilège immunitaire est la résultante de 3 processus (Niederkorn and Stein-Streilein, 2010) : une barrière anatomique et des mécanismes immuno-régulateurs par contact ou à distance.

La principale **barrière anatomique** du cerveau est la barrière hémato-encéphalique, celle de l'œil est la barrière hémato-rétinienne (Caspi, 2006) et celle des testicules est la barrière hémato-testiculaire (Fijak et al., 2011). Elles sont composées de cellules endothéliales et, respectivement, des astrocytes, de l'épithélium pigmentaire rétinien et des cellules de Sertoli.

Les cellules endothéliales réalisent une sélection passive par des jonctions serrées prévenant l'entrée et la sortie de molécules de poids inférieur à 376 Daltons.

Plusieurs **mécanismes immuno-régulateurs** communs aux 3 sites sont mis en jeu. Le TGF β , l' α MSH, le peptide vaso-intestinal (VIP), la somatostatine, MIF et IDO sont des molécules solubles régulant négativement les réactions inflammatoires. Certaines molécules membranaires telles que TGF β , Fas-Ligand, B7/CTLA-4, TRAIL, galectin-1, thrombospondine, des molécules régulant le complément ainsi qu'une faible expression du CMH I (empêchant l'activation des CTL) peuvent contribuer aux mécanismes immuno-régulateurs de ces organes. Les testicules ont la particularité de sécréter des androgènes qui seraient immuno-suppresseurs.

La capacité de certains organes immuno-privilegiés à garder plus longtemps intact un greffon peut aussi être, en partie, due à un drainage lymphatique non-conventionnel (Nieder Korn, 2006). Alors que le drainage lymphatique des testicules est efficace (Fijak et al., 2011), celui de l'œil et du cerveau est limité. Le manque d'efficacité de drainage lymphatique pourrait être la cause d'un accès difficile à l'antigène pour le système immunitaire. Or, dans ces 2 organes, une réponse humorale envers l'antigène est présente. Le mécanisme mis en cause est bien étudié dans l'œil où il est appelé ACAID (pour déviation de la réponse immunitaire associée à la chambre antérieure) qui se traduit par une suppression de l'immunité cellulaire alors que l'immunité humorale est préservée.

Les barrières anatomiques, les molécules immuno-suppressives et le drainage lymphatique non-conventionnel restreignent le système immunitaire pour la reconnaissance de molécules étrangères et tentent d'empêcher des réactions inflammatoires qui pourraient être destructrices. Cependant, ce privilège immunitaire peut être brisé. Effectivement, des infections microbiennes, des maladies auto-immunes, comme la sclérose en plaques ou l'uvéite auto-immune, ou des tumeurs, induisent des réactions immunitaires au sein de ces sites.

2.3.2. Le lymphome primitif du système nerveux central (PCNSL)

Le **lymphome primitif du système nerveux central** est peu décrit en termes d'infiltrat immunitaire. Des lymphocytes T y sont recrutés. Une étude portant sur des biopsies cérébrales montre une plus forte proportion de cellules T CD8⁺ que de cellules T CD4⁺. Les cellules T Foxp3⁺ y ont été peu décrites. Cependant, cette étude ne décrit pas le stade d'avancement des tumeurs étudiées, pouvant jouer énormément sur la présence des cellules immunitaires (Bashir et al., 1996).

Le **lymphome intra-oculaire primitif** (PIOL) est fortement associé à une production de cytokines telles que l'IL-6, l'IFN γ et l'IL-10. Cette observation en est devenue un critère diagnostique (voir article en annexe I). La maladie chez l'homme est caractérisée par la présence de cellules T dans la chambre postérieure de l'œil ainsi que d'un infiltrat rétinien (Cassoux et al., 2000). Le modèle murin développé au laboratoire, et doté des mêmes caractéristiques cytokiniques que l'Homme, a révélé que le profil de l'infiltrat lymphocytaire T était de type Th1 (Touitou et al., 2007). Ce profil étant partiellement incomplet car la sécrétion d'IL-2 est manquante. Le profil devient complet après réactivation *ex vivo*. Ceci signifie qu'une immuno-suppression locale est active dans le micro-environnement tumoral. Cette régulation peut être due à : (i) l'environnement immunologiquement privilégié ou (ii) l'infiltration et le rôle des cellules immuno-suppressives telles que les Treg.

2.3.3. Le lymphome testiculaire

Bien que le micro-environnement immunitaire du lymphome testiculaire soit peu étudié, un infiltrat lymphocytaire T CD3⁺ a déjà été rapporté. L'hypothèse d'une réponse CTL efficace a été émise mais elle pousserait à l'émergence de clone ayant perdu le CMH I. Ce phénomène a aussi été observé pour le CMH de type II, proposant un rôle majeur des LT CD4⁺ (Riemersma et al., 2005).

2.4. Conclusions sur le micro-environnement des DLBCL

La comparaison entre les différents types de lymphomes est parfois abordée dans les revues mais rarement dans des articles originaux. Riemersma fait le constat qu'un infiltrat lymphocytaire T est présent dans tous les sites mais note que la pression sélective sur les cellules tumorales est la plus forte dans les organes immunologiquement privilégiés (Riemersma et al., 2005).

Le premier fait ressortant de cette synthèse est le **manque d'informations** quant à **l'infiltrat immunitaire des lymphomes localisés dans des sites privilégiés** mais aussi dans le reste des DLBCL. Le micro-environnement immuno-privilégié permet-il le même infiltrat immunitaire que le micro-environnement nodal ? Le second fait est le **manque de comparaison entre les lymphomes nodaux et extranodaux**. Le micro-environnement empêche-t-il l'action anti-tumorale des cellules immunitaires ? La compréhension de ces différences pourrait être une aide précieuse au développement de nouvelles thérapies plus personnalisées. De plus, l'action anti-tumorale du système immunitaire n'est plus à démontrer. Certains acteurs d'une réponse idéale éliminant la tumeur ont été bien décrits.

Cependant, de nouveaux types cellulaires comme les lymphocytes Th17 sont mis à jour régulièrement. Quel est alors le rôle des Th17 dans les cancers ? Qu'en est-il plus particulièrement dans les DLBCL ?

3 – Les lymphocytes Th17

La découverte des Th17 a révolutionné le monde des lymphocytes T CD4⁺. La découverte des lymphocytes Th3 immuno-régulateurs avait déjà, en 1993, ébranlé l'hypothèse rigide des seuls Th1/Th2. Cependant, la mise à jour des Th17 a des conséquences importantes car elle démontre que les Th1 et Th2 ne sont pas les seuls Teff. L'étude des Th17 et la découverte de leur caractère plastique a aussi permis d'approfondir la description des phénomènes de phénoconversion des LT CD4⁺. De ce fait, le point de vue des immunologistes sur les lymphocytes CD4⁺ a changé et ces cellules sont, de plus en plus, le centre d'intérêt pour le développement de nouvelles thérapeutiques.

3.1. Identification des Th17

3.1.1. Description phénotypique et polarisation

Le premier article utilisant le terme de « Th17 », et non pas seulement de « cellules CD4⁺ produisant de l'IL-17 », est paru en 2005 (Harrington et al., 2005). Cette dénomination a pu se faire en montrant que les Th17 étaient issus d'un lignage différent des Th1 et Th2. En effet, le développement des Th17 est indépendant des voies de signalisation utilisées dans les 2 autres sous-populations des CD4⁺, qui sont STAT1, T-Bet, STAT4 et STAT6.

La classification des sous-populations de LT helper faite initialement selon leur profil de sécrétion cytokinique, **les lymphocytes Th17 ont donc été décrits comme des cellules T CD4⁺ productrices d'IL-17A mais aussi d'IL-17F, d'IL-21, d'IL-22** (Ouyang et al., 2008) ainsi que d'IL-26 dans le cas de l'Homme. Certains auteurs leur attribuent aussi la sécrétion d'IL-6 et de TNF α , mais seulement dans des cas isolés (Langrish et al., 2005; Jäger and Kuchroo, 2010). Ce phénomène de sécrétion alternative serait dépendant du modèle. Dernièrement, il a été montré qu'une cytokine produite par les Th1 pourrait être sécrétée par les Th17 : le GM-CSF (Codarri et al., 2011).

La **polarisation des LT naïfs (Th0) en Th17** est influencée par plusieurs facteurs (Figure 6 et 7). Elle peut être induite par l'IL-6 et le TGF β chez la souris selon les équipes de Kuchroo, Weaver et Stockinger (Weaver et al., 2007; Stockinger and Veldhoen, 2007; Jäger and Kuchroo, 2010) (Figure 7). Un LT naïf possède, entre autres, les récepteurs au TGF β et à l'IL-6. Lorsque le récepteur à l'IL-6 est activé simultanément au récepteur au TGF β , il inhibe la transcription de *foxp3*. Ces deux activations engendrent la liaison de STAT3 et de

BATF aux promoteurs de l'IL-17 et de l'IL-21 coopérant avec ROR γ t. Ce dernier est le facteur de transcription spécifique à la sécrétion d'IL-17, il nécessiterait une interaction avec I κ B ζ pour agir sur la différenciation des Th17. ROR α , ainsi que STAT3, seraient impliqués dans la transcription du gène *il17*, mais seraient non suffisants. STAT3 dirigerait aussi la transcription de l'*il21* (Zhou et al., 2007; Ouyang et al., 2008; Hu et al., 2011). L'IL-23R, exprimé ensuite à la surface des LT, est nécessaire à la différenciation complète en Th17 et à leurs fonctions (Langrish et al., 2005; McGeachy and Cua, 2007) (Figure 7). L'IL-21, elle, exerce une fonction critique dans leur développement en effectuant une boucle autocrine (à la manière de l'IFN γ pour les Th1 et de l'IL-4 pour les Th2) améliorant la sécrétion d'IL-17 et d'IL-21 (Nurieva et al., 2007). Cependant, d'autres signaux peuvent remplacer l'IL-6. Par exemple, l'IL-1, l'IL-21 et le TNF α ainsi que les facteurs IRF4 et RUNX1 régulent positivement la différenciation en Th17 mais ne sont ni suffisants, ni indispensables (Stockinger and Veldhoen, 2007; Korn et al., 2007; Hu et al., 2011). Au contraire, l'IL-27 inhibe la différenciation des LT naïfs en Th17, tout comme l'IFN γ (McGeachy and Cua, 2007). Généralement, les cytokines induisant le phénotype Treg inhibent la différenciation en Th17. Les ligands du récepteur aryl et IDO se comportent de cette manière.

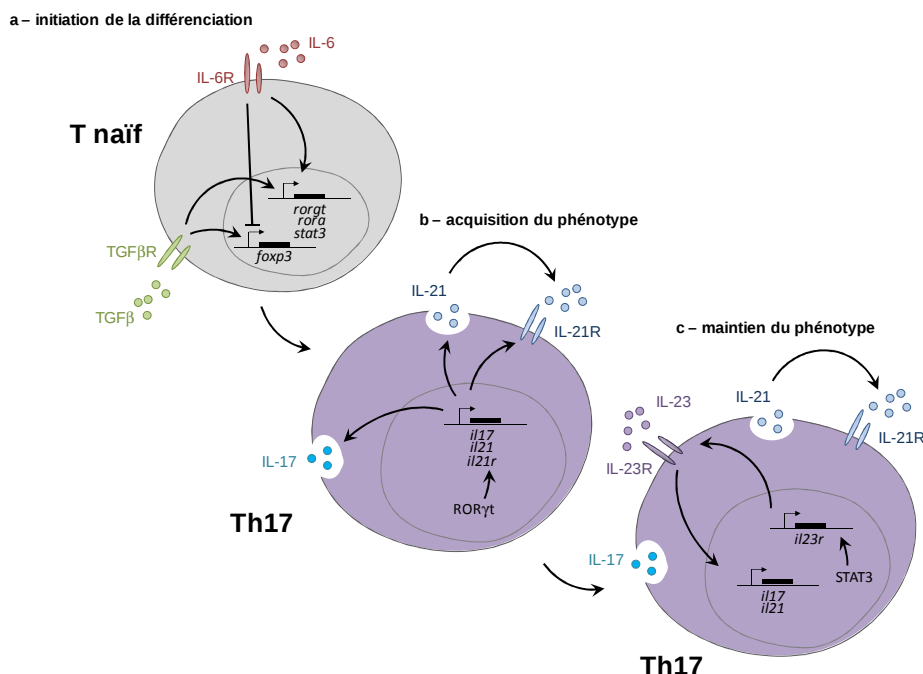


Figure 7. Polarisation, maturation et maintien des Th17. a) Les Th17 sont issus de lymphocytes T naïfs possédant les récepteurs à l'IL-6 et au TGF β . L'action concomitante de ces cytokines, associée à la reconnaissance de l'antigène par le TCR, induit la transcription des facteurs ROR γ t et ROR α . La transcription de *foxp3* est inhibée par l'IL-6. b) ROR γ t induit la production d'IL-17 et d'IL-21, ainsi que l'expression de l'IL-21R à la surface de la cellule. c) L'IL-23 permet la maturation et le maintien du phénotype Th17.

3.1.2. Caractéristiques inflammatoires des cytokines Th17

L'**IL-17A** et l'**IL-17F** appartiennent à une famille de 6 cytokines (IL-17A à IL-17F) possédant la caractéristique de présenter 5 résidus cystéines conservés en N-terminal. L'IL-17A (ou IL-17) et l'IL-17F sont les seules sécrétées par les Th17. Elles peuvent fonctionner soit en homodimère (IL-17A/IL-17A ou IL-17F/IL-17F) soit en hétérodimère (IL-17A/IL-17F). L'IL-17 agit sur ses cibles via deux récepteurs : IL-17RA et IL-17RC. L'hypothèse la plus probable est que l'IL-17 exerce un pouvoir d'activation cellulaire supérieur lorsqu'elle se fixe sur l'hétérodimère IL-17RA/RC. L'IL-17F lie aussi cet hétérodimère. Chez la souris l'IL-17RA est ubiquitaire alors que l'IL-17RC est exprimé sur les cellules non hématopoïétiques (Yao et al., 1995; Hu et al., 2010). Les cibles de l'IL-17 sont alors multiples : cellules immunitaires, fibroblastes, cellules endothéliales, cellules épithéliales, etc (Figure 8).

L'IL-17 appelé premièrement CTLA-8, induit : (i) la sécrétion par ses cellules cibles de facteurs granulopoïétiques tels que le G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor), l'IL-6 et le SCF (stem cell factor). (ii) la sécrétion de chimiokines telles que CXCL-1, -2, -5 mais aussi CXCL-6, -8, -9, -11, -12, CCL-2 et -20 (Hu et al., 2011). Ces facteurs solubles induisent le recrutement de cellules immunitaires, telles que les neutrophiles, pouvant lutter contre des pathogènes extracellulaires comme les bactéries ou les champignons (Weaver et al., 2007). (iii) la sécrétion de peptides anti-microbiens tels que la lipocaïne empêchant les bactéries de lier le fer libre et les défensines β . (iiii) l'induction de gènes du remodelage tissulaire induisant les métalloprotéinases (Figure 8). L'IL-17F est très proche de l'IL-17 par sa structure ainsi que par ses récepteurs et ses activités en sont proches. L'induction de la sécrétion de peptides anti-microbiens par les fibroblastes semble être son activité majeure (Hu et al., 2011).

L'**IL-21** fait partie des cytokines ayant pour composant de son récepteur la chaîne commune gamma. L'autre chaîne étant l'IL-21R (Spolski and Leonard, 2008a). Cette cytokine agit sur les lymphocytes T et B, les cellules NK, les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules épithéliales (Figure 8). L'IL-21 améliorerait la prolifération des cellules lymphoïdes, augmenterait la cytotoxicité des LT CD8⁺ et des cellules NK. L'IL-21 peut induire la différenciation des macrophages et des DC ainsi que la prolifération des cellules épithéliales. Elle serait aussi un facteur de différenciation des lymphocytes B en plasmocytes (Spolski and Leonard, 2008b). Dernièrement, son implication au sein des structures lymphoïdes s'est vue renforcée, elle est sécrétée par les LT inducteurs de tissus lymphoïdes et les LT folliculaires helper.

L'IL-22 appartient à la famille de l'IL-10. Ses transcrits ont aussi été retrouvés dans des cellules NK. Les récepteurs de l'IL-22 sont situés essentiellement sur les cellules résidentes des tissus d'origine épithéliale. L'IL-22 serait impliquée dans les défenses de l'hôte, l'inflammation et la réparation tissulaire (Ouyang et al., 2008).

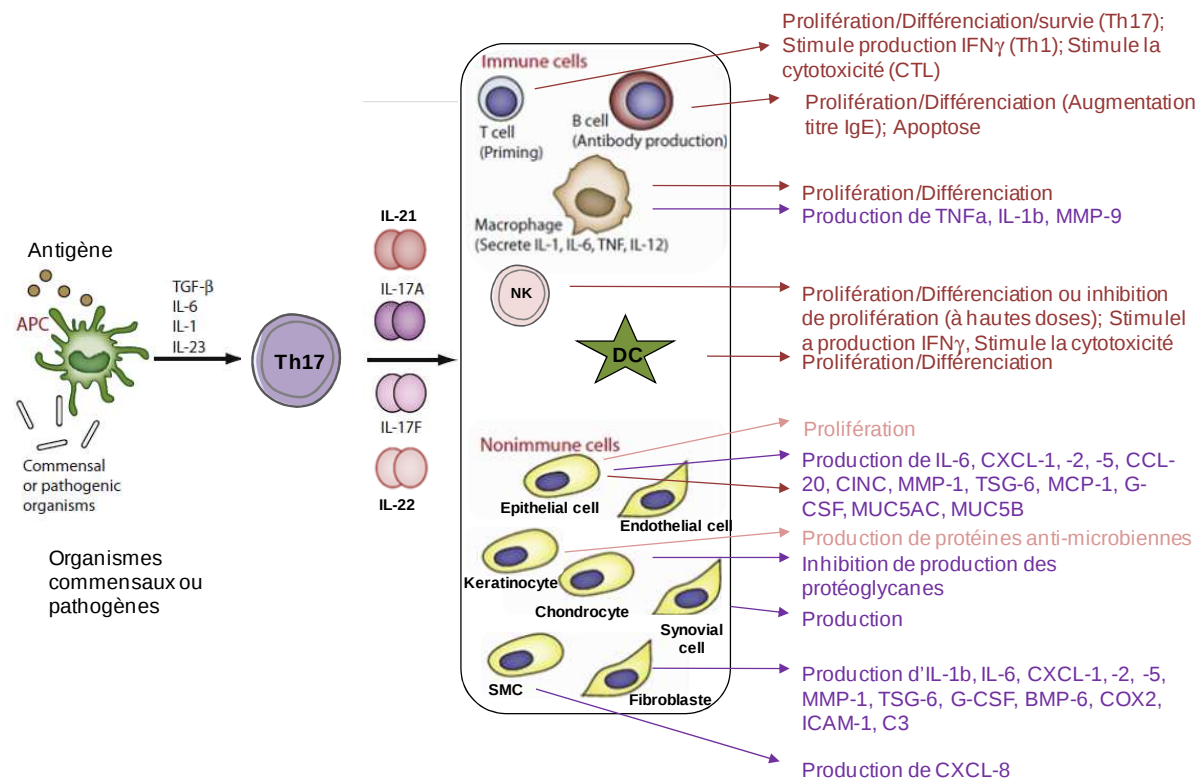


Figure 8. Principales actions des cytokines Th17. A la suite de la reconnaissance de micro-organismes, les Th17 sont activés. Les cytokines sécrétées par les Th17 murins sont l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-21 et l'IL-22. Ces cytokines agissent sur des cibles multiples de manière pro-inflammatoires. Les mécanismes en découlant sont indiqués en violet pour l'IL-17A, en rouge pour l'IL-21 et en rose pour l'IL-22. Adaptée d'Iwakura, 2011.

3.1.3. Autres sources des cytokines Th17

Il est à noter que d'autres types cellulaires que les Th17 peuvent sécréter les cytokines décrites ci-dessus mais rarement plus d'une sorte de cytokine par cellule. L'IL-17 peut être produite par les LT $\gamma\delta$ et les cellules NKT et permet à ces cellules d'exercer une fonction de répondeur précoce aux infections. Les LT induisant les tissus lymphoïdes la sécrètent aussi, ainsi que les neutrophiles (Cua and Tato, 2010) et les mastocytes. Cette sécrétion est toujours dépendante de l'environnement et des conditions de différenciation des cellules (Hu et al., 2011). L'IL-17F serait sécrétée par les cellules T CD4 $^{+}$, les LT $\gamma\delta$ et les cellules NKT selon des études qui ont suivi les cellules exprimant cette cytokine par un marqueur

fluorescent lié à son promoteur (Chang and Dong, 2009). Bien que majoritairement sécrétée par les Th17, l'IL-21 peut aussi l'être par les LT $\gamma\delta$ et les cellules NKT (Coquet et al., 2007). Une production d'IL-22 est retrouvée dans certains LT CD8⁺, des LT $\gamma\delta$, des monocytes et des cellules dendritiques.

3.2. Rôle des Th17 dans les désordres immunitaires

Avant même la description des « Th17 », l'IL-17 et l'IL-23 ont été mises en cause dans des maladies auto-immunes comme les modèles murins de sclérose en plaques et de polyarthrite rhumatoïde (Figure 9). Et, comme pour beaucoup d'autres cellules, la description de leurs mécanismes physiologiques, ici la défense de l'hôte, a été comprise par l'étude des maladies dans lesquelles les Th17 sont impliquées.

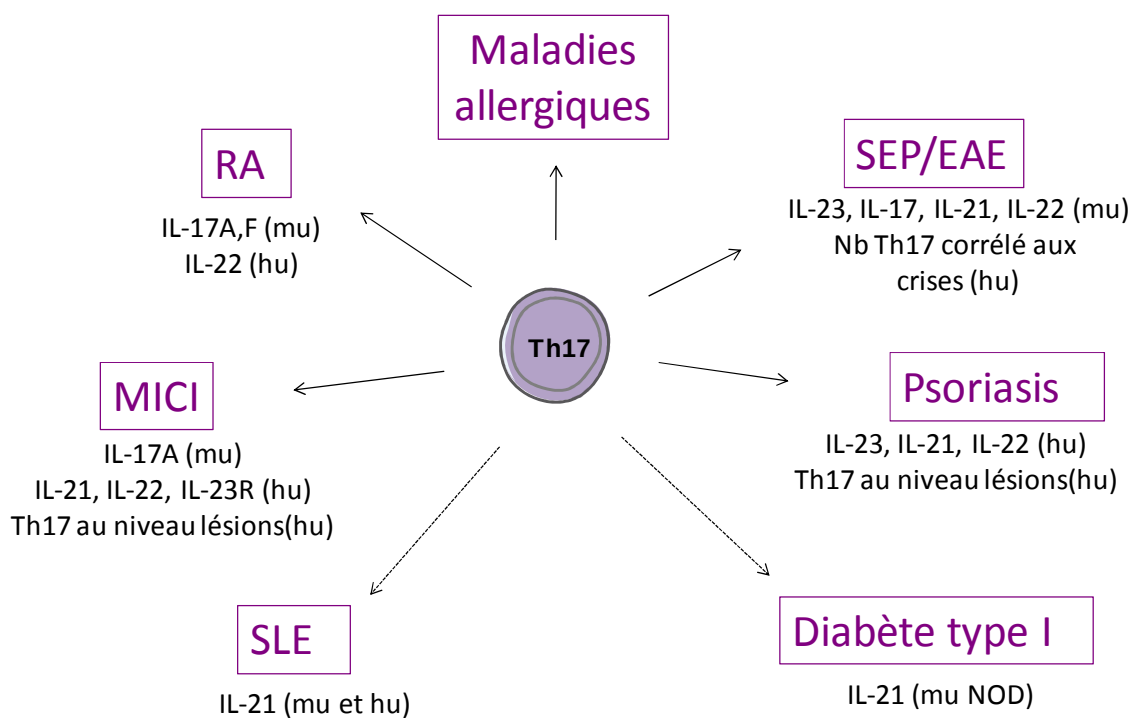


Figure 9. Implication des Th17 dans les désordres immunitaires. Les Th17 sont engagés, chez l'Homme (hu) ou la souris (mu), dans les maladies allergiques notamment pulmonaires, ainsi que dans certaines maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde (RA), les maladies chroniques inflammatoires de l'intestin (MICI), le lupus (SLE), la sclérose en plaque (SEP), le psoriasis ou encore le diabète de type I. La présence des Th17 est souvent révélée par la détection des cytokines qu'ils sécrètent.

3.2.1. Th17 et maladies auto-immunes

La **sclérose en plaques** et son modèle murin, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), avaient été associées aux Th1 en tant que responsables des réponses immunitaires délétères. Le lien avait été fait suite à l'implication de l'IL-12 dans la maladie. L'IL-12, composée de 2 sous-unités, p40 et p35, avait jusque là été détectée par la reconnaissance de p40 uniquement. Le développement d'outils permettant la détection de la sous-unité p35 et le fait qu'elle puisse s'associer à une autre sous-unité, p19, pour former l'IL-23 ont remis en cause le rôle de l'IL-12. A l'aide des souris KO pour chacune des sous-unités, Cua a montré que seule la déficience en sous-unités p19 ou p40 induit une résistance au développement de l'EAE et donc que l'IL-12, et par extrapolation les Th1, était moins important dans la maladie que l'IL-23, cytokine régulant positivement les Th17 (Cua et al., 2003). Par la suite, d'autres preuves de l'implication des Th17 dans l'EAE ont été mises en évidence. Les souris déficientes pour l'IL-17 montrent une apparition de la maladie retardée et moins sévère. Ceci n'est pas le cas pour l'IL-17F. Dans les modèles murins déficients pour l'IL-21 ou pour l'IL-21R, n'ayant que très peu de Th17, une réduction significative de la progression de la maladie est observée (Spolski and Leonard, 2008b). La pathogénicité des Th17 dans l'EAE suivrait 2 étapes. Une première vague de Th17 infiltrerait le cerveau suite à la reconnaissance par le CCR6 de la chimiokine CCL20 sécrétée par des cellules du SNC, les cellules épithéliales des plexus choroïdes (Reboldi et al., 2009). Les Th17, attirés près du SNC, seraient capables de perméabiliser la barrière hémato-encéphalique (BHE) en altérant les jonctions serrées par les sécrétions d'IL-17 et d'IL-22 captées par les cellules endothéliales de la BHE (Kebir et al., 2007). Et, dans un second temps, les Th17 infiltrés dans le cerveau activeraient les astrocytes. Ces cellules relargueraient des chimiokines induisant une 2^{ème} infiltration de cellules immunitaires incluant de nouveaux Th17 (Reboldi et al., 2009) et des Th1. Finalement, les Th1 possèdent aussi un rôle délétère dans l'EAE mais moins important que les Th17. Ceci peut être expliqué par le fait que les Th17 sécrètent une quantité très supérieure de GM-CSF au niveau du SNC comparés aux Th1. Cette cytokine a été montrée comme indispensable pour le transfert de la maladie (Codarri et al., 2011).

La **polyarthrite rhumatoïde** et son modèle murin sont liés à l'IL-23 (Miossec, 2009). De l'IL-21 est retrouvée dans le surnageant de culture des cellules synoviales de patients (Søndergaard and Skak, 2009). De plus, une seule injection d'IL-17 suffit, chez la souris, à induire des symptômes spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde : infiltrat massif de cellules immunitaires, érosion de l'os et dégradation du cartilage. Ceci est le résultat par lequel l'IL-17 induit la production de molécules inflammatoires, de chimiokines, d'oxyde nitrique et de

métallo-protéinases par les synoviocytes, les chondrocytes et les macrophages (Figure 8). Un rôle pro-inflammatoire important des Th17 a donc été suggéré (Miossec, 2009; Hu et al., 2011).

Dans les biopsies de **psoriasis**, une forte expression d'IL-17, d'IL-22 et d'IL-17F reflète la présence de Th17. La cytokine qui semble être la plus pathogène ici est l'IL-22. Cependant, des essais cliniques utilisant des anticorps monoclonaux anti-IL-17 ont montré des effets bénéfiques pour les patients (Miossec, 2009).

Pour la plupart des maladies citées ci-dessus, l'activité Th1 a été bien décrite. Leur contribution était sans équivoque avant la découverte des Th17. Or, il s'est avéré que l'action pro-inflammatoire qui leur avait été attribuée pouvait être celle des Th17. Le premier exemple est l'implication majeure des Th17 comparée aux Th1 dans l'EAE (voir plus haut). Pour le modèle murin d'**uvéite auto-immune**, l'EAU ou uvéite auto-immune expérimentale, le rôle inflammatoire des Th1 serait complété par les Th17. Ces 2 types cellulaires agiraient à différentes phases de la maladie (Yoshimura et al., 2008). L'équipe de Cox s'est penchée sur l'action des Th1 et Th17 dans un modèle murin de transfert adoptif de l'une ou l'autre population cellulaire spécifique d'un peptide oculaire (Cox et al., 2008). Il en résulte des réactions inflammatoires quasiment identiques. Pour déterminer une bonne cible thérapeutique la question à poser ne serait donc pas « quel est l'acteur de la pathologie ? » mais « quels sont les acteurs, à quels moment interviennent-ils et dialoguent-ils ensemble ? ».

3.2.2. Th17 et allergies

Les Th17 sont étudiés dans les allergies principalement pour leur sécrétion d'IL-17A et d'IL-17F. En dépit de la théorie disant que les Th17 pourraient être considérés comme des régulateurs négatifs de l'atopie par la sécrétion de métallo-protéinases, diminuant les dépôts de matrice extracellulaire responsable du remodelage des voies respiratoires, le caractère inflammatoire de ces cytokines leur confère un rôle pro-atopique. Ces cytokines peuvent aussi faire sécréter des molécules chimio-attractantes par les cellules musculaires lisses et épithéliales. Elles ont alors le potentiel d'attirer des neutrophiles sur le site de l'inflammation, notamment dans le cas d'inflammation aiguë des voies respiratoires. Les messagers d'IL-17A y sont corrélés de manière positive avec le nombre de neutrophiles (He et al., 2009) et les Th17 sont associés à la sévérité de l'atopie dans certains cas (Louten et al., 2009). Les Th17 produisent aussi de l'IL-17F qui peut privilégier les réponses de type Th2 et donc favoriser le recrutement d'éosinophiles, l'augmentation des IgE et IgG1 du sérum ainsi que l'expression des cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 (Jutel and Akdis, 2011). Bien que l'IL-21 ait la capacité de

diminuer la production d'IgE et la sévérité de la rhinite allergique dans le modèle murin induit par la protéine ovalbumine (Spolski and Leonard, 2008a), les souris déficientes en IL-21R développent peu de réactions allergiques (Jin et al., 2009). Aussi, le syndrome d'hyper IgE (HIES) est caractérisé par une quantité importante d'IgE dans le sérum (>2000 UI/mL) et une immuno-déficience en Th17. La cause du manque de Th17 serait une mutation de *stat3* associée à une perte de fonction du gène qui est un facteur de transcription clé pour les Th17. Le taux d'IgE par contre n'est pas expliqué. Est-il la conséquence de la mutation de *stat3* directement ? Ou bien est-ce le défaut en Th17 qui ne peut plus réguler l'immunité humorale favorisant les Th2? Ceci reste à déterminer.

3.3. Th17 et immunité anti-microbienne

La compréhension première du rôle des Th17 est passée par l'étude de ses actions pathologiques mais toutes les fonctions des Th17 ne sont pas délétères.

L'essentiel de l'action protectrice des Th17 passe par la sécrétion de ses cytokines (IL-17, IL-17F, IL-21 et IL-22) qui induisent la sécrétion de facteurs inflammatoires et chimio-attractants. L'IL-17 attirerait principalement les neutrophiles en induisant le relargage d'IL-8 (ou CXCL8) par les cellules épithéliales.

Le rôle protecteur des Th17 envers les **champignons** a été décrypté à travers l'étude de patients présentant une candidose chronique. Cette maladie, hautement hétérogène sur le plan clinique, touche des personnes atteintes d'immuno-déficience qui peut être liée à des syndromes bien connus comme le SIDA ou l'immuno-déficience combinée sévère, mais aussi à des altérations génétiques. Notamment, les patients atteints de HIES (décrit précédemment) ayant une mutation de *stat3* ou des patients atteints d'une mutation au niveau du gène codant pour AIRE, facteur de transcription impliqué dans la régulation de la tolérance immunitaire, sont porteurs de *Candida albicans* (Dominguez-Villar and Hafler, 2011). Deux nouvelles mutations viennent de rentrer dans l'étiologie humaine de cette infection. Il s'agit d'une mutation du gène codant l'IL-17F et d'une autre touchant le gène codant pour l'IL-17R (Puel et al., 2011). Ceci est confirmé chez la souris. Les animaux déficients en IL-17 ou IL-17R sont plus susceptibles à l'infection par *Candida albicans* mais aussi par *Klebsiella pneumoniae*, une bactérie à multiplication extra-cellulaire (Louten et al., 2009).

La spécificité des Th17 envers les **virus** et les **bactéries** a fait notamment l'objet d'une étude en 2008 (Brenchley et al., 2008). Les auteurs de ce travail ont montré une réponse

des LT CD4⁺ de patients par l'IL-17 aux antigènes bactériens du *Staphylococcus aureus* mais pas au virus Epstein-Barr, ni de la grippe, ni du SIDA. Ceci ne veut pas dire pour autant que les Th17 n'interviennent pas dans l'immunité anti-virale (van de Veerdonk et al., 2009). Cela signifie que la polarisation des LT CD4⁺ reconnaissant les virus n'est pas ou peu dirigée vers le phénotype Th17. Récemment, une étude du HIES a révélé que l'immunité impliquant des Th17 était d'une importance majeure dans la réponse anti-bactérienne au *Staphylococcus aureus* au niveau de la peau et des poumons. En effet, la présence permanente de micro-organismes commensaux et pathogènes dans ces environnements, en contact direct avec l'extérieur, nécessiterait une identification plus claire des signaux de dangers que les signaux ordinaires d'inflammations (IFN γ , TNF α et IL-1 β sécrétés par les cellules de l'immunité innée) pour activer les cellules épithéliales. Cela dépendrait de l'existence d'un 2^{ème} signal fourni par les Th17 consistant en la sécrétion d'IL-17 et d'IL-22 (Minegishi et al., 2009).

3.4. Rôle des Th17 dans les cancers

3.4.1. Généralités

Les Th17 ont été initialement décrits en 2005 comme des cellules CD4⁺ sécrétant de l'IL-17 (Harrington et al., 2005). Avant cela, la présence d'**IL-17** au sein des tumeurs avait déjà été montrée et son rôle partiellement expliqué. Des travaux du laboratoire, menés en 1999 par le Pr Eric Tartour, ont démontré l'ambivalence de l'IL-17 dans le développement tumoral. En effet, une lignée humaine de carcinome du col de l'utérus, transfectée par un vecteur codant pour l'IL-17, a été injectée dans une souris Nude (Tartour et al., 1999). Cette lignée proliférait plus *in vivo* que la lignée contrôle non transfectée. Cet effet a été associé à une augmentation d'IL-6 et un recrutement plus important de macrophages par rapport aux lignées ne produisant pas d'IL-17. Donc, dans ce modèle, **l'IL-17 est pro-tumorale** mais l'immuno-déficience de l'hôte est une limite d'étude à prendre en compte (Tableau 3). En effet, une étude postérieure a montré un **impact anti-tumoral de l'IL-17** sur la prolifération tumorale chez un hôte immuno-compétent (Benchetrit et al., 2002) (Tableau 3). Là encore, la lignée tumorale utilisée, issue d'un mastocytome, avait été transfectée par un vecteur codant pour l'IL-17. Il est à noter que, dans certains cas, la tumeur elle-même peut être la source d'IL-17. Il a été démontré au laboratoire que des lymphomes de type T peuvent spontanément sécréter de l'IL-17 et que **l'activité anti-tumorale de l'IL-17 est dépendante des lymphocytes T** (Cirée et al., 2004). Les preuves de cette dépendance sont les suivantes : l'activité anti-proliférative de l'IL-17 sur la tumeur n'a pas lieu chez une souris Nude. L'IL-17 génère plus de CTL spécifiques de la tumeur et l'IL-17 permet une

réponse mémoire. De nombreuses autres études montrent des actions pro- ou anti-tumorales de l'IL-17 ou même de l'IL-23, cytokine nécessaire au maintien du phénotype Th17 (Tableau 3). Il est à noter que **la dualité des réponses dues à l'IL-17 dans les tumeurs n'est pas un cas unique**. D'autres cytokines ont été décrites pour avoir un tel profil telles que l'IL-6 et l'IL-4 (Cirée et al., 2004).

Tableau 3. Implications des cytokines IL-17 et IL-23 dans les cancers. Les cytokines IL-17 et IL-23 sont décrites comme pro- ou anti-tumorales selon le cancer ou le modèle murin étudié. Abréviations, mu : murin, hu : humain, KO : knock-out.

Cytokine	Tumeur	Espèce (induction)	Rôle	Référence	Note
IL-17	Col de l'utérus	mu	anti-tumoral	(Benchetrit et al., 2002)	
IL-17	Colon	mu	anti-tumoral	(Kryczek et al., 2009b)	hôte IL-17 KO
IL-17	mélanome	mu	anti-tumoral	(Martin-Orozco and Dong, 2009)	hôte IL-17 KO
IL-17	Ovaire	hu	anti-tumoral	(Kryczek et al., 2009a)	Simple corrélation
IL-23	Fibrosarcome	mu (intra-dermique)	anti-tumoral	(Oniki et al., 2006)	
IL-23	Mélanome	mu (sous-cutané)	anti-tumoral	(Oniki et al., 2006)	tumeur faiblement immunogène
IL-17	Mastocytome	mu	pro-tumoral	(Tartour et al., 1999)	hôte immuno-déficient
IL-17	Poumon (NSCLC)	hu/mu	Pro-tumoral (néo-angiogénèse)	(Numasaki et al., 2005)	hôte immuno-déficient
IL-17	Fibrosarcome	mu (sous-cutané)	Pro-tumoral (néo-angiogénèse)	(Numasaki et al., 2003)	tumeur faiblement immunogène
IL-17	Colon	mu (sous-cutané)	Pro-tumoral	(Numasaki et al., 2003)	
IL-17	Vessie	mu (sous-cutané)	Pro-tumoral	(Wang et al., 2009)	hôte IL-17 KO
IL-17	Mélanome	mu (sous-cutané)	Pro-tumoral	(Wang et al., 2009) (He et al., 2010)	hôte IL-17 KO, IL-17R KO
IL-17	Thymome	mu (sous-cutané)	Pro-tumoral	(He et al., 2010)	hôte IL-17 KO, IL-17R KO
IL-23	Carcinome	mu (chimique)	pro-tumoral	(Kortylewski et al., 2009)	hôte IL-23 KO

Le rôle de l'**IL-21** vis-à-vis des tumeurs a aussi été étudié. La capacité de l'IL-21 à réguler les réponses des lymphocytes T et des cellules NK suggère un rôle anti-tumoral, notamment envers les lymphomes B puisque les lymphocytes B normaux y sont sensibles (Spolski and Leonard, 2008b).

Les **cellules Th17** sont quant à elles moins étudiées. Leur présence a bien été notée dans les tumeurs murines et humaines (Tableau 4). Bien que leur rôle ne soit encore que peu décrit, il est souvent sous-entendu suite à une corrélation avec la taille ou le stade de la tumeur (i.e. cancer de la prostate, Sfanos et al., 2008) ou pouvant être un facteur pronostique (i.e. cancer du poumon, Koyama et al., 2008). Actuellement, aucun consensus n'est encore établi. En effet, en fonction des auteurs et donc des cohortes de patients ou bien encore des modèles murins, l'implication des Th17 ne serait pas la même (Tableau 4).

Les mécanismes d'action des Th17 dans les tumeurs sont encore moins bien décrits. Les modèles murins de transfert adoptif sont, pour l'heure, les seuls outils utilisés. Le transfert adoptif de Th17 différenciés *in vitro* permet d'éradiquer un mélanome chez la souris C57BL/6. Les Th17 sont plus efficaces que les Th1 dans leur activité anti-tumorale et l'éradication de la tumeur dépend de l'IFN γ . La provenance de l'IFN γ , nécessaire à la fonction anti-tumorale de ces Th17, n'a pas été recherchée (Muranski et al., 2008). Cependant, deux études viennent appuyer cette découverte. La première montre que les Th17 favorisent l'action des LT CD8⁺ producteurs d'IFN γ . La deuxième décrit l'action anti-tumorale de l'IL-23 induite aussi par des LT CD8⁺ producteurs d'IFN γ . D'autre part, les Th17 seraient capables de recruter localement des CPA et même d'induire des réponses mémoires CD8⁺ anti-tumorales (Oniki et al., 2006; Martin-Orozco et al., 2009).

L'idée restant inexplorée à ce jour est l'existence d'un lien entre une inflammation chronique pré-cancéreuse et un rôle des Th17. Les Th17 seraient pro-tumoraux lorsqu'ils arriveraient sur le site inflammatoire avant le développement tumoral. En effet, Tosolini décrit une corrélation directe entre le profil Th17 et le stade de gravité des tumeurs du colon. Ce genre de tumeurs est souvent précédé d'une inflammation chronique (Tosolini et al., 2011). Les cancers du foie et de l'estomac sont, eux, souvent associés à des infections microbiennes créant des inflammations locales. En revanche, des organes moins soumis aux inflammations tels que les seins et la prostate impliqueraient activement des Th17 anti-tumoraux (Tableau 4). L'ovaire, en tant qu'organe immuno-privilegié confirmerait aussi cette théorie. Le seul organe faisant défaut à cette hypothèse serait le poumon (Tableau 4). D'autres études sont nécessaires pour comprendre par quels mécanismes ces cellules agissent.

Tableau 4. Présence et rôle des Th17 dans les cancers. La présence des Th17 a été détectée dans de nombreux types de tumeurs. Leur rôle envers les tumeurs n'est pas consensuel (pro- ou anti-tumoral) et leurs mécanismes d'action sont encore peu décrits.

Tumeur	Espèce (induction)	Rôle	Mécanismes action	Note	Référence
Gliome	hu	?	?		(Wainwright et al., 2010)
Myelome	hu	?	?	Les DC du micro-environnement sont capables d'induire des Th17	(Dhodapkar et al., 2008)
Ovaire	hu	?	?		(Kryczek et al., 2007)
Ovaire	hu	?	?	Micro-environnement tumoral favorable à la différenciation des Th17	(Miyahara et al., 2008)
Prancréas	hu	?	?		(Kryczek et al., 2007)
Rein	hu	?	?		(Kryczek et al., 2007)
Cerveau	mu (intra-cranial)	?	?		Wainwright et al., 2010)
LNH	hu/mu	Anti-tumoral	?	Tumeur inh Th17 formation	(Yang et al., 2009)
Melanome	mu	Anti-tumoral	par l'IFNg	Transfert adoptif de Th17 plus efficace que les Th1	(Muranski et al., 2008)
Melanome	mu (sous-cutané)	Anti-tumoral	favorise les réponses des LT CD8 ⁺ , recrute des DC	Transfert adoptif de Th17 (Th1 non efficaces)	(Martin-Orozco et al., 2009)
Ovaire	hu	Anti-tumoral	Recrutent d'autres LT via CXCL-9 et -10	Relation inverse entre Th17 et Treg intra-tumoraux	(Kryczek et al., 2009a)
Ovaire	mu	Anti-tumoral	?	Induction de Th17 <i>in vivo</i> par conversion des Treg via l'IL-2	(Leveque et al., 2009)
Poumon	hu	Anti-tumoral	?	Corrélation inverse Th17/Treg (plus de Th17) chez les patients avec survie plus grande	(Koyama et al., 2008)
Prostate	hu	Anti-tumoral	?	Corrélation inverse entre Th17 et progression de la tumeur	(Derhovanessian et al., 2009)
Prostate	hu	Anti-tumoral	?	répondeurs à la chimio ont plus de Th17	(Sfanos et al., 2008)
Sein	hu	Anti-tumoral	?	Corrélation inverse entre Th17 et Treg du sang après chimio (anti-Her2)	(Horlock et al., 2009)
Estomac	hu	Pro-tumoral	?	proportion de Th17 du sang augmente dans les stades avancés	(Zhang et al., 2008)
Carcinome du foie	hu	Pro-tumoral (néo-angiogenèse)	?	taux élevé de Th17 intra-tumoraux associé à un mauvais pronostic	(Zhang et al., 2009)
Colon	mu (induction par infection)	Pro-tumoral	par l'IL-17	La neutralisation de l'IL-17 ou du récepteur à l'IL-23 empêche la cancérogenèse	(Wu et al., 2009)
Colon	hu	Pro-tumoral	?	Une faible expression des gènes associés aux Th17 est corrélée à une meilleure survie des patients	(Tosolini et al., 2011)

3.4.2. Présence et rôle des Th17 dans les lymphomes B

La littérature est assez pauvre dans la description et la caractérisation des lymphocytes Th17 infiltrant les lymphomes. Un travail, réalisé par Zhi-Zhang Yang *in vitro* sur des prélèvements humains, les étudie au sein des DLBCL (Yang et al., 2009). Il montre la faible représentativité des Th17 dans les LNH en comparaison des autres types de lymphomes.

Les LNH n'ont en moyenne que très peu de Th17 parmi les LT CD4⁺ les infiltrant : de 3% pour les lymphomes du manteau à moins de 1% pour ceux de la zone marginale, folliculaire et les DLBCL. Les tumeurs peuvent présenter des Th17 CD4⁺ IL-17⁺ ou Th17-Th1 CD4⁺ IL-17⁺ IFN γ ⁺ ou aucune cellule CD4⁺ IL-17⁺. Les cellules CD4⁺, dans ce contexte, seraient donc « plastiques ». Elles sont capables de changer de phénotype à la suite d'une incubation *ex vivo* avec des cytokines spécifiques, notamment de passer de Th1 à Th17. Yang a aussi montré que les cellules lymphomateuses B humaines sont capables, *in vitro*, d'inhiber la génération de Th17. Pour cette équipe, les Th17 seraient fortement associés aux Treg, leur relation serait à l'état de balance dans l'homéostasie des LT CD4⁺.

3.4.3. Balance Th17/Treg dans les cancers

Les réponses immunitaires ne devraient être actives que le temps d'éliminer les micro-organismes pathogènes ayant pénétré l'organisme. Pour maintenir une homéostasie immunitaire, il est donc nécessaire qu'un mécanisme régulateur efficace existe. Les LT régulateurs (Treg) occupent cette fonction.

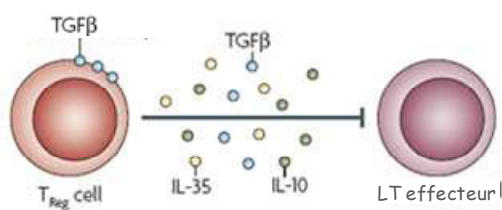
Les Treg sont des lymphocytes T CD4⁺ exprimant à leur surface le marqueur CD25 de manière forte. Deux grandes catégories sont décrites. Les Treg naturels sont caractérisés par le facteur de transcription Foxp3 dont l'expression est induite dans le thymus. Les Treg induits sont, eux, issus de LT naïfs et dont le gène *FOXP3* s'exprime lorsque les cellules sont en périphérie, principalement sous l'action du TGF β (Sakaguchi et al., 2009). La déficience en Foxp3 induit une immuno-déficience sévère chez l'homme, le syndrome IPEX, pour « immuno-dérégulation associée à une polyendocrinopathie et une enhéropathie liées au chromosome X » (Vignali et al., 2008). Cela montre l'importance des Treg dans la maintenance de la tolérance au soi.

3.4.2.1 Mécanismes d'action immuno-suppressive

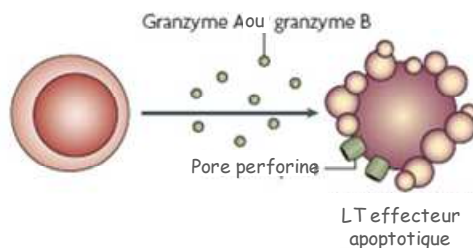
Les Treg sont capables de supprimer la prolifération et la production cytokinique des autres LT CD4⁺, les Th, et des LT CD8⁺ *in vitro* lorsqu'ils sont cultivés avec leur antigène spécifique et des CPA. Les mécanismes d'actions des Treg ne sont pas totalement définis. En effet, ils

pourraient être soit dépendant soit indépendant de contacts cellulaires (Figure 10). L'action des nTreg dépend d'un contact cellulaire *in vitro*, celle des iTreg en est indépendante. La culture des nTreg et de leur cible ne permet pas une suppression si les 2 types cellulaires sont séparés par une membrane semi-perméable. Pourtant, *in vivo*, des nTreg déficients pour l'IL-10 ne peuvent pas induire de maladie inflammatoire intestinale. La mort par lyse par des granzymes et perforines est un autre moyen d'action des Treg. Les mécanismes d'action par contact résulteraient en une immuno-suppression due à : (i) une augmentation intra-cellulaire d'AMP cyclique. (ii) la génération d'adénosine péri-cellulaire catalysée par CD39 et CD73, exprimés à la surface des Treg. (iii) une interaction entre CTLA-4 et B7 (CD80 ou CD86) à la surface des cellules cibles. Les molécules immuno-suppressives que sécrètent les Treg sont le TGFβ et l'IL-10 (Sakaguchi et al., 2009). L'interaction des Treg avec les CPA modifie la fonction de ces dernières. Les Treg peuvent tuer les CPA ou leur faire sécréter IDO, une enzyme favorisant la conversion des LT naïfs en Treg (Baban et al., 2011). Elles voient aussi leur expression de CD80 et CD86 diminuer à leur surface. Ces molécules sont nécessaires à l'activation des LT effecteurs. Elles constituent le 2^{ème} signal d'activation en se liant avec le CD28, le 1^{er} signal étant le lien entre le TCR et le CMH porteur du peptide antigénique et le 3^{ème} étant le signal de danger par des molécules solubles de l'environnement (Sakaguchi et al., 2009). Le complexe CTLA-4 (du Treg) /B7 (de la CPA) est internalisé par le Treg par endocytose, la CPA perdant la molécule de co-activation de sa surface (Qureshi et al., 2011).

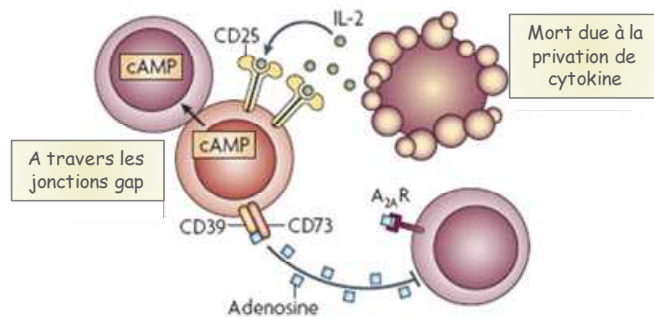
a Cytokines inhibitrices



b Cytolyse



c Perturbations métaboliques



d Ciblant les cellules dendritiques

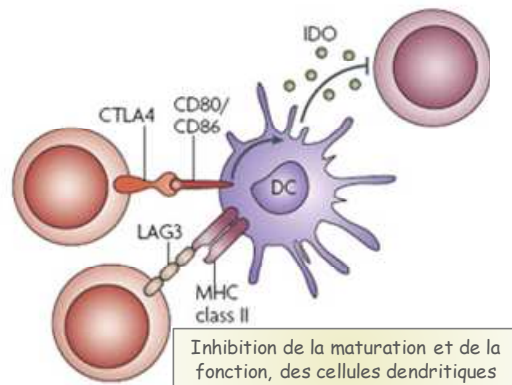


Figure 10. Principaux mécanismes d'action immuno-suppressive des Treg. Les Treg agissent à distance (a) via la sécrétion de cytokines immuno-régulatrices ou (b) via la sécrétion de granzymes. Par contact cellulaire, ils induisent (c) une perturbation métabolique de leur cible impliquant l'AMP cyclique ou le CD39 et CD73 et (d) inhibent les actions des cellules dendritiques. Adapté de Vignali et al., 2008.

3.4.2.2 Rôle des Treg dans les cancers

Les Treg, de par leur action immuno-régulatrice, peuvent être néfastes aux réponses immunitaires anti-tumorales. Dans ce cas, ils sont associés à un mauvais pronostic vital des patients atteints de cancer. En effet, la cellule tumorale exprime à sa surface des antigènes tumoraux à cause de l'instabilité de son génome, et donc de mutations, et est reconnue comme non soi par le système immunitaire. Cependant, cette tumeur garde des propriétés du soi et les Treg inhibent les réponses anti-tumorales à son encontre (Darrasse-Jèze et al., 2009). Ainsi, plusieurs équipes ont envisagé la déplétion de cette sous-population lymphocytaire comme thérapie anti-tumorale (Shimizu et al., 1999; Tanaka et al., 2002). La déplétion des Treg chez la souris est possible grâce à plusieurs outils. Les **anticorps anti-CD25** sont le moyen le plus utilisé et peuvent éradiquer complètement la tumeur (Onizuka et al., 1999; Golgher et al., 2002; Chaput et al., 2007). En effet, le CD25 est un marqueur de surface exprimé par les Treg et reflétant leur potentiel immuno-suppresseur. Cependant, cette molécule est aussi exprimée par les LT effecteurs (Teff) conventionnels. La cinétique de traitement est alors très importante afin de ne pas dépléter les Teff qui sont les cellules

bénéficiant de la déplétion des Treg (Meyer and Herr, 2010). La molécule caractérisant le mieux les Treg chez la souris est le facteur de transcription Foxp3. Des souris KO pour Foxp3 ont été développées. Cependant, comme pour l'homme, ces souris déclenchent des pathologies auto-immunes très précocement (Kim et al., 2007). Des souris pouvant être déplétées en cellules Foxp3⁺ de manière conditionnelle, telles que les **souris Foxp3-DTR**, ont été développées. Or, même chez ces souris des lymphocytes suppresseurs Foxp3⁺ sont retrouvés. Le traitement par les **anticorps anti-CTLA-4** régule négativement l'action des Treg en les empêchant de bloquer l'interaction B7-CD28 entre les CPA et Teff (von Euw et al., 2009; Callahan et al., 2010).

3.4.2.3 Rôle des Treg dans les lymphomes B

Bien que la présence des Treg soit majoritairement corrélée à de mauvais pronostics vitaux dans les cancers, leur rôle est encore controversé dans les lymphomes B. En effet, parmi les rares études s'y intéressant, une seule ne montre aucune influence du nombre de Treg vis-à-vis de la survie (Hasselblom et al., 2007). Les autres études corrélient les Treg avec un bon pronostic de survie (Carreras et al., 2006; Lee et al., 2008; Tzankov et al., 2008). Il est à noter que ces études sont toutes menées dans le cas de lymphomes nodaux.

Les lymphomes B murins, et plus particulièrement ceux issus de la lignée A20, favorisent l'orientation immuno-suppressive de leur micro-environnement (Elpek et al., 2007), en induisant notamment plus de Treg que les autres tumeurs. L'équipe de Karlsson a montré que la déplétion des cellules CD25⁺ chez des souris porteuses d'un lymphome B sous-cutané, issu de la lignée A20, induit une croissance retardée de la tumeur ainsi qu'une augmentation de la survie des souris (Heier et al., 2008). Donc les Treg y seraient pro-tumoraux. Cependant, cette étude comporte un grand biais : la localisation sous-cutanée du lymphome est irrelevante par rapport à l'Homme. De plus, il est à noter que des Treg induits se polarisent au cours du développement tumoral de ce modèle, ce qui explique en partie le retard et non pas l'éradication de la tumeur.

3.4.2.4 Rôle de la balance Th17/Treg dans les cancers

Depuis leur découverte, les Th17 ont montré un lien proche avec les Treg (Figure 11). Tout d'abord, leur **différenciation** est liée au TGFβ. Seul, il polarisera un naïf en Treg, associé à l'IL-6 il polarisera un LT naïf en Th17 car lorsque le récepteur à l'IL-6 est activé simultanément au récepteur au TGFβ, il inhibe la transcription de Foxp3. Ceci peut déterminer alors la capacité d'un micro-environnement favorable à l'un ou l'autre sous-type.

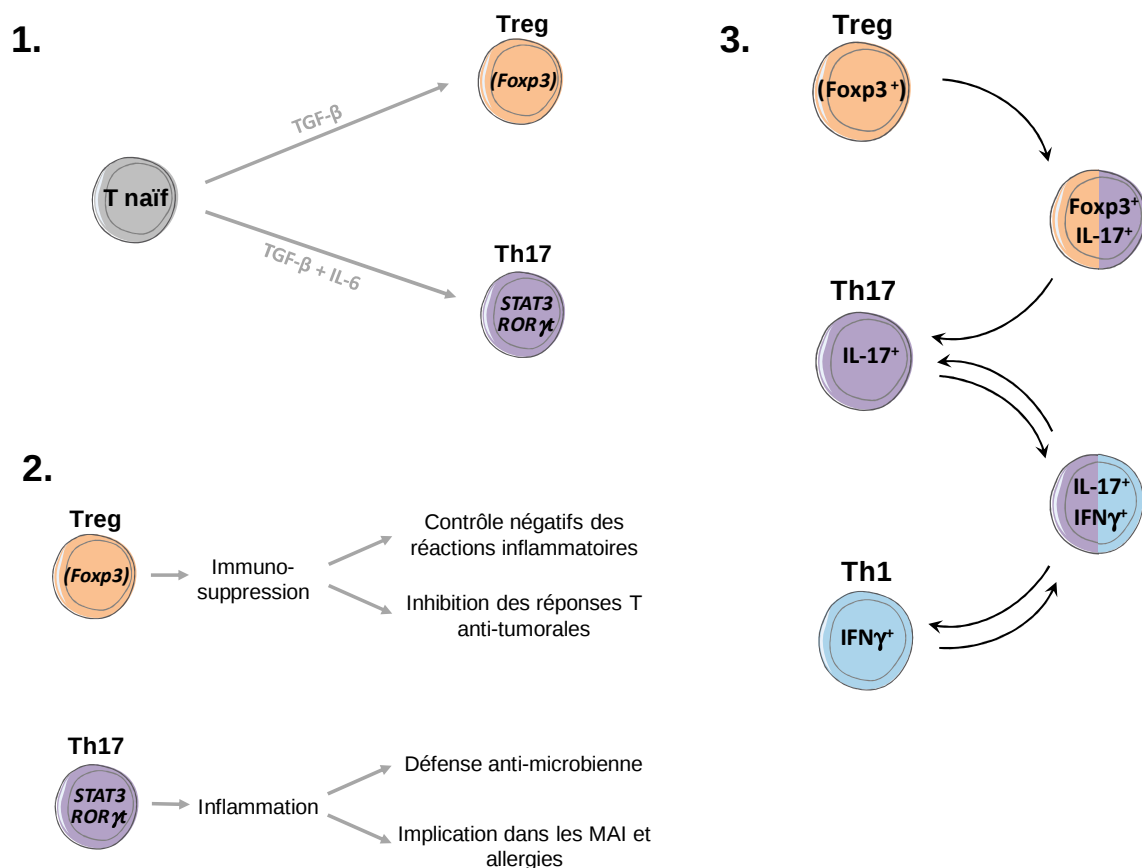


Figure 11. Principaux liens des Th17 avec les Treg . 1) Les Treg et les Th17 se différencient à partir du même type cellulaire : un LT naïf, en fonction des cytokines présentes dans le micro-environnement. 2) L'action des Treg est immuno-suppressive et donc l'exact inverse de celle des Th17 qui est pro-inflammatoire. 3) Une phéno-conversion peut exister entre les Treg et les Th17 mais elle n'est démontrée que dans un seul sens, à l'inverse de la phéno-conversion Th17/Th1 qui peut exister dans les 2 sens. Un phénotype double positif est alors détectable.

Ensuite, leurs **actions** sont totalement opposées. Les Th17 sont pro-inflammatoires alors que les Treg sont anti-inflammatoires.

Dans certains cancers, l'équipe de Zou a détecté en 2007 la **présence concomitante** des deux sous-populations. Il montre que, dans un modèle murin de mélanome, les Treg et les Th17 ont la même cinétique d'apparition (dès 5 jours post-injection de la tumeur) dans le micro-environnement tumoral. De plus, leur nombre augmente en fonction de la croissance tumorale. Cependant, les Treg sont toujours majoritaires par rapport aux Th17 (Kryczek et al., 2007).

Il est clair depuis cette année que les Th17 de l'EAE sont « plastiques », que leur phénotype peut évoluer vers celui Th1 en fonction des cytokines présentes dans le milieu inflammatoire (Hirota et al., 2011). La phénoconversion Treg vers Th17 est aussi décrite dans les maladies

auto-immunes mais le contraire reste hypothétique. Des cellules CD4⁺ IL-17⁺ Foxp3⁺ ont été décrites dans le sang périphérique chez l'Homme ainsi que dans des maladies inflammatoires et des carcinomes (Kryczek et al., 2011). Leur rôle n'est pas encore déterminé.

Dans les cancers, les mécanismes d'interactions entre Th17 et Treg ne sont pas clairs à ce jour. Le fait que leur cinétique d'apparition soit proche (Yang et al., 2006; Bouchliou et al., 2011), les auteurs en déduisent des rôles communs pro-tumoraux. Or, des actions anti-tumorales des Th17 ont été bien décrites (Tableau 4). Plusieurs questions restent alors en suspend : une phénoconversion intervient-elle dans le micro-environnement des tumeurs ? Des interactions existent-elles entre ces cellules infiltrant les tumeurs ? Est-ce que le rôle des Th17 envers les tumeurs peut-être influencé par les Treg ?

4 – Objectifs de la thèse

La grande hétérogénéité des lymphomes est la cause d'une classification constamment revisitée afin de traiter les patients de manière plus adaptée aux caractéristiques propres du sous-type de tumeur. Un des aspects qui reste très peu pris en compte dans cette classification est la localisation tumorale. Les lymphomes non hodgkiniens à grandes cellules B, les plus courants, peuvent se développer au sein des ganglions lymphatiques mais aussi au niveau de la peau, du SNC, des yeux, etc... Un autre aspect restant secondaire sur le plan de la classification est l'infiltrat immunitaire. Bien que leur présence soit associée à un bon pronostic, le rôle des lymphocytes CD4⁺ dans le contrôle du développement du lymphome est mal connu. Le projet de l'équipe que j'ai intégrée pour ma Thèse est de décrypter l'infiltrat immunitaire des lymphomes de type B dans les sanctuaires immunologiques afin de développer de meilleurs traitements. Des travaux préliminaires ont mis en évidence la présence de lymphocytes T dans le microenvironnement de lymphome intraoculaire primitif (PIOL) murin. Le **premier objectif de ma Thèse a été de poursuivre et de compléter l'étude du micro-environnement immunitaire adaptatif, notamment CD4⁺, d'un même type de lymphome B localisé dans différentes localisations tissulaires et de comparer ces micro-environnements**. L'accès aux prélèvements humains étant restreint du fait des localisations extranodales variées et rares, j'ai étudié le micro-environnement du lymphome issu de la lignée A20.IIA-GFP in vivo, implanté chez la souris BALB/c dans 3 sites différents : l'œil, le cerveau (modèles de lymphomes extranodaux) et la rate (modèle de lymphome nodal).

L'infiltrat CD4⁺ des travaux préliminaires dans le micro-environnement du PIOL était largement majoritaire dans le compartiment lymphocytaire. Dans ce modèle, comme dans d'autres types de tumeurs, l'implication de la sous-population lymphocytaire Th1 est connue. Ce n'est pas le cas de la population Th17, nouvellement décrite. Le **deuxième objectif de ma Thèse a été de déterminer si les Th17 étaient présents dans le micro-environnement du PIOL**. Je me suis focalisée sur le lymphome intra-oculaire car l'œil est dépourvu de lymphocyte T résident et est facile d'accès. De plus, ce modèle reproduit bien la pathologie humaine. Les mécanismes d'action des Th1 sont décrits comme étant médiés par les cytokines qu'ils sécrètent. Le **troisième objectif de ma Thèse s'est alors orienté sur le rôle des Th17, du micro-environnement du PIOL, sur la tumeur via les cytokines qu'ils produisent**. Cette question a été abordée sur un plan *vivo* et *vitro*.

Les Th17 agissent de façon opposée aux Treg : les premiers sont pro-inflammatoires et les seconds sont anti-inflammatoires. Ces 2 sous-populations lymphocytaires, liées par une origine commune, seraient en relation de « balance ». Le **quatrième et dernier objectif de ma thèse visait à comprendre la relation Treg/Th17 dans le micro-environnement du lymphome B murins**. Comme le rôle de ces cellules dans les tumeurs est encore controversé et que la proportion des Treg varie en fonction du modèle étudié, j'ai exploré le rôle de ces 2 populations dans les 3 modèles murins dont je disposais. La déplétion des Treg et la neutralisation de l'IL-17 ont été mes principaux outils.

La compréhension de ces mécanismes immunitaires permettra d'aider au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et/ou d'adapter des traitements actuels à ces lymphomes bien particuliers.

Résultats

I. Etude du micro-environnement immunitaire du lymphome B chez la souris – Impact de la localisation du lymphome

a. Article 1

Dans le but de **déterminer quelles sont les populations de l'immunité adaptative** associées à la progression d'un lymphome B, j'ai participé à l'étude des **populations lymphocytaires** ainsi que des **cellules présentatrices d'antigènes** (CPA) d'un micro-environnement tumoral de type « **DLBCL nodal** ». J'ai pour cela utilisé le modèle de lymphome B murin intra-splénique (ISL) mis au point au laboratoire par le Dr Sabrina Donnou. Ce modèle consiste en l'injection de 5.10^6 cellules A20.IIA-GFP dans l'apex de la rate de souris BALB/c (H-2^d) (« Materials and methods », Article 1, page 2).

La rate étant un organe lymphoïde secondaire, les lymphocytes et les CPA sont constitutivement présents dans cet environnement. Lorsqu'une tumeur A20.IIA-GFP y est injectée, le nombre de cellules dendritiques (cellules CD11c⁺) augmente dans les 9 jours qui suivent. Les CPA CD11b⁺, telles que les macrophages et les cellules dendritiques myéloïdes, augmentent elles aussi mais plus tardivement, à partir de 21 jours suivant l'implantation (Article1, Figure 2a). Le nombre de lymphocytes T augmente aussi dès le 9^{ème} jour suivant l'inoculation de cellules tumorales (Article1, Figure 3c) bien que les LT CD4⁺ restent majoritaires.

Le deuxième but de cette étude était de déterminer si les mêmes cellules immunitaires étaient présentes dans un micro-environnement tumoral de type « **DLBCL extranodal** » que dans l'environnement de type « DLBCL nodal » décrit ci-dessus. J'ai utilisé pour cela le modèle de lymphome B murin intra-cérébral (PCL), développé lui aussi au laboratoire. Ce modèle consiste en l'injection de 5.10^4 cellules A20.IIA-GFP dans le striatum du cerveau de souris BALB/c (H-2^d).

Le parenchyme cérébral, en tant qu'organe immuno-privilegié, possède très peu de lymphocytes en transit à l'état physiologique. Les CPA y sont en quantité réduite : très peu de cellules dendritiques (CD11c⁺) mais des cellules CD11b⁺CD11c⁻ résidentes sont présentes : les cellules microgliales (Article1, Figure 3a et b). Après l'inoculation de la tumeur, le nombre de cellules CD11c⁺ augmente dès 9 jours et celui de cellules CD11b⁺ augmente plus tardivement, vers j29. L'augmentation du nombre de lymphocytes est

importante dans le cerveau tumoral comparée au cerveau injecté par du PBS (phosphate buffer saline). Elle est lente, voire inexistante pour les CD8⁺, pendant les 9 premiers jours puis progresse rapidement jusqu'à un plateau vers J21.

En termes de CPA, les 2 micro-environnements, nodal et extranodal, sont comparables dans la cinétique d'apparition/augmentation de nombre : d'abord les cellules CD11b⁺ puis les CD11c⁺. En termes de lymphocytes, leurs nombres augmentent dans les 2 cas. Une **caractéristique commune est la proportion 2 fois plus importante des lymphocytes T CD4⁺ comparée à celle des lymphocytes T CD8⁺**. Il est à noter que des souris Nude, dépourvues de lymphocytes T, meurent plus rapidement de la tumeur que des souris immuno-compétentes dans les 2 conditions. Le groupe de souris immuno-compétentes ayant une tumeur en intra-splénique a 20% de survie à 60 jours alors que la survie des souris portant un lymphome intra-cérébral ne dépasse pas 40 jours.

Du fait de ces traits particuliers, de la description de l'infiltrat de lymphocytes T CD4⁺ comme bon pronostic, et du caractère contradictoire d'un développement exponentiel de la tumeur dans les 2 localisations, nous nous sommes interrogés sur 2 éventualités : un problème dans la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ du micro-environnement et/ou la présence de lymphocytes Treg. Nous avons montré que **les profils Th1, Th2 et Th17 sont présents dans les 2 localisations** bien que ces cellules ne relarguent pas spontanément leurs cytokines *ex vivo*. Les **Treg** représentent **25% des lymphocytes T CD4⁺ dans la rate tumorale**. Cependant, cette proportion est encore plus forte **dans le cerveau tumoral : 40% des lymphocytes T CD4⁺**.

Immune adaptive microenvironment profiles in intracerebral and intrasplenic lymphomas share common characteristics

S. Donnou,^{*†‡} C. Galand,^{*†‡}

C. Daussy,^{*†‡} L. Crozet,^{*†‡}

W. H. Fridman,^{*†‡}

C. Sautès-Fridman^{*†‡} and S. Fisson^{*†‡}

^{*}Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMRS872, Centre de Recherche des Cordeliers, [†]Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, and [‡]Université Paris Descartes, Paris, France

Summary

A large body of evidence indicates that the immune microenvironment controls tumour development. Primary central nervous system lymphomas (PCNSL) are aggressive tumours growing in the central nervous system (CNS). To evaluate the role and characteristics of this immune-privileged site in anti-tumour defences, we compared the cellular and molecular immune microenvironments of growing murine lymphoma B cells injected into the brain or the spleen. In the brain, immune cells, including dendritic cells and T lymphocytes with a large proportion of CD4⁺forkhead box P3 (FoxP3⁺) regulatory T cells, rapidly infiltrated the tumour microenvironment. These populations also increased in number in the spleen. The T cell cytokine profiles in tumour-bearing mice were similar in the two sites, with predominant T helper type 1 (Th1)/Th17 polarization after polyclonal stimulation, although some interleukin (IL)-4 could also be found. We demonstrated that these T cells have anti-tumour activity in the CNS, although less than in the spleen: nude mice that received lymphoma cells intracerebrally died significantly earlier than immunocompetent animals. These results demonstrate that the brain is able to recruit all the major actors to mount a specific anti-tumour immune response against lymphoma.

Keywords: immune microenvironment, intracerebral B cell lymphoma, intrasplenic B cell lymphoma, lymphocytes, privileged site

Accepted for publication 7 April 2011

Correspondence: S. Fisson, INSERM UMRS872, Immune Microenvironment and Tumor Group, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 rue de l'Ecole de Médecine, Paris F-75006, France.
E-mail: sylvain.fisson@crc.jussieu.fr

Introduction

Lymphomas are solid tumours growing in secondary lymphoid organs (the spleen or lymph nodes) or in the central nervous system (CNS). Primary central nervous system lymphomas (PCNSL), mainly of B cell origin, can be located either in the brain (primary cerebral lymphomas, PCL) or in the eyes (primary intraocular lymphomas, PIOL) [1]. PCNSL are generally classified according to morphological and histological criteria as diffuse large B cell lymphomas (DLBCL). To date, molecular and immunohistochemical analyses have been unable to discriminate between PCNSL and their peripheral counterparts, perhaps because of the great heterogeneity of B lymphomas [2–5]. PCNSL, however, have a less favourable prognosis than systemic lymphomas, with 5-year survival of only 30% with aggressive treatment [6,7]. One hypothesis, for which there is currently no corroborating evidence, is that tumour cells may differ between these sites. It is also, however, essential to consider the so-called 'immune sanctuary' in which PCNSL grow.

The CNS has long been considered to be an immune-

privileged site [8,9]. Arguments supporting this idea include the relative isolation of the CNS by the blood–brain barrier, which precludes the entry of blood cells, the absence of a conventional lymphatic system, the absence of T lymphocytes or dendritic cells in quiescent brain parenchyma and constitutive immunosuppression regulated by factors such as transforming growth factor (TGF)- β , vasoactive intestinal peptide (VIP), neuropeptides or vitamin D₃ secreted by CNS cells. Microglial cells are the main resident immune population of the CNS [10] and are responsible for immune surveillance in this delicate site [11]. Activated microglial cells are characterized by high secretory activity that allows them to regulate local immune responses [12], and they can present antigen to infiltrating CD4⁺ or CD8⁺ T lymphocytes. Local immunosuppression, however, actively maintains them in a quiescent state with very little to no expression of major histocompatibility complex (MHC) class II or co-stimulatory molecules.

These mechanisms, all important for avoiding inappropriate inflammatory reactions, also make the CNS a permissive environment for tumour development. Glioma growth in

mice affects microglial cells, impairing their capacity for up-regulation of MHC class II and co-stimulatory molecules and their antigen presentation to T cells [13,14]. Microglial cells readily infiltrate the tumour mass and contribute to local immunosuppression by secreting large amounts of interleukin (IL)-10 [15]. T lymphocytes also infiltrate glioma samples [16,17], but little is currently known about the involvement of these cells in anti-tumour responses.

To gain insight into anti-tumour responses in an immune sanctuary, we compared the tumour growth and immune microenvironments of a murine B cell lymphoma after injection into the brain or the spleen. In view of the great heterogeneity of cerebral and peripheral lymphomas and in the absence of murine and human PCNSL cell lines, we chose to work on a well-characterized murine B cell lymphoma cell line. Any difference in the anti-tumour immune response between the two sites should be attributable to the local microenvironment. We showed the existence of T cell anti-tumour immunity against this lymphoma in both models. Moreover, the cellular and molecular immune environments of these growing B cell lymphomas were surprisingly similar, with T helper type 1 (Th1)/Th2/Th17 polarization of the response.

Materials and methods

Mice

Female BALB/c mice or BALB/c-nude mice (H-2^d) were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) and used between 6 and 8 weeks of age. They were provided with sterile food and water *ad libitum* and kept on a 12-h light–dark cycle. All procedures involving mice conformed with European Union guidelines, French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture Act no. 2001–464, May 2001) and the guidelines of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Committee on Animal Research, and were approved by the relevant local committees.

Cells

A20.IIA is an FcγR-negative clone originating from the A20-2J lymphomatous B cell line. A20.IIA cells were transfected with the green fluorescent protein (GFP) gene, as described previously [18]. Hereafter referred to as A20.IIA-GFP cells, they were maintained at 37°C, 5% CO₂ in complete RPMI-1640 medium (Glutamax; Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 10 mM sodium pyruvate, 50 μM 2-mercaptoethanol and 0.5 mg/ml neomycin.

Tumour implantation

Mice were first anaesthetized by intraperitoneal (i.p.) injection of a mixture containing 120 mg/kg of ketamine and

6 mg/kg of xylazine. For the intracerebral tumour implantation, anaesthetized mice were immobilized on a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). Tumour cells (5×10^4 in a final volume of 2 μl) were injected to a depth of 2 mm to the right of the medial suture and 0.4 mm in front of the bregma, through a Hamilton syringe attached to a penetrating depth controller. The penetrating depth of the syringe was 2.5 mm from the surface of the brain. Each injection delivered the solution slowly, and the syringe was held in place for an additional minute to reduce backfilling of tumour cells. The same procedure was followed for control mice injected with phosphate-buffered saline (PBS).

For the intrasplenic model, the skin was excised on the left flank of each mouse and the peritoneal cavity opened just above the spleen. The extremity of the spleen was then grasped and tumour cells (5×10^5 in a final volume of 100 μl) were injected slowly through an insulin syringe. The same procedure was followed for control mice injected with PBS.

Histology and immunohistochemistry

Mice were euthanized by cervical dislocation. Organs were immediately fixed in a solution of 5% sucrose containing 4% paraformaldehyde for 2 h and then immersed for 4 h in 5% sucrose and overnight in 15% sucrose. Organs were frozen at –80°C and 10-μm sections were cut in a cryostat (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). After the brain or spleen slices were thawed at room temperature for several minutes, the saturation step was performed by incubating the slices for 30 min at room temperature in a solution of anti-CD16/CD32 monoclonal antibody (mAb) (5 μg/ml; 2.4G2) supplemented with 10% normal mouse serum. Tissue slices were then incubated for 1 h at room temperature with phycoerythrin (PE)-coupled anti-CD4 (GK1.5; BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France), anti-CD8 (53–5.8; BD Biosciences), anti-CD11b (M1/70; BD Biosciences) or anti-CD11c (N418; e-Biosciences, San Diego, CA, USA) mAb. After washing steps in 1 × PBS, slides were mounted with fluoromount medium with or without 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories–CliniSciences, Montrouge, France) and maintained at 4°C, protected from light, until analysis.

Brain mononuclear cell isolation

To isolate mononuclear cells, brains were subjected to mechanical disruption and then digested for 30 min at 37°C with 0.1 mg/ml DNase (Roche Diagnostics, Meylan, France) and 1.67 Wünsch units/ml Liberase (Roche Diagnostics). Brain homogenates were then separated on a discontinuous 30:70% Percoll gradient (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), and the cells collected at the interface were carefully washed.

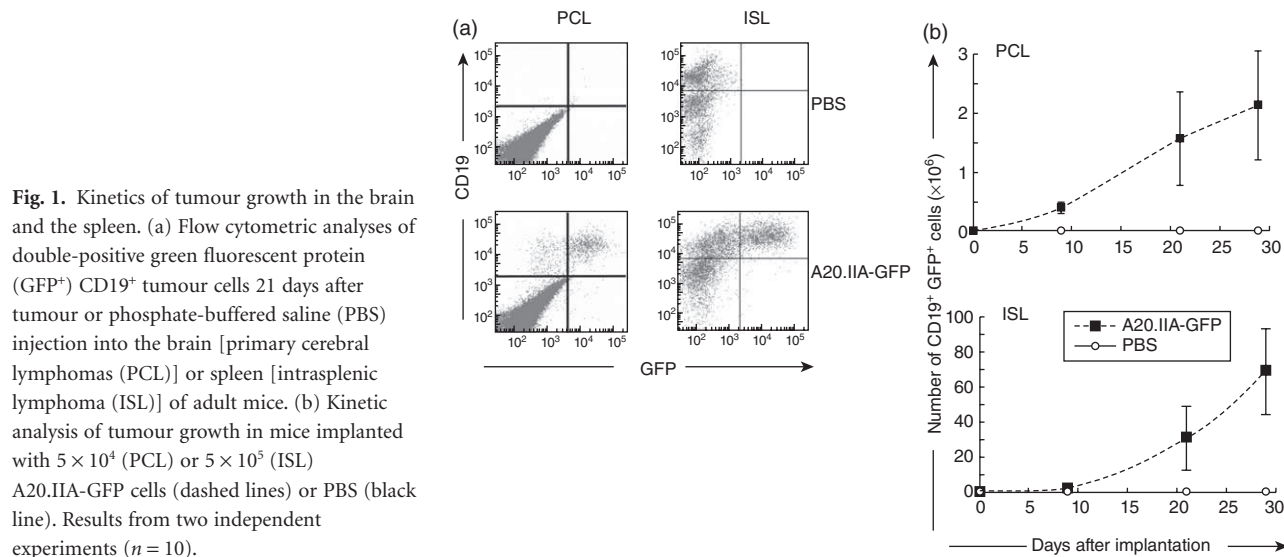


Fig. 1. Kinetics of tumour growth in the brain and the spleen. (a) Flow cytometric analyses of double-positive green fluorescent protein (GFP⁺) CD19⁺ tumour cells 21 days after tumour or phosphate-buffered saline (PBS) injection into the brain [primary cerebral lymphomas (PCL)] or spleen [intrasplenic lymphoma (ISL)] of adult mice. (b) Kinetic analysis of tumour growth in mice implanted with 5×10^4 (PCL) or 5×10^5 (ISL) A20.IIA-GFP cells (dashed lines) or PBS (black line). Results from two independent experiments ($n = 10$).

Flow cytometry

After 20 min of Fc receptor saturation with 10 μ g/ml anti-CD16/CD32 mAb (clone 2.4.G2), cells were incubated for 20 min with the following mAbs: Pacific Blue-conjugated anti-CD3 (145-2C11; BD Biosciences), PE-Texas Red-conjugated anti-CD4 (GK1.5; BD Biosciences), Alexa-700 anti-CD8 (53-6.7; BD Biosciences), Alexa-647 anti-Foxp3 (MF23; BD Biosciences), PE-conjugated anti-CD19 (6D5; e-Bioscience), Pacific-Blue-conjugated anti-CD11b (M1/70; Biolegend, San Diego, CA, USA), allophycocyanin-conjugated anti-CD11c (HL3; BD Biosciences), or with the corresponding isotypic mAb controls (all from BD Biosciences). Cell phenotypes were analysed with the LSRII cytometer and Diva software (BD Biosciences).

Brain and spleen cell stimulation and cytokine measurement

Brain or spleen cells (10^5) were stimulated with anti-CD3/CD28 monoclonal antibody coated beads (Dynabeads, Dynal Biotech, Compiègne, France), as recommended by the manufacturer. To detect IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, interferon (IFN)- γ and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) cytokines, we subjected supernatants collected after 36 h to cytometric bead array analysis according to the manufacturer's instructions (mouse Th1/Th2 cytokine kit; BD Biosciences). IL-17 detection, developed in our laboratory, used a cytometric bead array.

Statistical analysis

Comparisons used Student's *t*-test and Kaplan–Meier curves, performed with GraphPad Prism (GraphPad Soft-

ware, La Jolla, CA, USA). Statistical significance was defined by *P*-values less than 0.05.

Results

Brain and spleen tumour microenvironments contain high numbers of antigen-presenting cells (APC) including dendritic cells

The A20.IIA lymphomatous B cells transfected with GFP (A20.IIA-GFP) were injected either by stereotaxy into the right striatum of adult syngeneic BALB/c mice (PCL model) or directly into the spleen for the intrasplenic lymphoma (ISL) model. When tumour cells were implanted into the brain at day 0, animals began to die at day 23, and all the mice were dead before day 40. As expected, all the control mice injected with PBS survived throughout the experiment without any neurological signs. In the ISL model, 70% of the mice died between days 30 and 50. Kinetics of tumour growth was evaluated by flow cytometry. B tumour cells were detected by the concomitant expression of GFP and CD19 and could be discriminated from endogenous B cells that did not express GFP (Fig. 1a). As shown in Fig. 1b, tumour cells were detected easily in the brain on day 9 and accounted for 10% of all isolated cells. In the spleen, they accounted for no more than 1% of all analysed cells. Tumour growth then accelerated (on day 21 brain and spleen cells accounted, respectively, for 15% and 10% of total isolated cells) and on day 29 tumour cells accounted for almost 15% of all analysed cells in both tumour models (that is, 2 million tumour cells in the PCL model and 70 million in the ISL model). Simultaneously, the PCL-bearing mice showed clinical signs including weight loss and ataxia.

As Fig. 2a shows, resident CD11b⁺ cells were detected in control brains, corresponding most probably to resident

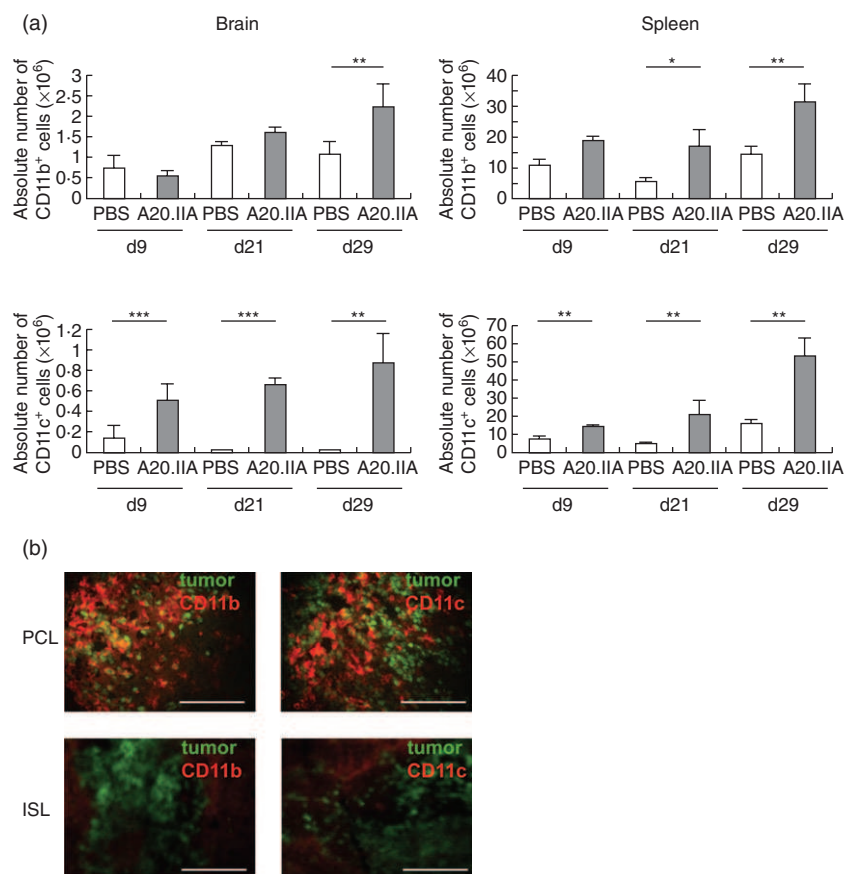


Fig. 2. Involvement of antigen-presenting cells in the anti-tumour response in primary cerebral lymphomas (PCL) and intrasplenic lymphoma (ISL). (a) Histograms illustrating the absolute numbers of CD11b⁺ (upper panels) and of CD11c⁺ (lower panels) antigen-presenting cells during growth of PCL (left panels) and ISL (right panels), with A20.IIA-green fluorescent protein (GFP) cells, compared with phosphate-buffered saline (PBS)-injected animals, as determined by flow cytometric analyses and trypan blue exclusion (two independent experiments, $n = 10$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.0005$. (b) Representative photomicrographs of brain and spleen slices at day 21, stained with phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD11b or anti-CD11c antibodies. GFP-positive tumour cells are green. Bars = 200 μm.

microglial cells present constitutively in the CNS. In the presence of the lymphoma, the number of CD11b⁺ cells (corresponding to microglia and possibly to infiltrating macrophages) increased in the brain; they were first observed on day 21, although they had been visible since day 9 in the spleen (Fig. 2a). As expected, CD11c⁺ dendritic cells were almost undetectable in PBS-injected brains. During tumour growth, however, a large population of dendritic cells was detected in the brain parenchyma, increasing from day 9 (0.5×10^6 cells) to day 29 (0.85×10^6 cells per brain). This increase in the number of dendritic cells was also observed in the ISL model, where the CD11c⁺ population tripled by day 29.

Immunohistochemical staining of the CD11b⁺ and CD11c⁺ cells in the two tumour models revealed that both were located close to the tumour mass (Fig. 2b). They formed a tight network with lymphomatous B cells. In the PCL model, surprisingly, there were nearly as many CD11b⁺ cells as GFP⁺ cells. Moreover, there was only weak CD11b staining in the brain and none for CD11c outside the tumour. The brain parenchyma from PCL mice showed no signs of haemorrhage. In the spleen, interweaving CD11b⁺ and CD11c⁺ cells were less visible and mainly defined circular structures around tumour cells.

During tumour growth, the brain acquires a T cell microenvironment closely mimicking a secondary lymphoid organ with a high proportion of regulatory T cells

We next evaluated the presence of T cells at the tumour site. The absence, as expected, of CD3⁺ T lymphocyte infiltration in brains injected with PBS at any time of analysis showed that the surgical procedure did not create measurable inflammation (Fig. 3a, upper left panel). In contrast, as illustrated in Fig. 3a (lower left panel), CD3⁺ T cells clearly infiltrated the brain after the intrastriatal tumour implantation. These cells were dispersed throughout the tumour mass and at the tumour margins but were not found in the non-tumoral brain parenchyma (see Fig. 3b). T cells in the spleen were much more tightly grouped (Fig. 3b), but it was not possible to discriminate between resident and infiltrating T cells.

Both models contained more CD4⁺ than CD8⁺ T cells at all points during disease progression (Fig. 3c). In the brain, the number of these cells increased slowly over the first 9 days and then rapidly reached a plateau around day 21. Interestingly, infiltration of CD4⁺ T cells into the brain occurred almost immediately after tumour implantation, while that of CD8⁺ T cells took place only after 9 days. Similarly, the absolute number of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in the spleen

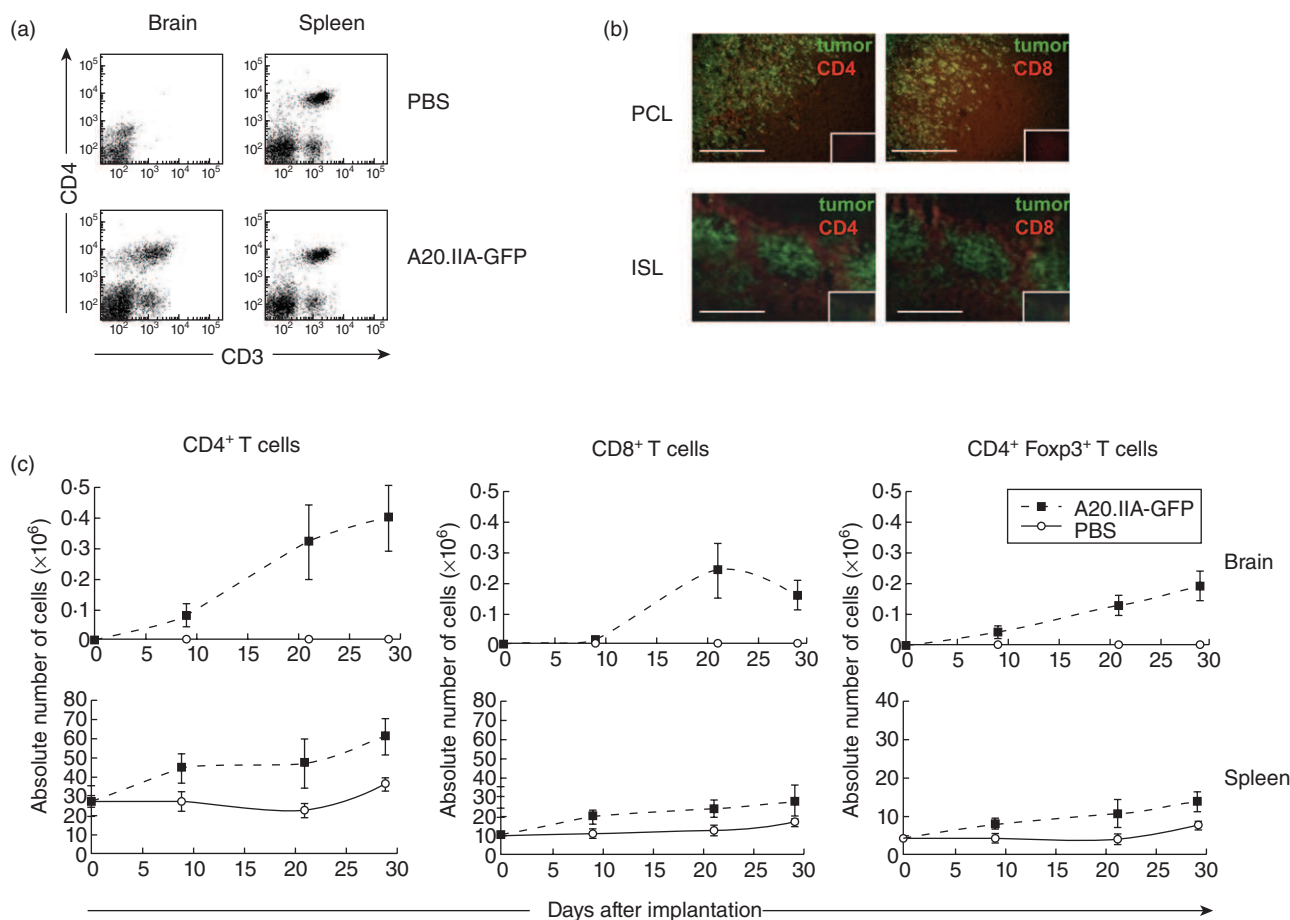


Fig. 3. T cell enhancement in primary cerebral lymphomas (PCL) and intrasplenic lymphoma (ISL). (a) Flow cytometric analysis showing CD3⁺CD4⁺ staining in the PCL and ISL models 21 days after phosphate-buffered saline (PBS) injection or tumour implantation. (b) Immunohistological analyses of PCL and ISL slices showing green fluorescent protein (GFP⁺) tumour cells and CD4⁺ or CD8⁺ T lymphocytes stained in red. Isotypic controls are shown in the small inner boxes for each corresponding photomicrograph. (c) Flow cytometric analysis of the absolute number of CD3⁺CD4⁺ (left), CD3⁺CD8⁺ (middle) or CD3⁺CD4⁺forkhead box P3 (FoxP3⁺) (right) T lymphocytes infiltrating the brain or spleen over time in the PCL and ISL models (two independent experiments, $n = 10$).

increased compared with the controls during tumour growth (Fig. 3c).

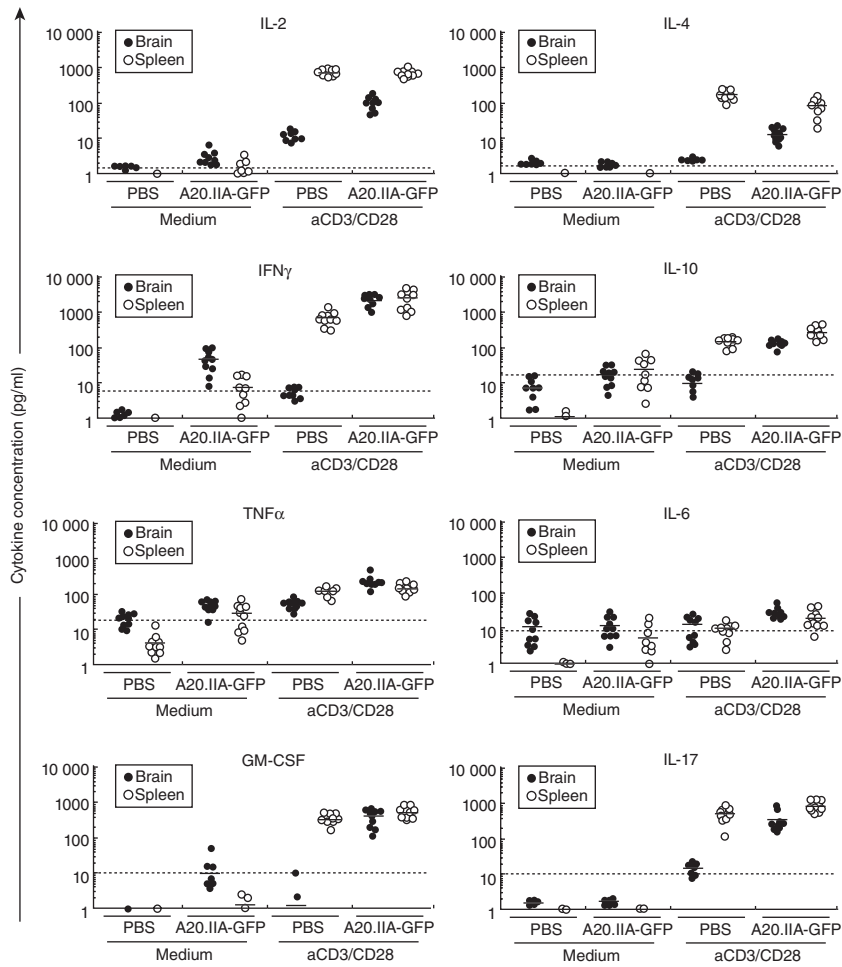
Naturally occurring regulatory T cells (T_{reg}) are defined by their constitutive expression of the transcription factor forkhead box P3 (FoxP3). Soon after tumour implantation into brains, a large infiltration of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells was observed; it increased gradually, in proportion to the tumour burden (Fig. 3c). On day 29, T_{reg} cells accounted for 40% of the CD4⁺ T cell population. In the ISL models, the CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ population on day 29 was twice as high as in the controls. However, it still represented no more than 25% of the CD4⁺ T cell population (Fig. 3c).

Concomitant Th1/Th2/Th17 polarization in intracerebral and intrasplenic B cell lymphomas

Because the absence of an effective anti-tumour response was not due to the absence of major immune cell subsets, even in the brain, we hypothesized that T cell polarization

could be strongly affected. Polarization of the intratumour T lymphocytes was analysed in the PCL and ISL models by measuring cytokine secretion of total cells isolated from the brain or from splenocytes after stimulation with anti-CD3/CD28 antibodies. As Fig. 4 shows, no significant production of Th1-, Th2- or Th17-related cytokines was found in the control cells when PBS was injected without T cell stimulation into the brain or spleen. In the presence of the lymphomatous B cells, only IFN- γ , TNF- α and, to a lesser extent, IL-10 were produced in both PCL and ISL models. As expected, under polyclonal T cell activation by CD3/CD28 stimulation, splenocytes without tumours secreted high levels of Th1-, Th2- and Th17-related cytokines. Conversely, cells isolated from the brain did not express marked levels of any of these, because of the absence of resident T cells. Interestingly, in the presence of tumour cells and after T cell stimulation, IL-2, IFN- γ , GM-CSF, IL-4 and IL-17 were induced in both the PCL and the ISL models. This induction suggests concomitant Th1/Th2/Th17 profiles.

Fig. 4. Similar cytokine profiles in the primary cerebral lymphomas (PCL) and intrasplenic lymphoma (ISL) tumour microenvironments. phosphate-buffered saline (PBS) or A20.IIA-green fluorescent protein (GFP) cells were injected into the brain (black circles) or the spleen (white circles) of adult BALB/c mice. On day 21, cells isolated from the brain or splenocytes were cultivated for 36 h with (aCD3/CD28) or without (medium) anti-CD3/CD28-coated beads, and supernatants were analysed for interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, interferon (IFN)- γ , tumour necrosis factor (TNF)- α , granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-17 expression (two independent experiments, $n = 10$). The dashed horizontal line indicates the level of expression significant for each cytokine, as indicated by the manufacturer.

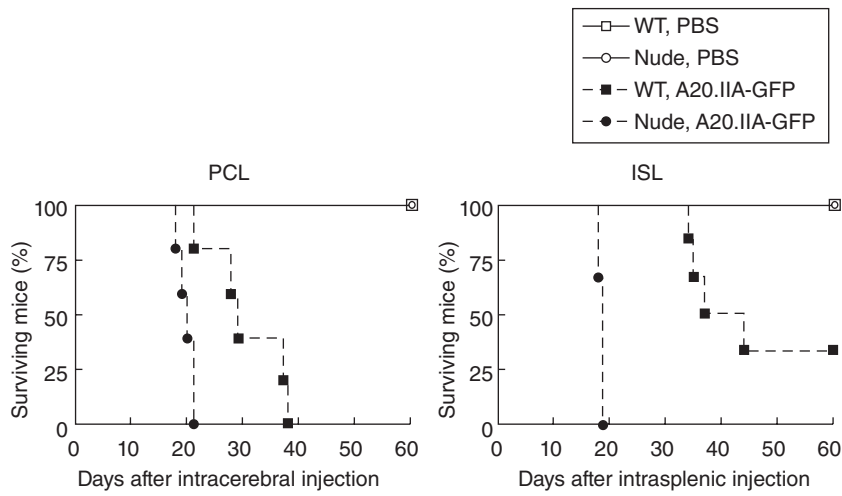


Intracerebral and intrasplenic lymphoma triggers T cell anti-tumour responses

To determine the role of T cells in these models, tumours were implanted in nude and wild-type mice. As shown in

Fig. 5. nude mice that received lymphoma cells intracerebrally died significantly earlier than wild-type mice (median survival time: 20 days *versus* 29 days, respectively; $P = 0.01$). Similarly, nude mice with intrasplenic lymphomas started to die earlier than wild-type mice (day 20 and day 34, respec-

Fig. 5. Primary cerebral lymphomas (PCL) and intrasplenic lymphoma (ISL) trigger T cell immune surveillance. Kaplan–Meier curves showing the survival time of wild-type (squares) or nude (circles) mice that had either phosphate-buffered saline (PBS) (white marks, solid lines) or A20.IIA-green fluorescent protein (GFP) cells (black marks, dashed lines) implanted in the brain (PCL) or in the spleen (ISL) ($n = 6$).



tively; $P = 0.02$). These results demonstrate that T cell anti-tumour responses control survival in mice with developing intracerebral or intrasplenic tumours.

Discussion

The prognosis of tumours growing in immune sanctuaries such as the brain or the eyes is often poor. Their location, and the absence of metastasis towards peripheral sites, make a global analysis of their environment difficult. Animal models can thus be useful to investigate the role of the tissue environment on anti-tumour response. Gliomas are the most frequent aggressive brain tumours, but do not grow in peripheral organs. Lymphomas, on the other hand, provide a good basis for comparison between central and peripheral malignancies as they can grow as a primary tumour in both sites. We therefore compared immune responses developing in the spleen and the brain after implantation of the same lymphoma B cell line.

The absence of resident T lymphocytes and the very few CD11c⁺ dendritic cells detected in the brain parenchyma of control mice injected intracranially with PBS show that the injury caused by the syringe did not interfere with the immune response observed after tumour implantation. CD11b⁺ microglial cells were the only type of resident immune cell. Although the meninges were dissected carefully to remove associated blood vessels, we cannot rule out the possibility that some blood cells were entrapped and were present in our analyses. However, flow cytometry experiments comparing the immune cells present in a normal mouse brain with and without NaCl perfusion showed no significant differences (data not shown). The incidence of the disease after intracerebral tumour growth was 100%. Tumour cells invaded the parenchyma of the right hemisphere and, in some cases, infiltrated the meninges, the ventricular system, or both. Consistent with human data, no GFP-positive cells were found outside the brain, except for a very few cells in the cervical lymph nodes. Indeed, PCNSL is defined as a tumour growing in the confined environment of the CNS, without migration to the periphery. During tumour growth, the number of CD11b⁺ microglia and blood-derived macrophages increased, and these cells invaded the tumour mass. A recent study described the presence of macrophages expressing M2-associated markers, such as Ym1 in a murine model or factor XIIIa in humans [19], in the CNS lymphoma environment. In our PCL model, IL-4 was produced by activated T cells from tumour-bearing animals; it may play a role in the differentiation of microglial/macrophage cells into M2-type cells. In mice with intracerebral tumours, massive infiltration of CD11c⁺ cells into the brain was observed. These cerebral dendritic cells may derive from the blood, the meninges, the choroid plexus or from microglia by local differentiation [20–22]. In tumour masses, where blood vessels are disorganized, at least some of the CD11c⁺ cells must be blood-derived. Consistent

with this hypothesis, histological analyses showed that CD11c⁺ cells were present only in the tumour environment and not in the peritumoural brain tissue. In the spleen, discrimination between recruited and resident immune cells is difficult. However, the total number of CD11c⁺ cells increased. The study of APC subpopulations in cerebral lymphoma and their potential involvement in tumour growth requires further investigation.

CD4⁺ T cells were detected from day 9 and continued to infiltrate the brain parenchyma throughout the disease course, as shown previously for an intraocular lymphoma model [18]. The number of splenic T cells doubled during tumour growth in the ISL model. Interestingly, recruitment of CD3⁺CD8⁺ cells in the brain took place later than that of CD4⁺ T cells; consistent with a previous study that used glioma cells, this was not the case in the spleen [17]. Moreover, T cells were not organized in tertiary lymphoid structures, as described for lung tumours [23].

In both the PCL and ISL models, a clear Th1 profile was observed, with secretion of IL-2, IFN- γ and GM-CSF after T lymphocyte activation, even though cytokines were not detectable without estimation. Only a modest increase in Th2 cytokine levels was noticed. T cells in the tumour environment thus appear to be at least partially inhibited. Regulatory T cells were indeed present and represented an important proportion of total CD4⁺ T cells in our two tumour models, especially in the brain. This finding is in accordance with the recent work from Biollaz and colleagues [24], which showed preferential enrichment of T_{regs} in the brain *versus* subcutaneous location during glioma growth.

It was demonstrated recently that T_{regs} play a fundamental role in B lymphoma immune escape [25,26] and that follicular [27] and non-Hodgkin lymphomas [28] allow the phenocconversion of conventional T lymphocytes into induced T_{regs}. Our results, which show that up to 40% of T cells were CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ in the brain, are also suggestive of phenocconversion. This high level of recruitment of CD25⁺FoxP3⁺ T cells could conceivably be due to local secretion of CCL17 and CCL22, as observed in lymphomatous meningitis [29]. These possibilities are under investigation in intracerebral and in intraocular B cell lymphoma models.

We found high levels of IL-17 in our two tumour models, in addition to Th1 and T_{reg} cells. IL-17 and Th17 cells have been found in human B cell lymphomas although with great heterogeneity between patients [30], but IL-17 has not been described previously in a brain tumour model. Brain is a permissive tissue for Th17 [31]. However, the role of Th17 cells in anti-tumour immunity is still unclear. It has notably been described as a transient population of cells co-expressing transcription factors FoxP3 and ROR γ t, able to secrete IL-17, and endowed with either regulatory or proinflammatory functions, depending on the environment [32,33]. A recent study showed that B cell lymphomas can skew the balance towards the regulatory profile of this population [30].

Our results suggest that the cellular components of the immune environment evolve similarly during tumour growth in the brain and the spleen. The CNS has long been considered a site of immune privilege. Although it is now accepted that immune responses can occur there, it is equally accepted that the CNS is endowed with a special immune status. The quiescent brain is protected by the blood–brain barrier, the absence of a conventional lymphatic system, little to no MHC expression, its lack of dendritic cells and the constitutive secretion of immune-suppressive molecules. We hypothesize that this status is not altered at the beginning of tumour growth. In a second step, however, glial cells (microglial cells and astrocytes) may be activated and thus able to activate local endothelial cells. As a consequence, the blood–brain barrier may tend to permit T lymphocytes expressing the appropriate adhesion molecules to enter the brain. This hypothesis explains how CD4⁺ T cells were clearly detected at day 9 in the PCL model, whereas CD8⁺ T cells were not. These infiltrating cells are essential in ensuring immune surveillance of the brain, as our results with nude mice show. In a third step, when the tumour is larger, angiogenesis must also be considered. New vessels do not reproduce the blood–brain barrier structure, and blood cells can easily enter the brain. Accordingly, it is not surprising to observe an immune environment ever more similar in both PCL and ISL models by day 29. It also suggests that the tumour exerts a powerful stimulus to attract immune cells despite very different initial environments.

Organ specificities can, however, be observed during the course of B cell lymphoma in the brain *versus* the spleen: delayed entry of T cells, due probably to the blood–brain barrier, and a higher proportion of regulatory T cells. The huge intratumoural immune infiltrate lends support to therapeutic strategies based on immunostimulation of anti-tumour responses for the treatment of CNS lymphomas. Thus, systemic approaches should be translated in light of the specificities of the relevant tissue and, particularly, of T cell recruitment in the CNS parenchyma.

Acknowledgements

The authors thank Christophe Klein for confocal microscopy. Flow cytometry and confocal microscopy acquisitions were performed at the cellular imaging and cytometry platform (CICC, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris F-75006, France). We are grateful to Jessica A. Boland and Dr Zsuzsanna Fabry for their careful reading of the manuscript. This work was supported by the Institut National du Cancer (grants RC013-C06N631-2005 and C06N748-2006), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the University Pierre and Marie Curie, the University Paris-Descartes and the Association pour la Recherche contre le Cancer. S. D. and C. D. were recipients of grants from the Institut National du Cancer.

Disclosure

The authors declare they have no financial conflicts of interest.

References

- 1 Soussain C, Hoang-Xuan K. Primary central nervous system lymphoma: an update. *Curr Opin Oncol* 2009; **21**:550–8.
- 2 Lin CH, Kuo KT, Chuang SS *et al.* Comparison of the expression and prognostic significance of differentiation markers between diffuse large B-cell lymphoma of central nervous system origin and peripheral nodal origin. *Clin Cancer Res* 2006; **12**:1152–6.
- 3 Tun HW, Personett D, Baskerville KA *et al.* Pathway analysis of primary central nervous system lymphoma. *Blood* 2008; **111**:3200–10.
- 4 Camilleri-Broet S, Criniere E, Broet P *et al.* A uniform activated B-cell-like immunophenotype might explain the poor prognosis of primary central nervous system lymphomas: analysis of 83 cases. *Blood* 2006; **107**:190–6.
- 5 Montesinos-Rongen M, Brunn A, Bentink S *et al.* Gene expression profiling suggests primary central nervous system lymphomas to be derived from a late germinal center B cell. *Leukemia* 2008; **22**:400–5.
- 6 Jahnke K, Thiel E. Treatment options for central nervous system lymphomas in immunocompetent patients. *Expert Rev Neurother* 2009; **9**:1497–509.
- 7 Schultz CJ, Bovi J. Current management of primary central nervous system lymphoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; **76**:666–78.
- 8 Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol* 2007; **28**:12–18.
- 9 Medawar PB. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol* 1948; **29**:58–69.
- 10 Kaur G, Han SJ, Yang I, Crane C. Microglia and central nervous system immunity. *Neurosurg Clin N Am* 2010; **21**:43–51.
- 11 Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. *Science* 2005; **308**:1314–18.
- 12 Aloisi F. Immune function of microglia. *Glia* 2001; **36**:165–79.
- 13 Badie B, Bartley B, Schartner J. Differential expression of MHC class II and B7 costimulatory molecules by microglia in rodent gliomas. *J Neuroimmunol* 2002; **133**:39–45.
- 14 Schartner JM, Hagar AR, Van Handel M, Zhang L, Nadkarni N, Badie B. Impaired capacity for upregulation of MHC class II in tumor-associated microglia. *Glia* 2005; **51**:279–85.
- 15 Yang I, Han SJ, Kaur G, Crane C, Parsa AT. The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *J Clin Neurosci* 2010; **17**:6–10.
- 16 Prins RM, Shu CJ, Radu CG *et al.* Anti-tumor activity and trafficking of self, tumor-specific T cells against tumors located in the brain. *Cancer Immunol Immunother* 2008; **57**:1279–89.
- 17 Proescholdt MA, Merrill MJ, Ikejiri B *et al.* Site-specific immune response to implanted gliomas. *J Neurosurg* 2001; **95**:1012–19.
- 18 Touitou V, Daussy C, Bodaghi B *et al.* Impaired th1/tc1 cytokine production of tumor-infiltrating lymphocytes in a model of primary intraocular B-cell lymphoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; **48**:3223–9.

- 19 Kadoch C, Dinca EB, Voicu R *et al*. Pathologic correlates of primary central nervous system lymphoma defined in an orthotopic xenograft model. *Clin Cancer Res* 2009; **15**:1989–97.
- 20 Fischer HG, Reichmann G. Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J Immunol* 2001; **166**:2717–26.
- 21 Hatterer E, Touret M, Belin MF, Honnorat J, Nataf S. Cerebrospinal fluid dendritic cells infiltrate the brain parenchyma and target the cervical lymph nodes under neuroinflammatory conditions. *PLoS ONE* 2008; **3**:e3321.
- 22 Nataf S, Strazielle N, Hatterer E, Mouchiroud G, Belin MF, Ghersi-Egea JF. Rat choroid plexuses contain myeloid progenitors capable of differentiation toward macrophage or dendritic cell phenotypes. *Glia* 2006; **54**:160–71.
- 23 Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C *et al*. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol* 2008; **26**:4410–17.
- 24 Biollaz G, Bernasconi L, Cretton C *et al*. Site-specific anti-tumor immunity: differences in DC function, TGF-beta production and numbers of intratumoral Foxp3+ Treg. *Eur J Immunol* 2009; **39**:1323–33.
- 25 Curti A, Pandolfi S, Valzasina B *et al*. Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25- into CD25+ T regulatory cells. *Blood* 2007; **109**:2871–7.
- 26 Elpek KG, Lacelle C, Singh NP, Yolcu ES, Shirwan H. CD4+CD25+ T regulatory cells dominate multiple immune evasion mechanisms in early but not late phases of tumor development in a B cell lymphoma model. *J Immunol* 2007; **178**:6840–8.
- 27 Ai WZ, Hou JZ, Zeiser R, Czerwinski D, Negrin RS, Levy R. Follicular lymphoma B cells induce the conversion of conventional CD4+ T cells to T-regulatory cells. *Int J Cancer* 2009; **124**:239–44.
- 28 Mittal S, Marshall NA, Duncan L, Culligan DJ, Barker RN, Vickers MA. Local and systemic induction of CD4+CD25+ regulatory T-cell population by non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2008; **111**:5359–70.
- 29 Haas J, Schopp L, Storch-Hagenlocher B *et al*. Specific recruitment of regulatory T cells into the CSF in lymphomatous and carcinomatous meningitis. *Blood* 2008; **111**:761–6.
- 30 Yang ZZ, Novak AJ, Ziesmer SC, Witzig TE, Ansell SM. Malignant B cells skew the balance of regulatory T cells and TH17 cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 2009; **69**:5522–30.
- 31 Ifergan I, Kebir H, Bernard M *et al*. The blood–brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells. *Brain* 2008; **131**:785–99.
- 32 Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 2009; **30**:646–55.
- 33 Zhou L, Lopes JE, Chong MM *et al*. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature* 2008; **453**:236–40.

importante dans le cerveau tumoral comparée au cerveau injecté par du PBS (phosphate buffer saline). Elle est lente, voire inexistante pour les CD8⁺, pendant les 9 premiers jours puis progresse rapidement jusqu'à un plateau vers J21.

En termes de CPA, les 2 micro-environnements, nodal et extranodal, sont comparables dans la cinétique d'apparition/augmentation de nombre : d'abord les cellules CD11b⁺ puis les CD11c⁺. En termes de lymphocytes, leurs nombres augmentent dans les 2 cas. Une **caractéristique commune est la proportion 2 fois plus importante des lymphocytes T CD4⁺ comparée à celle des lymphocytes T CD8⁺**. Il est à noter que des souris Nude, dépourvues de lymphocytes T, meurent plus rapidement de la tumeur que des souris immuno-compétentes dans les 2 conditions. Le groupe de souris immuno-compétentes ayant une tumeur en intra-splénique a 20% de survie à 60 jours alors que la survie des souris portant un lymphome intra-cérébral ne dépasse pas 40 jours.

Du fait de ces traits particuliers, de la description de l'infiltrat de lymphocytes T CD4⁺ comme bon pronostic, et du caractère contradictoire d'un développement exponentiel de la tumeur dans les 2 localisations, nous nous sommes interrogés sur 2 éventualités : un problème dans la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ du micro-environnement et/ou la présence de lymphocytes Treg. Nous avons montré que **les profils Th1, Th2 et Th17 sont présents dans les 2 localisations** bien que ces cellules ne relarguent pas spontanément leurs cytokines *ex vivo*. Les **Treg** représentent **25% des lymphocytes T CD4⁺ dans la rate tumorale**. Cependant, cette proportion est encore plus forte **dans le cerveau tumoral : 40% des lymphocytes T CD4⁺**.

b. Résultats non publiés 1

Un autre modèle de lymphome B murin, développé au laboratoire par le Dr Valérie Touitou, permet l'étude du micro-environnement tumoral de type « **DLBCL extranodal** » au sein du SNC, il s'agit du modèle de lymphome intraoculaire primitif (PIOL). Il a déjà été montré que des **cellules de type macrophagique (F4/80⁺) étaient présentes dans l'œil**, ainsi qu'un infiltrat lymphocytaire T (Touitou et al., 2007). Cet infiltrat était, lui aussi, 2 fois plus important pour les lymphocytes T CD4⁺ comparé à celui des lymphocytes T CD8⁺. **Le profil Th1, mais pas le profil Th2, a été mis en évidence** au sein de cet environnement.

J'ai pu démontrer depuis que l'infiltration des lymphocytes Treg CD4⁺Foxp3⁺ dans l'œil PIOL suit la même cinétique exponentielle que celle du PCL (Figure 12A, matériel et méthodes de l'Article 1). De plus, les Treg représentent, dans ce modèle, jusqu'à 47,0% des cellules T CD4⁺ (Figure 12B).

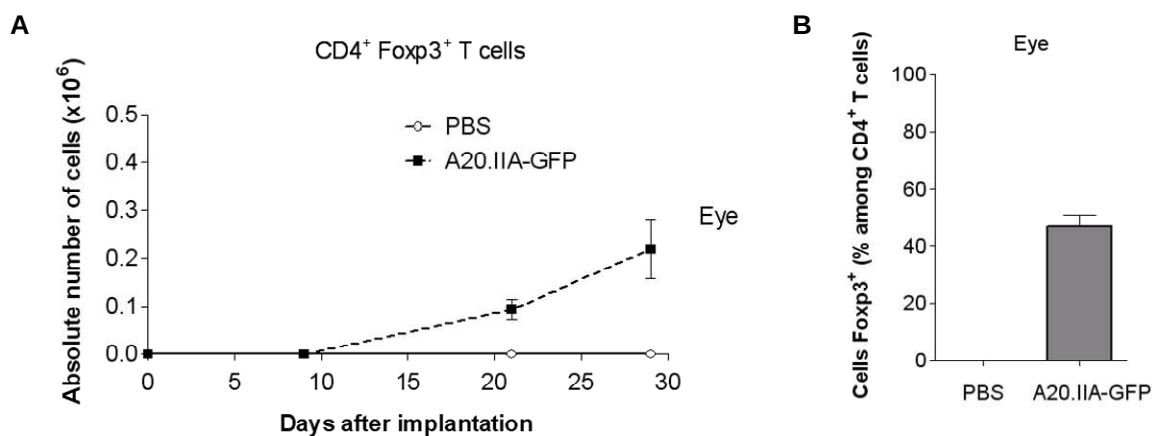


Figure 12. Infiltration des lymphocytes CD4⁺Foxp3⁺ dans les lymphomes intraoculaire primitifs (PIOL). A) Analyse par cytométrie en flux du nombre absolu de lymphocytes CD4⁺ Foxp3⁺ infiltrant l'œil en fonction du temps. B) Proportion de lymphocytes CD4⁺ Foxp3⁺ infiltrant l'œil à j29. Résultats de 2 expériences indépendantes (n=12).

II. Présence et rôle des Th17 et de leurs cytokines dans le PIOL

a. Article 2

Yang a montré que le microenvironnement des DLBCL favorise les Treg au dépend des Th17. Les Th17 sont des lymphocytes récemment décrits pour leur rôle pro-inflammatoire dans de nombreuses maladies auto-immunes. Leur rôle dans les tumeurs est encore controversé. Nous avons précédemment montré que le profil cytokinique Th17 était présent dans le micro-environnement des lymphomes B de type nodal (ISL) et extranodal (PCL). Cependant, ce profil est partiellement inhibé *in vivo*. J'ai alors cherché à déterminer si les cellules Th17 (lymphocytes CD3⁺CD4⁺IL-17⁺) étaient présentes dans le micro-environnement de lymphomes B et quel était leur rôle. J'ai, pour cela, choisi le **modèle murin du PIOL** car l'œil (comme le cerveau) a la particularité de ne contenir que très peu de LT et l'œil est facile d'accès. De surcroît, le PIOL chez l'homme est une maladie très agressive avec un pronostic vital très mauvais : seulement 5% de survie 5 ans après le diagnostic.

Les Th17 sont décrits comme pouvant sécréter de l'IL-21 et de l'IL-22 en plus de l'IL-17. Je me suis tout d'abord intéressée à l'étude des ARN messagers de ces cytokines. L'œil étant un organe immunologiquement privilégié, les lymphocytes T y sont très rares. Il était logique de ne pas retrouver ces messagers dans l'œil de souris à l'état physiologique. C'est le cas pour l'IL-17 et l'IL-22. Cependant, une expression ectopique de l'IL-21 y est détectée. Dix-neufs jours après l'injection de cellules lymphomateuses B, les messagers d'IL-17 sont induits dans l'œil et ceux d'IL-21 augmentés. Ceux de l'IL-22 ne sont toujours pas exprimés (Article 2 Figure 1). Ces résultats ont été confirmés par détection des cytokines intra-cellulaires par cytométrie en flux. **Des cellules CD3⁺CD4⁺ produisant de l'IL-17 et, de manière concomitante, de l'IL-21 ont été mises en évidence** (Article 2, Figure 2). Ces cellules ne produisent pas d'IL-22 et sont en proportion égale dans l'œil et dans les ganglions lymphatiques des souris porteuses de PIOL.

Par la suite, j'ai souhaité mettre en parallèle le développement tumoral 19 jours après l'inoculation de cellules lymphomateuses et le potentiel sécrétoire en IL-17 des lymphocytes T infiltrant l'œil. J'ai alors montré que les souris ayant les tumeurs les plus développées (groupe au dessus de la médiane, égale à 30% de cellules tumorales par rapport aux cellules totales de l'œil), ont une capacité de sécrétion d'IL-17 plus faible que le groupe de souris dont les cellules tumorales n'excèdent pas les 30% (Article 2, Figure 3). J'ai, de ce fait, émis l'hypothèse d'un **rôle anti-tumoral de l'IL-17**.

J'ai alors testé *in vitro* l'action de l'IL-17 sur les cellules tumorales. **L'IL-17 n'a pas d'impact direct sur la prolifération des cellules tumorales A20.IIA-GFP** qui possèdent pourtant la chaîne IL-17RA (Article 2, Figure 4). Cependant, **l'IL-21**, une autre cytokine produite par les Th17 infiltrant l'œil, **exerce une action anti-prolifératrice directe sur les cellules tumorales A20.IIA-GFP *in vitro*** (Article 2, Figure 5). En effet, ces cellules qui possèdent la chaîne IL-21R, incorporent moins de thymidine radioactive lorsqu'elles sont cultivées en présence d'IL-21 à partir d'une concentration de 100ng/ml. L'IL-21 induit une diminution du nombre de cellules en phase G2/M et une augmentation des cellules mortes. L'impact de l'IL-21 a aussi été vérifié sur la lignée cellulaire VAL, issue d'un DLBCL humain.

Th17 Cells Are Involved in the Local Control of Tumor Progression in Primary Intraocular Lymphoma

Claire Galand^{1,2,3}, Sabrina Donnou^{1,2,3}, Lucile Crozet^{1,2,3}, Séverine Brunet^{1,2,3}, Valérie Toutou^{1,2,3}, Hanane Ouakrim^{1,2,3}, Wolf Herman Fridman^{1,2,3}, Catherine Sautès-Fridman^{1,2,3}, Sylvain Fisson^{1,2,3*}

1 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR5872, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France, **2** Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR5872, Paris, France, **3** Université Paris Descartes, UMR5872, Paris, France

Abstract

Background: Th17 cells play an important role in the pathogenesis of many autoimmune diseases, but despite some reports of their antitumor properties, too little is known about their presence and role in cancers. Specifically, knowledge is sparse about the relation of Th17 to lymphoma microenvironments and, more particularly, to the microenvironment of primary intraocular B-cell lymphoma (PIOL), an aggressive lymphoma with a poor prognosis.

Methods and Principal Findings: In this work, we investigated the presence of Th17 cells and their related cytokines in a syngeneic model of PIOL, a subtype of non-Hodgkin lymphoma. The very small number of lymphocytes trafficking in normal eyes, which represent a low background as compared to tumor-bearing eyes, allows us to develop the present model to characterize the different lymphocyte subsets present when a tumor is developing. IL-21 mRNA was expressed concomitantly with IL-17 mRNA in tumor-bearing eyes and intracellular expression of IL-17A and IL-21 in infiltrating CD4⁺ T lymphocytes. Interestingly, IL-17A production by T cells was negatively correlated with tumor burden. We also showed that IL-21 but not IL-17 inhibits tumor cell proliferation in vitro.

Conclusions: These data demonstrate that IL-17A and IL-21-producing CD4⁺ T cells, referred as Th17 cells, infiltrate this tumor locally and suggest that Th17-related cytokines may counteract tumor progression via IL-21 production. Thus, Th17 cells or their related cytokines could be considered to be a new therapeutic approach for non-Hodgkin B-cell lymphomas, particularly those with an ocular localization.

Citation: Galand C, Donnou S, Crozet L, Brunet S, Toutou V, et al. (2011) Th17 Cells Are Involved in the Local Control of Tumor Progression in Primary Intraocular Lymphoma. PLoS ONE 6(9): e24622. doi:10.1371/journal.pone.0024622

Editor: Jean Kanellopoulos, University Paris Sud, France

Received: July 1, 2011; **Accepted:** August 14, 2011; **Published:** September 20, 2011

Copyright: © 2011 Galand et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Institut National du Cancer (Grants RC013-C06N631-2005 and C06N748-2006), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the University Pierre et Marie Curie, the University Paris-Descartes and the Association pour la Recherche contre le Cancer. SD was recipient of grants from the Institut National du Cancer. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: sylvain.fisson@crc.jussieu.fr

Introduction

Non-Hodgkin's lymphoma (NHL) is the major subtype of lymphoma and accounts for 3.4% of all cancer deaths [1]. Although it generally occurs in secondary lymphoid structures, extranodal growth can be observed, as in primary intraocular B-cell lymphoma (PIOL), an aggressive disease with a five-year survival rate after diagnosis of only 5% [2]. Too little is known about the role of the immune system in the progression of this disease. Our team developed a murine model to study its pathophysiological mechanisms [3]. Only few errant lymphocytes penetrate the eye in normal circumstances, it represents a small number of T cells. This means that the present model makes it possible to monitor tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), especially useful because the presence of immune cells in the B-cell lymphoma microenvironment has been reported to be a good prognostic indicator for patient survival [4]. Activated CD4⁺ T cells might be a major participant in antitumor activity in this cancer [5]. Moreover increasing evidence suggests that infiltration of IL-17-producing CD4⁺ T cells regulates tumor progression [6–8]. These lymphocytes, called Th17 cells, usually produce IL-17, IL-21, and/or IL-22 [9], and help to clear pathogens

[10]. They can also invade the eye in autoimmune diseases, such as autoimmune uveitis [11,12]. Here we show that Th17 cells can be detected locally in the PIOL microenvironment. Additionally, IL-17 production is negatively associated with tumor burden, increasing as tumor burden decreases, and vice versa. Only IL-21, however, and not IL-17, has a direct antiproliferative effect on the tumor. Thus, modulation of Th17 cells or administration of IL-21 alone could be considered as a new therapeutic approach for non-Hodgkin B-cell lymphomas, particularly those with an ocular localization.

Materials and Methods

Mice

Six to 8-week-old female BALB/c ByJ mice (H2^d) were purchased from Charles River Laboratories. Mice were provided with sterile food and water *ad libitum* and kept on a 12-hour light-dark cycle.

Cells

A20.IIA (also called IIA1.6) is an FcγR-negative clone from the A20-2J murine lymphoma B-cell line [13]. A20.IIA cells were

transfected with the GFP gene as previously described [3] and are hereafter referred to as A20.IIA-GFP cells. They were maintained at 37°C, 5% CO₂ in complete Roswell Park Memorial Institute 1640 medium Glutamax plus (RPMI; Gibco-Invitrogen, France) containing 10% fetal calf serum (FCS; PAA laboratories, Germany), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (both from Eurobio, France), 10 mM sodium pyruvate (Gibco-Invitrogen), 50 µM 2-mercaptoethanol (Gibco-Invitrogen), and 0.5 mg/ml neomycin (G418; Gibco-Invitrogen). VAL is a human cell line derived from a diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) belonging to the NHL subtype and was cultured in the same conditions as A20.IIA-GFP, but without neomycin.

Tumor implantation

Mice were first anesthetized by an intraperitoneal injection of 3.2 mg of ketamine (Virbac, France) and 0.16 mg of xylazine (Rompun 2%; Bayer Healthcare). A20.IIA-GFP (1.10^4) cells in 2 µL phosphate buffer saline 1 × pH 7.4 (PBS) were injected in aseptic conditions into the posterior chamber of the right eye with a 32-gauge needle attached to a syringe (Hamilton, Bonaduz AG). The same procedure was followed for control mice injected with PBS. Lacrinorm 2% (Bauch&Lomb) drops were instilled after injection. All animal studies were performed 19 days after tumor inoculation, conformed with European Union guidelines, and were approved by the Charles Darwin Ethics Committee in

Animal Experiment, Paris, France (Permit Number: p3/2009/004).

PCR

RNA from frozen enucleated eyes and from A20.IIA-GFP cells was extracted with an RNeasy Mini kit (Qiagen) in accordance with the supplier's instructions. The concentration in each sample was evaluated with a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies), and total RNA was reverse-transcribed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems), in accordance with the manufacturer's instructions. Sequences for primers (Eurofins MWG operon, Germany) were as follows: HPRT forward: GGCCACAGGACTAGAACACC, HPRT reverse: AC-AGGCCAGACTTTGTTGGA; GFP forward: ATGAAGATC-GAGTGCCGC, GFP reverse: CACCACGAAGCTGTAGTA; IL-17A forward: TCCAGAAGGCCCTCAGACTA, IL-17A reverse: AGCATCTTCTCGAC-CCTGAA; IL-21 forward: GG-GAATCTTCTCGGATCCTC, IL-21 reverse: AGGAGGG-GAGGAAAGAAACA; IL-22 forward: GTCAACCGCACCTT-TATGCT, IL-22 reverse: CATGTAGGGCTGGAACCTGT; IL-17RA forward: TGCCTGTGGCACTGAAGTAG, IL-17RA reverse: TTCATGGCTGCAGTGAAAAG; and IL-21R forward: ATGCGCTTGTCTCAATTCCT, IL-21R reverse: CACGTA-GTTGGAGGGTTCGT. Primers were designed with the Primer3 website to amplify the cDNA fragments, that represent mature

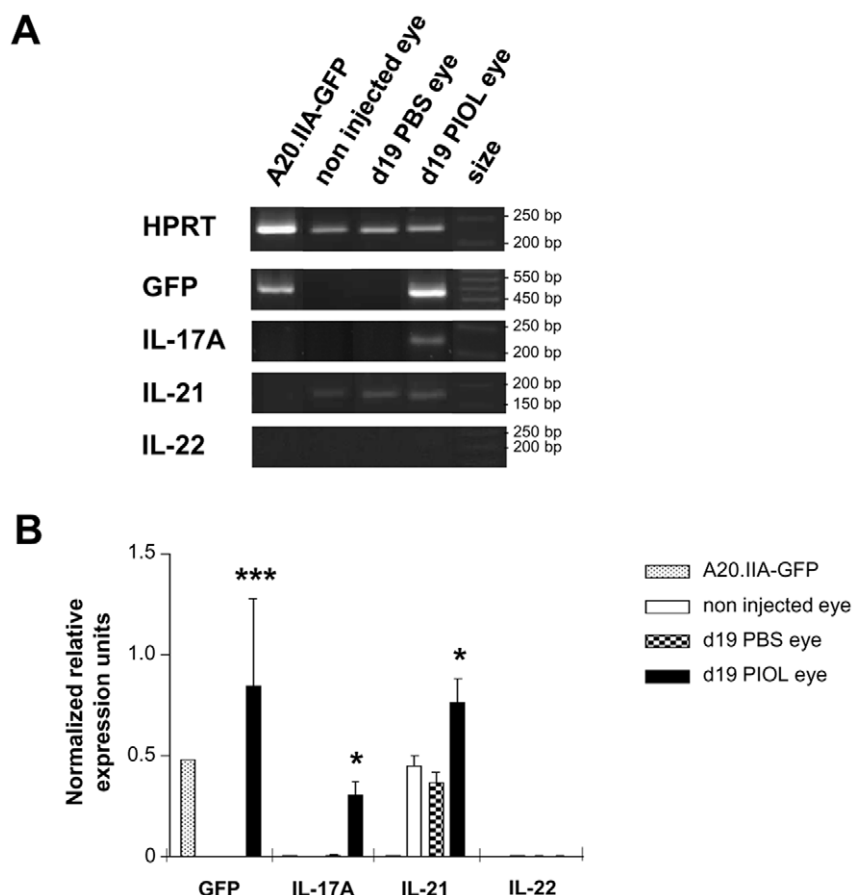


Figure 1. Th17-related cytokine transcripts in PIOL. (A, B) A20.IIA-GFP cells (1×10^4) were inoculated into BALB/c mice on day 0. The mice were sacrificed on day 19. Analysis of HPRT, GFP, IL-17A, IL-21 and IL-22 mRNA expression by RT-PCR of uninjected eyes, PBS-injected eyes, PIOL eyes, and A20.IIA-GFP cells. (A) Representative gel migration from 4 different mice. (B) Densitometry analysis of the gel migration showing mean data from the 4 mice, representative of 2 different experiments. Each data is normalized to HPRT expression. Statistical analyses (Mann-Whitney tests) compare results from d19 PIOL eyes and d19 PBS eyes (*, $p < .05$). Error bars represent SEM.
doi:10.1371/journal.pone.0024622.g001

mRNA transcripts, of 220 bp for HPRT, 495 bp for GFP, 239 bp for IL-17A, 179 bp for IL-21, 189 bp for IL-22, 243 bp for IL-17RA, and 201 bp for IL-21R. Amplifications were conducted for 35 cycles on 40 (HPRT, GFP), 100 (IL-17R, IL-21R) or 120 ng cDNA. PCR products were separated and visualized on 1% agarose gel stained with ethidium bromide. The relative band intensity was determined with ImageJ software and the GFP, IL-17A, IL-21, and IL-22 bands were normalized to HPRT.

Flow cytometry

Eyes were dissected in RPMI medium, digested with 0.1 mg/ml DNase I (Roche Diagnostics, Meylan, France), and 1.67 Wünsch U/ml Liberase (Roche) at 37°C for 30 minutes, filtered and rinsed in PBS with 2 mM EDTA and 2% FCS. Cells were pre-incubated with 2.4G2 mAb (7 µg/ml) to block nonspecific binding to Fc receptors and then stained with the following mAbs: allophycocyanin-alexa fluor750 (APC-AF750)-labeled anti-CD3 (17A2, eBioscience), phycoerythrin-Texas red (PE-TR)-labeled anti-CD4 (RM4-5, Caltag), PE-labeled anti-CD19 (eBio1D3, eBioscience), AF647-labeled anti-IFNγ (XMG1.2, BD Pharmingen), AF700-labeled anti-IL-17A (TC11-18H10.1, Biolegend), biotinylated anti-IL-21 (polyclonal, R&D), or AF647-labeled rat IgG1 (BD Pharmingen), and AF700-labeled rat IgG1 (Biolegend) isotypic control mAb. The biotinylated mAbs were revealed by PE-cyanine5.5 streptavidin (eBioscience). For intracellular cytokine staining, cells were restimulated with phorbol myristate acetate (25 ng/ml, Sigma) and ionomycin (5 µg/ml, Alexis Biochemicals) for 4 hours in the presence of monensin (6.7 µM, Sigma) for the last 2 hours. After cell surface staining, intracellular staining was performed with the eBioscience kit and protocol (Foxp3 Staining Buffer Set). Cells

were acquired on an LSR II cytometer and analyzed with Diva software (BD Biosciences).

Cell cycle analysis

A20.IIA-GFP cells were cultured in the presence of 500 ng/ml murine IL-21. After 72 hours, cells were harvested, washed in cold PBS, and fixed with 2 ml of 70% cold ethanol in PBS for 2 hours at 4°C. After centrifugation, the supernatant was removed, and the pellet was rinsed with 0.5% PBS Tween and incubated with 50 µg RNAse A (Sigma-Aldrich) plus 50 µg propidium iodide (BD Bioscience) in PBS. Propidium iodide staining was determined with the LSR II cytometer.

Cytokine release assay

Ocular cells (10^5) were stimulated by beads coated with anti-CD3/CD28 monoclonal antibodies (Dynabeads, Dynal Biotech, Compiègne, France), as recommended by the manufacturer. To detect IL-17, the supernatants collected after 36 h were subjected to cytometric bead array analysis (CBA) in accordance with the manufacturer's instructions (functional beads, BD Biosciences; TC11-8H4 mAb anti-IL-17, Beckman Coulter; TC11-18H10 mAb PE-labeled anti-IL-17).

Proliferation assay

A20.IIA-GFP cells (10^4) were cultured in complete RPMI medium in 96-well plates in the presence or absence of a range of IL-17A (R&D Systems) or IL-21 (R&D Systems) concentrations (500, 100, 10, 1, 0.1 ng/ml) for 24, 48, or 72 hours. [3 H] Thymidine (GE Healthcare) was added for the last 4 h of culture, and thymidine incorporation was assessed with a β -plate

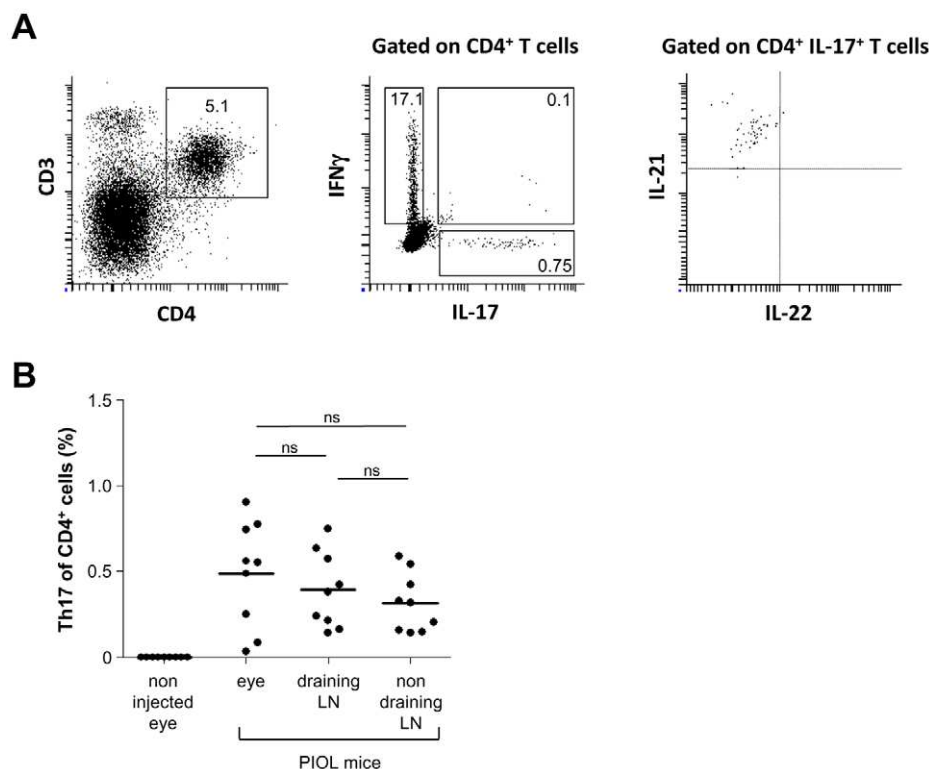


Figure 2. Th17 occurrence in PIOL. (A, B) A20.IIA-GFP cells (1×10^4) were inoculated into BALB/c mice at day 0; the mice were sacrificed on d19. (A) Representative Th17 cell staining (gated on CD4⁺IL-17⁺IL-21⁺ cells) analyzed by flow cytometry. (B) Th17 as a proportion of CD4⁺ T cells. The graph shows each data point from 10 mice. Data are representative of at least two independent experiments. Error bars represent SEM. doi:10.1371/journal.pone.0024622.g002

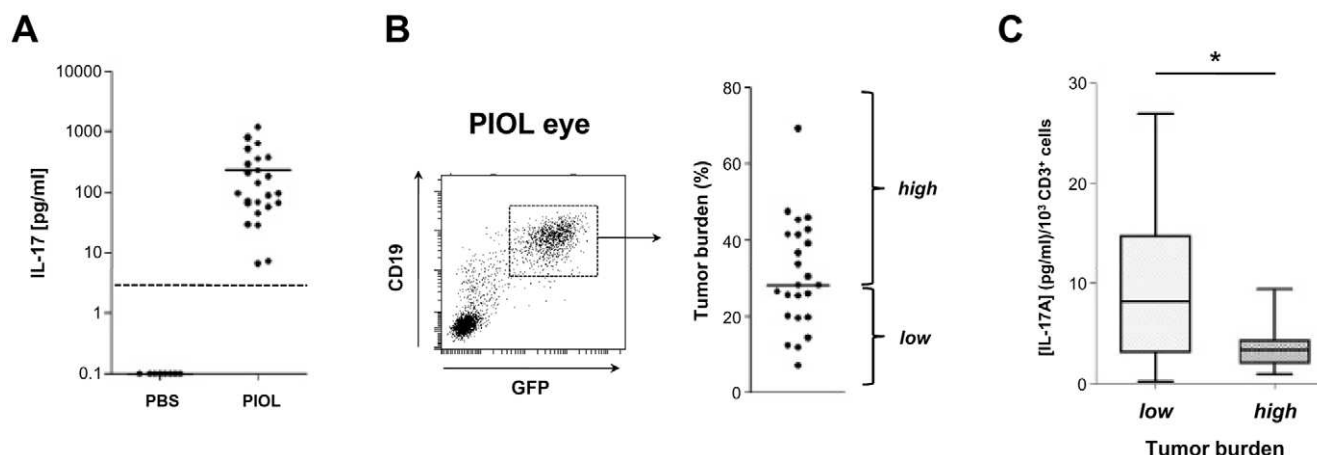


Figure 3. IL-17 secretion vs tumor progression in PIOL. (A) Ocular cells (10^4 ; obtained from PBS- or A20.IIA-GFP-injected eyes) were stimulated in vitro with anti-CD3 and -CD28 microbeads. After 36 hours, culture supernatants were assayed for IL-17 secretion with a cytometric bead assay. Each data point corresponds to the result in an individual eye ($n=10$) and the horizontal black bars symbolize the mean of the respective results. Dashed lines: baseline of detection for IL-17. Data are compiled from two independent experiments. (B) Left, representative tumor cell staining (gated on CD19⁺GFP⁺ cells) analyzed by flow cytometry; right, proportion of tumor cells among all live ocular cells. Low/high tumor burden cut-off is the median (horizontal bar) of a 24 mice group. (C) Correlation between tumor burden and in vitro IL-17 secretion of T cells from PIOL eyes. IL-17 secretion is normalized to the number of CD3⁺ cells for each eye. Comparison used the Student t test (*, $p<.05$). doi:10.1371/journal.pone.0024622.g003

scintillation counter (Microbeta, Perkin Elmer). We used a purified anti-IL-21 antibody (Goat IgG, R&D) to neutralize murine IL-21.

Statistical analysis

Comparisons were tested with Student's t-test and the Mann-Whitney test, with GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). P values $<.05$ were considered significant.

Results

Th17 cells and related cytokines were present in the tumor microenvironment

A murine model of PIOL was generated by the injection of A20.IIA-GFP cells ($H2^d$) into the posterior chamber of the eye of BALB/c mice ($H2^d$). The presence of the Th17-related cytokine transcripts, IL-17A (IL-17), IL-21 and IL-22 mRNA, and of GFP was analyzed in extracts from the eyes 19 days after inoculation of tumor cells or injection of PBS. IL-21 but neither IL-17 nor IL-22 was expressed in both controls: uninjected and PBS-injected eyes (Fig. 1). By contrast, IL-17 and IL-22 could be detected in inflammatory positive control, lymph node derived from experimental autoimmune encephalomyelitis mouse (data not shown). In tumor-bearing eyes, IL-17 transcripts, but not IL-22 transcripts, were detected, and the expression of IL-21 was significantly higher than in the controls. Neither IL-17 nor IL-21 and IL-22 were detected in significant quantities in A20.IIA-GFP tumor cells (Fig. 1B).

We previously showed that CD4⁺ T cells progressively infiltrate the eye after tumor inoculation. Intracellular cytometry showed the presence of Th17 cells, that is, CD4⁺ T cells coproducing IL-17 and IL-21, in eyes with lymphoma (Fig. 2A). IL-22 was not detected in these cells. Of note, a few double positive IFN γ ⁺ plus IL-17⁺ cells were found ($0.07\pm0.03\%$ among CD4⁺ T cells). The mean frequency of Th17 cells among CD4⁺ T cells in PIOL eyes was $0.64\pm0.6\%$. This proportion is substantially lower than that of Th1 cells (defined as IFN γ ⁺ CD4⁺ T cells) ($17.2\pm6.8\%$). The uninjected eyes contained no Th17 cells. The proportion of Th17

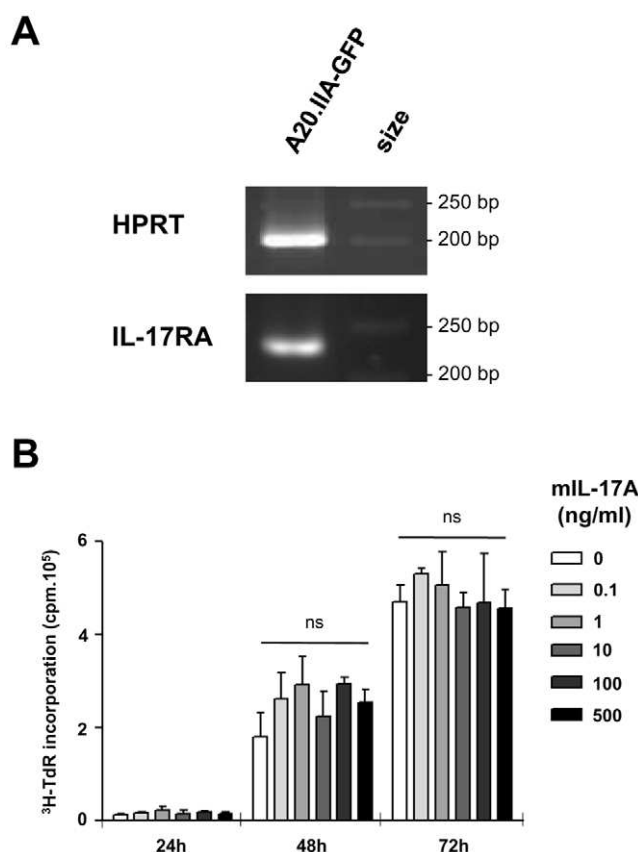


Figure 4. IL-17 has no effect on lymphoma B cells. (A) Analysis of IL-17RA mRNA expression by RT-PCR of A20.IIA-GFP cells. (B) Proliferation assay with a [3 H]-thymidine incorporation to evaluate the effect of murine IL-17 (mIL-17) on A20.IIA-GFP cells. Data are representative of at least two independent experiments. Error bars represent SD. doi:10.1371/journal.pone.0024622.g004

cells in PIOL eyes was the same as in the lymph nodes of these mice, as shown in Fig. 2B. Taken together, these results demonstrate the presence of Th17 in the tumor microenvironment.

High production of IL-17 was associated with a low tumor burden

To further analyze the role of Th17 cells in tumor growth, we investigated the level of ex vivo IL-17 secretion by TIL and its correlation with tumor burden (Fig. 3A). Supernatants of ocular cells were harvested from 24 eyes with lymphoma and stimulated by beads coated with anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies: they contained from 6.7 to 1204 pg/ml of IL-17 (mean: 239 pg/ml). As expected, this assay, like the intracellular staining, found no IL-17 in either set of control eyes. Lymphomatous B cells were characterized by GFP and CD19 expression (Fig. 3B). Nineteen days after injection, tumor growth among the A20.IIA-GFP-injected mice was heterogeneous, with tumor cells accounting for a median of 28.4% of total ocular cells. Above and below this median, two groups were distinguished, one considered to have a high tumor burden, and the other a low burden. IL-17 production differed significantly ($P=0.04$) between these groups; it was low in the group with a high tumor burden, and vice versa (Fig. 3C). IWe therefore hypothesized that this cytokine has antitumor functions.

IL-21 but not IL-17 had antitumor effects on lymphomatous B cells

To determine whether lymphomatous B cells were sensitive to IL-17, we tested for expression of the IL-17 receptor A chain and found it to be positive (Fig. 4A). We then measured the effect of increasing doses of mIL-17 on tritium-thymidine (^3H -TdR) incorporation of A20.IIA-GFP cells (Fig. 4B). The presence of IL-17, even at high concentrations, did not change tumor proliferation at 72 h. IL-21, that was shown to be produced by Th17 cells in eyes with lymphoma (Fig. 2), has already been shown to act on B cells. We therefore investigated whether IL-21 affected A20.IIA-GFP cell proliferation. Results showed that IL-21R was expressed in the cell line (Fig. 5A) and that IL-21 induced a decrease in thymidine incorporation after 48 hours of incubation with at least 100 ng/ml of cytokine (Fig. 5B). The specificity of IL-21 activity on tumor cells was tested in vitro with a neutralizing antibody against this cytokine (Fig. 5C). As expected, background levels of proliferation were observed with cells incubated with 500 ng/ml of IL-21. Thymidine incorporation levels of A20.IIA-GFP cells rose to the levels of untreated cells on addition of 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of anti-IL-21 but not of the control isotype. Analysis of the IL-21-treated cells showed a significant increase in the percentage of dead cells ($P=0.02$) and a significant decrease in the proportion of dividing cells — in either G2 phase or mitosis ($P=0.01$) (Fig. 5D). We also tested whether the VAL lymphomatous B cells, from a

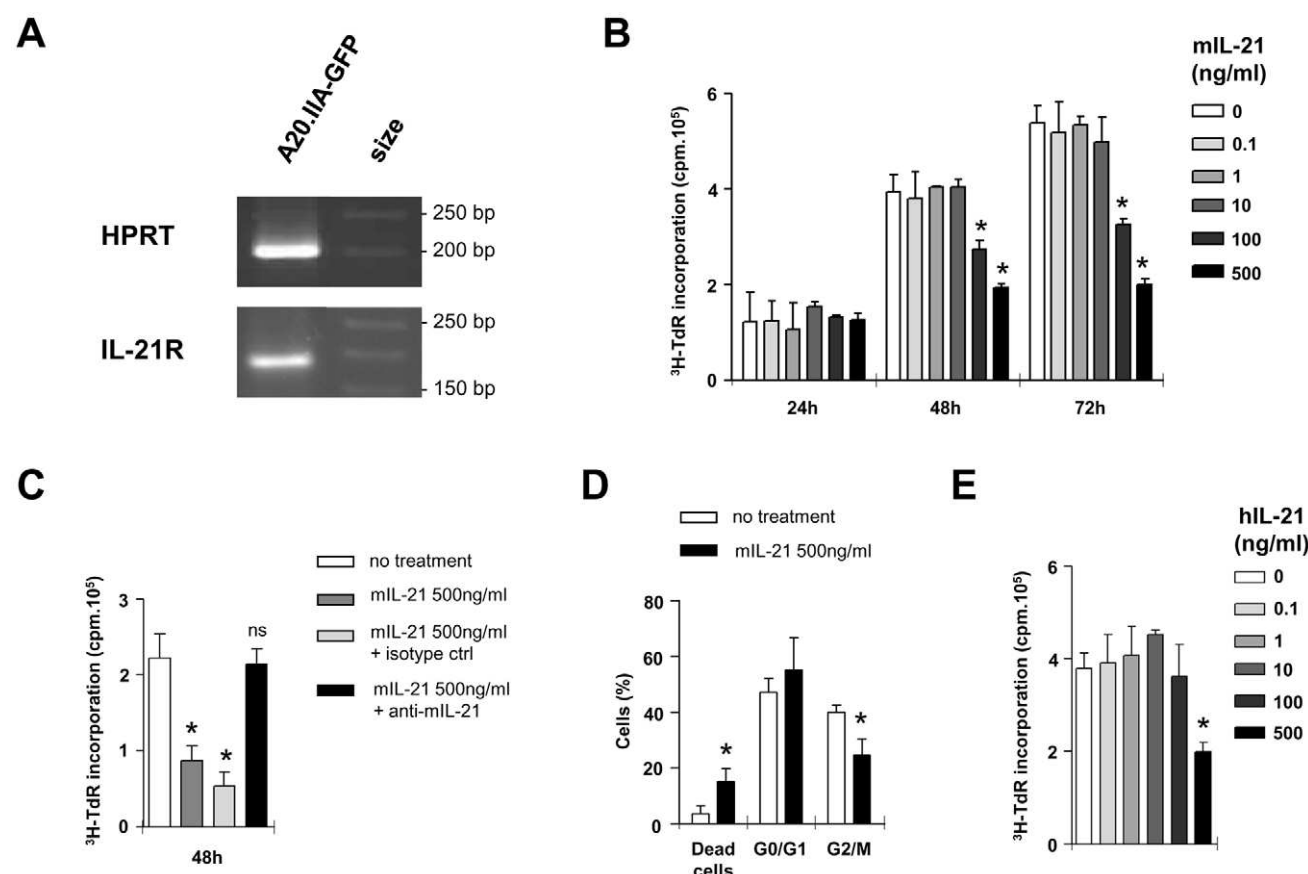


Figure 5. IL-21 effect on lymphomatous B-cells. (A) Analysis of IL-21R mRNA expression by RT-PCR of A20.IIA-GFP cells. (B–D) Proliferation assay with a [^3H]-thymidine incorporation to evaluate effects of murine IL-21 (mIL-21) on A20.IIA-GFP cells. (C) Murine IL-21 effect is blocked by 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ neutralizing anti-mIL-21 Ab. (D) Effect of mIL-21 on cell cycle of murine A20.IIA-GFP cells. Data are representative of at least two independent experiments. Error bars represent SD. (E) Human IL-21 (hIL-21) effect on VAL cell line proliferation. Comparison with untreated cells was tested with Mann-Whitney analysis (*, $p<0.05$; **, $p<0.001$). doi:10.1371/journal.pone.0024622.g005

human DLBCL-derived cell line, were sensitive to IL-21 in the same conditions (Fig. 5E). Incubation of these cells with 500 ng/ml of human IL-21 reduced their level of thymidine incorporation.

Discussion

Th17 cells have previously been found in cancer microenvironments [14–17], but their functions remain unclear. On the one hand, adoptive transfer of in vitro polarized Th17 cells can promote cytotoxicity against tumor cells [7] and eradicate the tumor [8]. On the other hand, Th17 cells can increase neutrophil recruitment which in turn can exert protumorigenic activity [18,19].

Our results demonstrated that in our lymphomatous microenvironment, Th17 cells had a standard phenotype (CD3⁺CD4⁺IL-17⁺IL-21⁺) [20], did not produce IFN γ , and did not express Foxp3 (data not shown). They accounted for 0.5% of the CD4⁺ T-lymphocyte population in the eye microenvironment and in draining and non draining lymph nodes. These data are consistent with results from Yang et al. [21], who analyzed human DLBCL, the NHL subtype of PIOL [22], and found a small proportion of Th17 cells, defined as CD4⁺IL-17⁺IFN γ ⁺ or IFN γ [−] T cells in the human lymphoma microenvironment. Interestingly, Th17 number is higher in the draining lymph node as compared to the non draining ones as well as the total mononuclear cell number (data not shown) suggesting that tumor triggers a localized immune response.

IL-17 and IL-21 have been described as Th17-related cytokines [23]. Their transcripts were found in tumor-bearing eyes on day 19. Interestingly, the PBS-injected eyes expressed IL-21 but not IL-17. IL-21 is most often reported to be produced by T lymphocytes [24]. Nevertheless more recently, its production has been shown in brain neurons [25]. It is therefore interesting to explore IL-21 expression by ocular cells and in particular retinal neurons.

Although it has been convincingly shown that endogenous IL-17 increases tumor burden in immunodeficient mice [26], it has the opposite effect in immunocompetent mice [27]. We expected as we developed the first syngeneic model of intraocular B-cell

lymphoma in immunocompetent mice [28] that Th17 cells would have antitumor effects. Ex vivo secretion of this cytokine was negatively associated with tumor progression. Although the A20.IIA-GFP B cells expressed IL-17R, IL-17 had no direct antiproliferative effects. This result is consistent with the literature: other studies have failed to find any direct effect by IL-17 on other tumor growth [26,29,30]. In view of the significant negative correlation between IL-17 secretion and tumor burden, IL-17 might be only a reflection of Th17 activity. PIOL Th17 cells also produce IL-21, which has previously been reported to act on human lymphomatous B cells [31]. We showed here that IL-21 acts directly on the A20.IIA-GFP cell line inducing cell death and a decreasing of proliferation. The direct effect of IL-21 was confirmed on a human VAL DLBCL cell line in the same range of doses as for mice. IL-21 has already been tested in a clinical trial on NHL [32]. It would be interesting to test intraocular injections of IL-21 in PIOL.

Moreover, we hypothesize that Th17 cells act on tumors by secreting IL-21. However, no detectable IL-21 secretion was measured in the supernatant of total ocular cells from ex vivo cultures of tumor-bearing eyes (data not shown). IL-21 might be captured by cells that express IL-21R [33]—either tumor cells, as we demonstrated in this study, or Th17 cells themselves. If so, boosting Th17 cells may prove to be an effective therapeutic strategy in PIOL.

Acknowledgments

The authors thank Alain Buret for the animal house keeping. Flow cytometry and acquisitions were done at the cellular imaging and cytometry platform (CICC, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France). We are grateful to Jo Ann Cahn, Abigail Messenger and Jean-Luc Teillaud for careful reading of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SF CG CS-F WHF. Performed the experiments: CG SD LC SB HO. Analyzed the data: CG. Contributed reagents/materials/analysis tools: VT. Wrote the paper: CG SF.

References

- Alexander DD, Mink PJ, Adami H-O, Chang ET, Cole P, et al. (2007) The non-Hodgkin lymphomas: A review of the epidemiologic literature. *Int J Cancer* 120: 1–39. doi:10.1002/ijc.22719.
- Cassoux N, Merle-Beral H, Leblond V, Bodaghi B, Miléa D, et al. (2000) Ocular and central nervous system lymphoma: clinical features and diagnosis. *Ocul Immunol Inflamm* 8: 243–250.
- Touitou V, Daussy C, Bodaghi B, Camelo S, de Kozak Y, et al. (2007) Impaired th1/tc1 cytokine production of tumor-infiltrating lymphocytes in a model of primary intraocular B-cell lymphoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 3223–3229. doi:10.1167/iov.07-0008.
- Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, et al. (2004) Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med* 351: 2159–2169. doi:10.1056/NEJMoa041869.
- Yang Z-Z, Novak AJ, Stenson MJ, Witzig TE, Ansell SM (2006) Intratumoral CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4⁺ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 107: 3639–3646. doi:10.1182/blood-2005-08-3376.
- Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, et al. (2009) Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 114: 1141–1149. doi:10.1182/blood-2009-03-208249.
- Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, Yang XO, Yamazaki T, et al. (2009) T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* 31: 787–798. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.014.
- Muranski P, Boni A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, et al. (2008) Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* 112: 362–373. doi:10.1182/blood-2007-11-120998.
- Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y (2008) The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28: 454–467. doi:10.1016/j.immuni.2008.03.004.
- van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Kullberg BJ, van der Meer JWM, Joosten LAB, et al. (2009) Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB Rep* 42: 776–787.
- Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR (2010) Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci* 1183: 211–221. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05133.x.
- Amadi-Obi A, Yu C-R, Liu X, Mahdi RM, Clarke GL, et al. (2007) TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med* 13: 711–718. doi:10.1038/nm1585.
- Jones B, Tite JP, Janeway CA, Jr. (1986) Different phenotypic variants of the mouse B cell tumor A20/2J are selected by antigen- and mitogen-triggered cytotoxicity of L3T4-positive, I-A-restricted T cell clones. *J Immunol* 136: 348–356.
- Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, et al. (2011) Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 71: 1263–1271. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2907.
- Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, et al. (2009) Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 114: 1141–1149. doi:10.1182/blood-2009-03-208249.
- Wainwright DA, Sengupta S, Han Y, Ulasov IV, Lesniak MS (2010) The presence of IL-17A and T helper 17 cells in experimental mouse brain tumors and human glioma. *PLoS ONE* 5: e15390. doi:10.1371/journal.pone.0015390.
- Su X, Ye J, Hsueh EC, Zhang Y, Hoft DF, et al. (2010) Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. *J Immunol* 184: 1630–1641. doi:10.4049/jimmunol.0902813.
- Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, et al. (2009) Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: «N1» versus «N2» TAN. *Cancer Cell* 16: 183–194. doi:10.1016/j.ccr.2009.06.017.

19. Maniati E, Soper R, Hagemann T (2010) Up for Mischief? IL-17/Th17 in the tumour microenvironment. *Oncogene* 29: 5653–5662. doi:10.1038/onc.2010.367.
20. Zou W, Restifo NP (2010) T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 10: 248–256. doi:10.1038/nri2742.
21. Yang Z-Z, Novak AJ, Ziesmer SC, Witzig TE, Ansell SM (2009) Malignant B cells skew the balance of regulatory T cells and TH17 cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 69: 5522–5530. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0266.
22. Chan C-C, Fisson S, Bodaghi B (2009) The future of primary intraocular lymphoma (retinal lymphoma). *Ocul Immunol Inflamm* 17: 375–379. doi:10.3109/09273940903434804.
23. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S (2009) Human Th17 cells: are they different from murine Th17 cells? *Eur J Immunol* 39: 637–640. doi:10.1002/eji.200839050.
24. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, et al. (2000) Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408: 57–63. doi:10.1038/35040504.
25. Tzartos JS, Craner MJ, Friese MA, Jakobsen KB, Newcombe J, et al. (2011) IL-21 and IL-21 receptor expression in lymphocytes and neurons in multiple sclerosis brain. *Am J Pathol* 178: 794–802. doi:10.1016/j.ajpath.2010.10.043.
26. Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, Galinha A, Gey A, et al. (1999) Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res* 59: 3698–3704.
27. Benchetrit F, Circe A, Vives V, Warnier G, Gey A, et al. (2002) Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood* 99: 2114–2121. doi:10.1182/blood.V99.6.2114.
28. Touitou V, Bodaghi B, de Kozak Y, Lehoang P, Sautès-Fridman C, et al. (2008) Animal models of intraocular lymphomas. *Ophthalmic Res* 40: 208–211. doi:10.1159/000119878.
29. Pongcharoen S, Niumsup P, Sanguanserm S, Supalap K, Butkhamchot P (2006) The Effect of Interleukin-17 on the Proliferation and Invasion of JEG-3 Human Choriocarcinoma Cells. *American Journal of Reproductive Immunology* 55: 291–300. doi:10.1111/j.1600-0897.2006.00366.x.
30. Numasaki M, Fukushi J-ichi, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, et al. (2003) Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 101: 2620–2627. doi:10.1182/blood-2002-05-1461.
31. Akamatsu N, Yamada Y, Hasegawa H, Makabe K, Asano R, et al. (2007) High IL-21 receptor expression and apoptosis induction by IL-21 in follicular lymphoma. *Cancer Lett* 256: 196–206. doi:10.1016/j.canlet.2007.06.001.
32. Andorsky DJ, Timmerman JM (2008) Interleukin-21: biology and application to cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 8: 1295–1307. doi:10.1517/14712598.8.9.1295.
33. Monteleone G, Caruso R, Fina D, Peluso I, Gioia V, et al. (2006) Control of matrix metalloproteinase production in human intestinal fibroblasts by interleukin 21. *Gut* 55: 1774–1780. doi:10.1136/gut.2006.093187.

b. Résultats non publiés 2

i. Molécules favorables aux Th17 dans l'œil de souris

La différenciation des lymphocytes Th17 a lieu en présence de TGF β et d'IL-6. Le travail du Dr Valérie Touitou a déjà mis en évidence que **le micro-environnement du PIOL comportait de fortes concentrations d'IL-6**. Il est décrit dans la littérature que **l'œil contient du TGF β** d'isoforme 2 (Takeuchi et al., 1998). Son homologue produit par les cellules immunitaires et cité sous le nom de « TGF β » est l'isoforme 1. J'ai recherché, par RT-PCR, quelles étaient les isoformes de TGF β présentes dans l'œil de souris BALB/c contrôles (injecté avec du PBS). Les transcrits TGF β 1, 2 et 3 y sont exprimés (Figure 13). La tumeur, qui est d'origine immunitaire, exprime seulement l'isoforme 1 qui est logiquement retrouvée dans l'œil PIOL. Les formes 2 et 3 sont, elles aussi, exprimées dans l'œil tumoral.

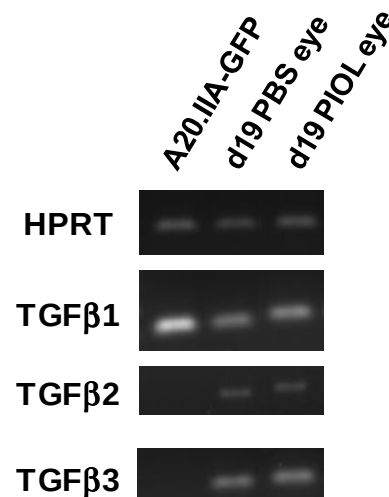


Figure 13. Transcrits des différentes isoformes du TGF β dans l'œil de souris BALB/c. Analyse de l'expression des ARN messagers de HPRT, TGF β 1, TGF β 2 and TGF β 3 par RT-PCR dans les cellules A20.IIA-GFP, les yeux injectés par du PBS et les injectés par des cellules A20.IIA-GFP. Les cellules A20.IIA-GFP cells (1×10^4) ont été inoculées aux souris BALB/c au jour 0. Les souris ont été sacrifiées au jour 19. Résultats de 2 expériences indépendantes (n=4).

ii. Effet de l'IL-21 sur la différenciation des cellules tumorales

Un des effets, décrit dans la littérature, de l'IL-21 sur les lymphocytes B normaux est la différenciation de ces derniers (Spolski and Leonard, 2008b) et, notamment, une commutation de classe. Aussi, une commutation de classe spontanée de l'isotype IgG2a à l'isotype IgA a déjà été observée pour une lignée de lymphome B murin : T560 (Phillips-

Quagliata et al., 1999). J'ai donc cultivé les cellules tumorales A20.IIA-GFP pendant 72h avec de l'IL-21 à 500ng/ml puis j'ai dosé les Ig présentes dans leur surnageant de culture par CBA (Cytometric Bead Array, kit 550026, réalisé selon les instructions du fabricant BD Bioscience). Sans traitement, les cellules A20.IIA-GFP sécrètent des IgG2a (barre grise, Figure 14). **Lorsque les cellules sont cultivées en présence d'IL-21, elles sécrètent toujours des IgG2a mais en plus grande quantité (4,8 fois plus)** (barre noire, Figure 14).

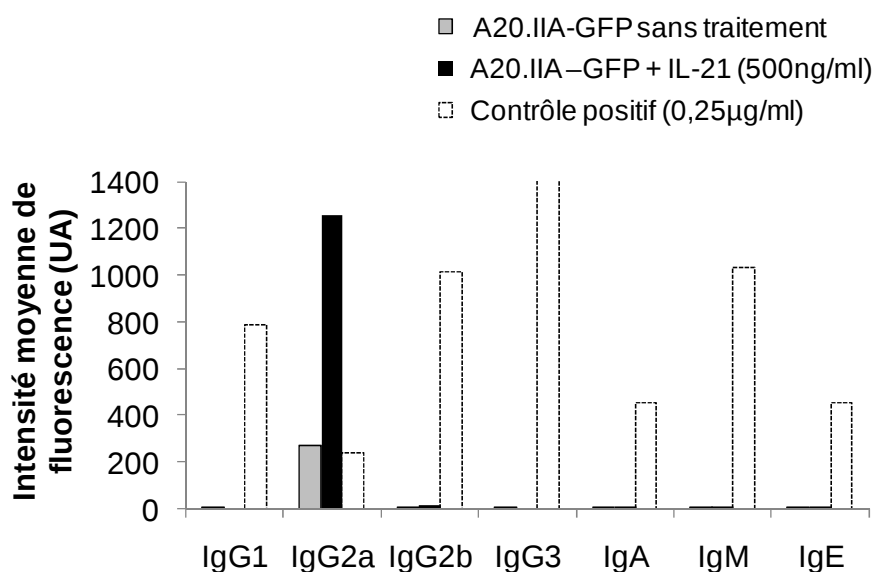


Figure 14. Immunoglobulines sécrétées par les cellules tumorales. Les cellules A20.IIA-GFP ont été stimulées (en noir) *in vitro* par de l'IL-21 à la concentration de 500ng/ml ou non (en gris) pendant 72h. Le surnageant de culture a été dosé pour déterminer la nature et la quantité de la sécrétion d'Ig des cellules. Le contrôle positif du dosage est représenté en blanc, colonne en pointillés.

iii. Traitement des souris PIOL par l'IL-21

A la suite des résultats obtenus dans l'Article 2, j'ai souhaité tester le traitement par IL-21 dans le modèle de PIOL. *In vitro*, l'IL-21 a son effet maximum à 500ng/ml pour 10^4 cellules dans 200µl de milieu de culture. Cela équivaut à 100ng de protéine pour 10^4 cellules. 6 jours après l'injection de 10^4 cellules tumorales (modèle décrit dans Touitou et al., 2007), les cellules n'ont quasiment pas proliféré (résultats non montrés), 200ng d'IL-21 devaient permettre de réduire la prolifération des cellules sur 3 jours en l'injectant au site tumoral. Ne pouvant traiter les souris par voie intra-vitréenne que tous les 6 jours, afin de permettre à l'œil de cicatriser après l'injection, j'ai doublé la dose : 400ng par injection. La première cinétique de traitement a consisté en 2 injections d'IL-21 (j6 et j12) avec une analyse de la

prolifération tumorale à j19 (Figure 15A). **Aucune différence dans la proportion de cellules tumorales n'a été mise en évidence.** La 2^{ème} cinétique de traitement a consisté en 2 injections d'IL-21 (j0 et j6) suivies d'une analyse plus précoce : à j12 (Figure 15B). Dans cette condition aussi, aucune différence n'a été observée.

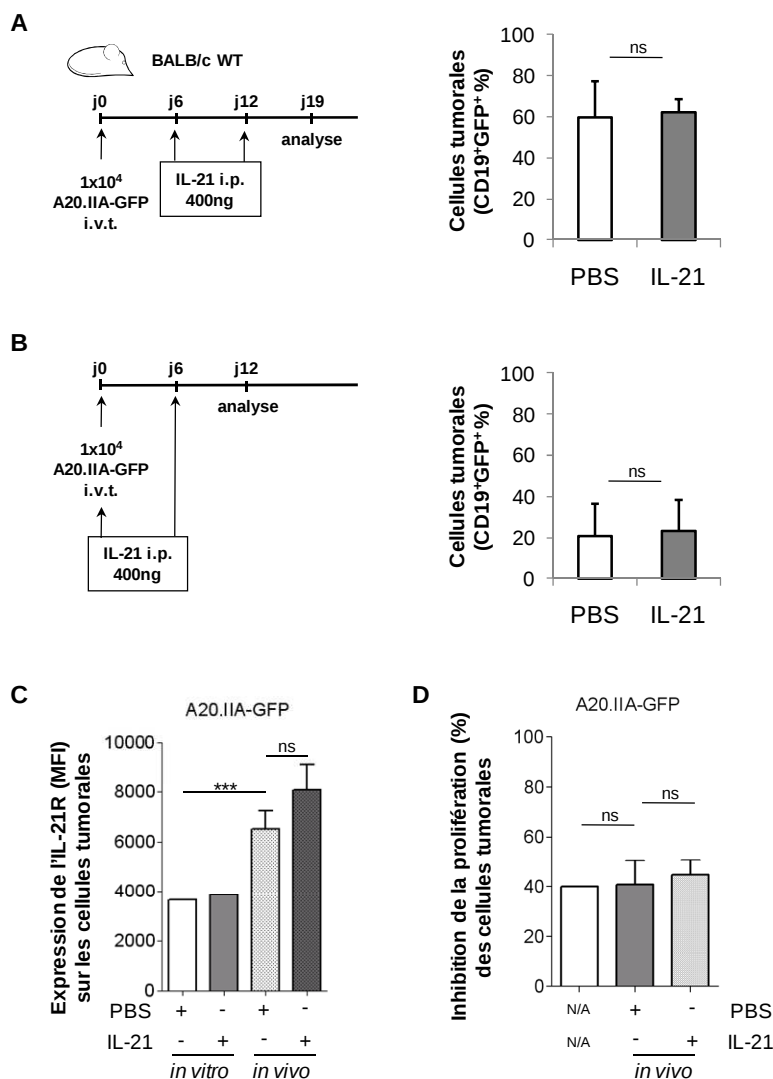


Figure 15. Rôle de l'IL-21 dans le traitement du PIOL. A et B) Les cellules tumorales ont été injectées aux souris BALB/c par voie intra-vitréenne. Du PBS (en blanc) ou de l'IL-21 (en gris) ont été administrée sous dose de 400ng pour l'IL-21 à j6 et j12 (A) ou à j0 et j6 (B). L'analyse de la prolifération tumorale a été réalisée à j19 (A) ou à j12 (B). C) Analyse de l'expression du récepteur à l'IL-21 (IL-21R) par cytométrie en flux réalisée sur des cellules A20.IIA-GFP cultivées pendant 72h avec ou sans IL-21 à 500ng/ml (*in vitro*) ou des cellules A20.IIA-GFP injectées dans l'œil de souris traité ou non par de l'IL-21 (issues de la Figure15B) *in vivo*. D) Réduction de la prolifération de cellules A20.IIA-GFP GFP cultivées pendant 72h avec ou sans IL-21 à 500ng/ml. Les cellules ont été soit injectées dans l'œil de souris traitée (en gris clair) ou non (en gris foncé) par de l'IL-21 (cellules issues de B) soit uniquement cultivées *in vitro* (en blanc).

Nous avons alors pensé que le récepteur à l'IL-21 (IL-21R) pouvait être régulé négativement de la surface des cellules cibles de l'IL-21. J'ai analysé par cytométrie en flux l'expression de l'IL-21R sur des cellules A20.IIA-GFP cultivées *in vitro* et traitées ou non par de l'IL-21 pendant 3 jours et sur des cellules A20.IIA-GFP injectées par voie intra-vitréenne chez des souris traitées ou non par de l'IL-21 (expérience Figure 15B). **Le traitement par l'IL-21 ne diminue l'expression de l'IL-21R à la surface des cellules ni *in vitro*, ni *in vivo*** (Figure 15C). L'explication du manque d'efficacité de l'IL-21 ne passe pas par une régulation négative de son récepteur. Cependant, nous avons remarqué que l'environnement oculaire induit une régulation positive de l'IL-21R à la surface des cellules tumorales, même sans injection d'IL-21. De plus, les cellules A20.IIA-GFP injectées par voie intra-vitréenne sont aussi sensibles à l'IL-21 *ex vivo* que des cellules uniquement cultivées *in vitro* (Figure 15D). Du fait de la régulation positive de l'IL-21R sur les cellules tumorales et de leur sensibilité à l'IL-21 intacte *ex vivo*, nous avons émis l'hypothèse d'une capture de l'IL-21 par d'autres cellules du micro-environnement oculaire.

J'ai montré dans l'Article 2, Figure 1 que des messagers d'IL-21 étaient exprimés dans l'œil à l'état physiologique. Il était alors possible que le récepteur de cette cytokine soit aussi présent. J'ai montré, par RT-PCR, que l'ARNm de l'IL-21R est exprimé dans l'œil de souris BALB/c à l'état physiologique en prenant comme contrôle positif les cellules de ganglion (Figure 16A). De plus, j'ai montré que ce récepteur était exprimé à l'état protéique à la surface des cellules de la partie postérieure de l'œil en prenant comme contrôle positif les lymphocytes T CD4⁺ (Figure 16B). L'IL-21R est donc bien présent sur d'autres cellules que les LT ou les cellules tumorales dans le micro-environnement du PIOL.

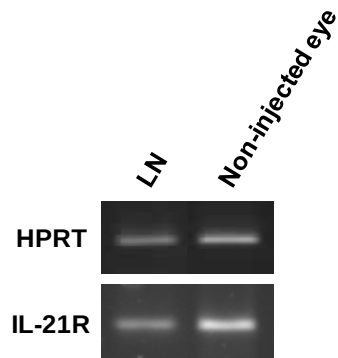
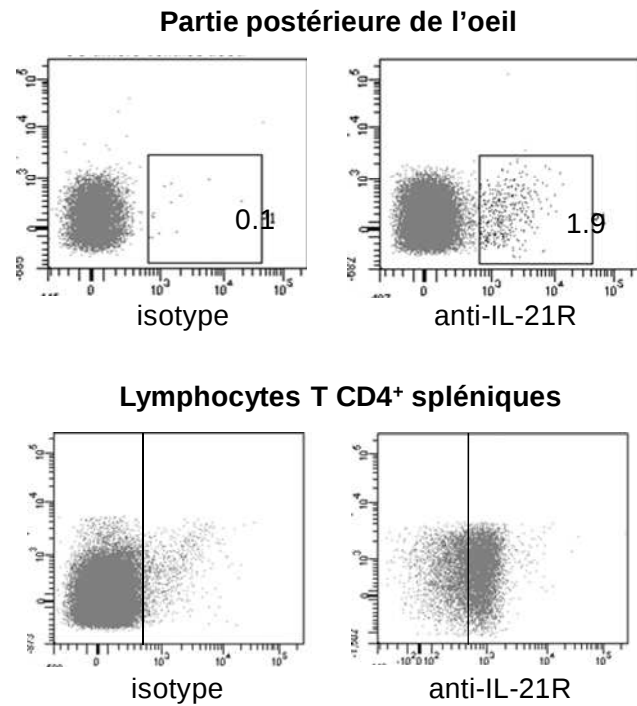
A**B**

Figure 16. Expression de l'IL-21R dans l'œil de souris BALB/c. A) Analyse de l'expression des ARN messagers de HPRT et IL-21R par RT-PCR dans les ganglions et les yeux non-injectés de souris BALB/c. B) Analyse de l'expression protéique de l'IL-21R à la surface des cellules de la partie postérieure de l'œil et des lymphocytes T CD4⁺ par cytométrie en flux. Résultat donné en pourcentage de cellules parmi les cellules de la partie postérieure de l'œil (haut).

III. Impact de la localisation du lymphome B sur le rôle des Treg et des Th17 envers la tumeur (résultats non publiés)

a. Rôle des Treg dans le lymphome B en fonction de sa localisation

Le rôle des Treg envers les lymphomes de type B est encore controversé. J'ai montré qu'**en fonction de la localisation** de l'implantation du lymphome B murin issu de la lignée A20.IIA-GFP, **la proportion de Treg CD4⁺CD25⁺ intra-tumoraux varie de manière importante** : 27% des LT CD4⁺ dans la rate, 40% dans le cerveau et 47% dans l'œil (Article 1 et Résultats non publiés 1). J'ai voulu savoir quel serait l'impact de la déplétion de cette sous-population lymphocytaire sur le développement de la tumeur en fonction de sa localisation. La déplétion des nTreg CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ est effective à j0 dans le sang des souris injectées 10 jours plus tôt par 150µg de PC61 (Figure 17B). Les Treg passent de 4,7% des LT CD4⁺ (à j-10) à 0,1% (à j0). **La déplétion des Treg induit une diminution significative de la masse tumorale dans les PIOL** (de $2,69 \pm 0,91 \cdot 10^6$ à $1,08 \pm 0,59 \cdot 10^6$ cellules tumorales) et **dans les PCL** (de $5,42 \pm 3,34 \cdot 10^4$ à $0,99 \pm 0,45 \cdot 10^4$). Cependant, **dans les ISL** (de $2,45 \pm 1,73 \cdot 10^5$ à $1,09 \pm 1,26 \cdot 10^5$) la différence n'est pas significative (Figure 17C). Cependant, il est à noter que c'est dans le cerveau que les cellules A20.IIA-GFP sont les plus sensibles à la déplétion de Treg : diminution du nombre de cellules tumorales d'un facteur 2,2 pour le PIOL, 5,5 pour le PCL et 2,2 pour l'ISL.

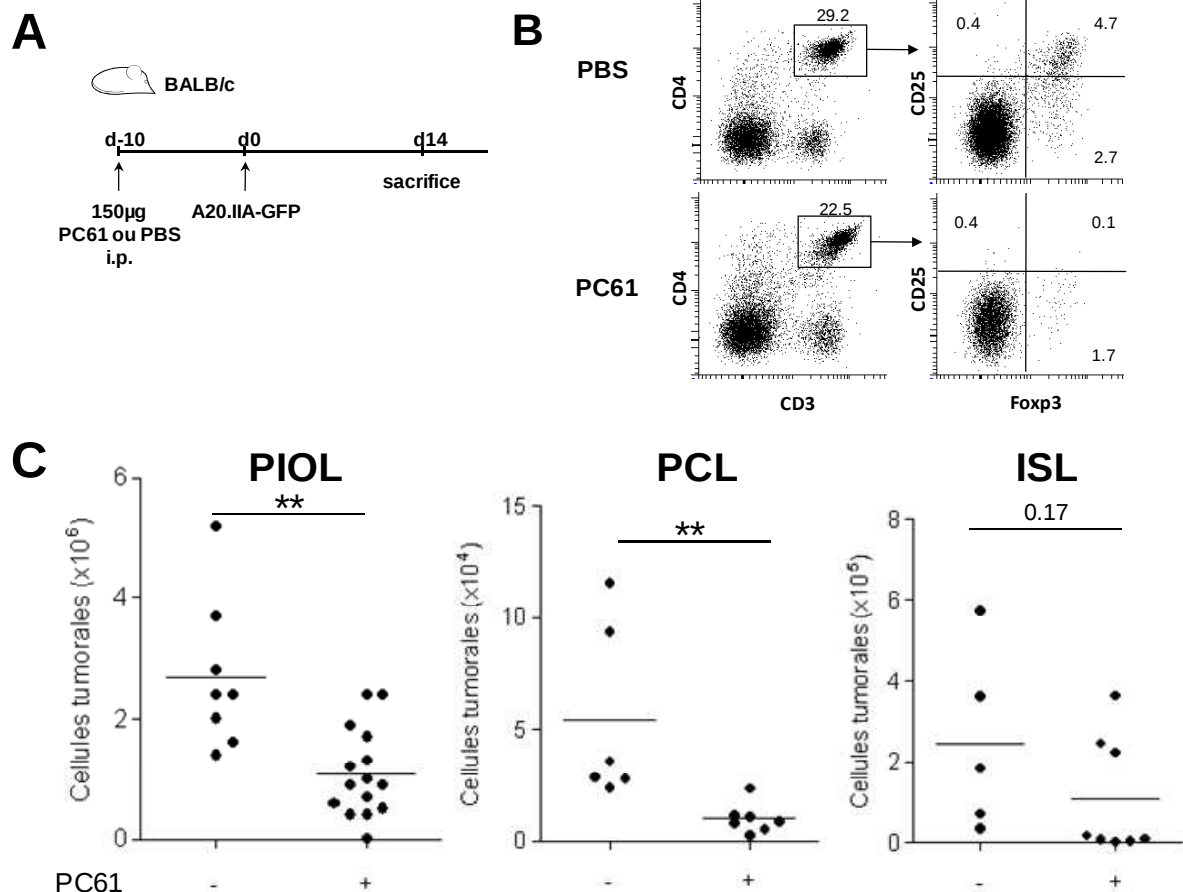


Figure 17. Impact de la déplétion des Treg sur la tumeur dans les modèles murins de PIOL, PCL et ISL. A) Cinétique de l'expérience. Les souris BALB/c ont été injectées avec 150µg d'anticorps anti-CD25 (PC61) ou par du PBS à j-10. Les cellules tumorales ont été injectées aux souris par voie intra-vitréenne, intra-striatale ou intra-splénique à j0. Les animaux ont été sacrifiés à j14. B) Dot-plots représentatifs de l'analyse à j0, par cytométrie en flux, de la proportion des lymphocytes Treg $CD4^+CD25^{hi}Foxp3^+$ parmi les lymphocytes T $CD4^+$ du sang. C) Analyse à j14 du nombre de cellules tumorales de l'œil (PIOL), du cerveau (PCL) ou de la rate (ISL) en fonction de l'injection de PBS ou de PC61.

Les Treg sont décrits pour inhiber les LT effecteurs induisant généralement leur mort (Shevach, 2009). La **levée de l'inhibition par les Treg** pourrait induire une augmentation globale des autres populations lymphocytaires. Cependant, cette déplétion bénéficie à différentes cellules en fonction de la localisation du lymphome. Elle n'a induit un remodelage du compartiment lymphocytaire T que pour l'**ISL** où la **proportion de lymphocytes T $CD8^+$ a augmenté** de 1,25 fois (Figure 18A). Une autre explication, non exclusive, serait que le compartiment $CD4^+$ a été modifié. En effet, le nombre des **Th2** et des **Th17** augmente dans le **PIOL** (respectivement 4,5 et 1,7 fois) et dans le **PCL**, ce sont les **Th17** qui augmentent le plus (12,7 fois) (Figure 18 B, C et D).

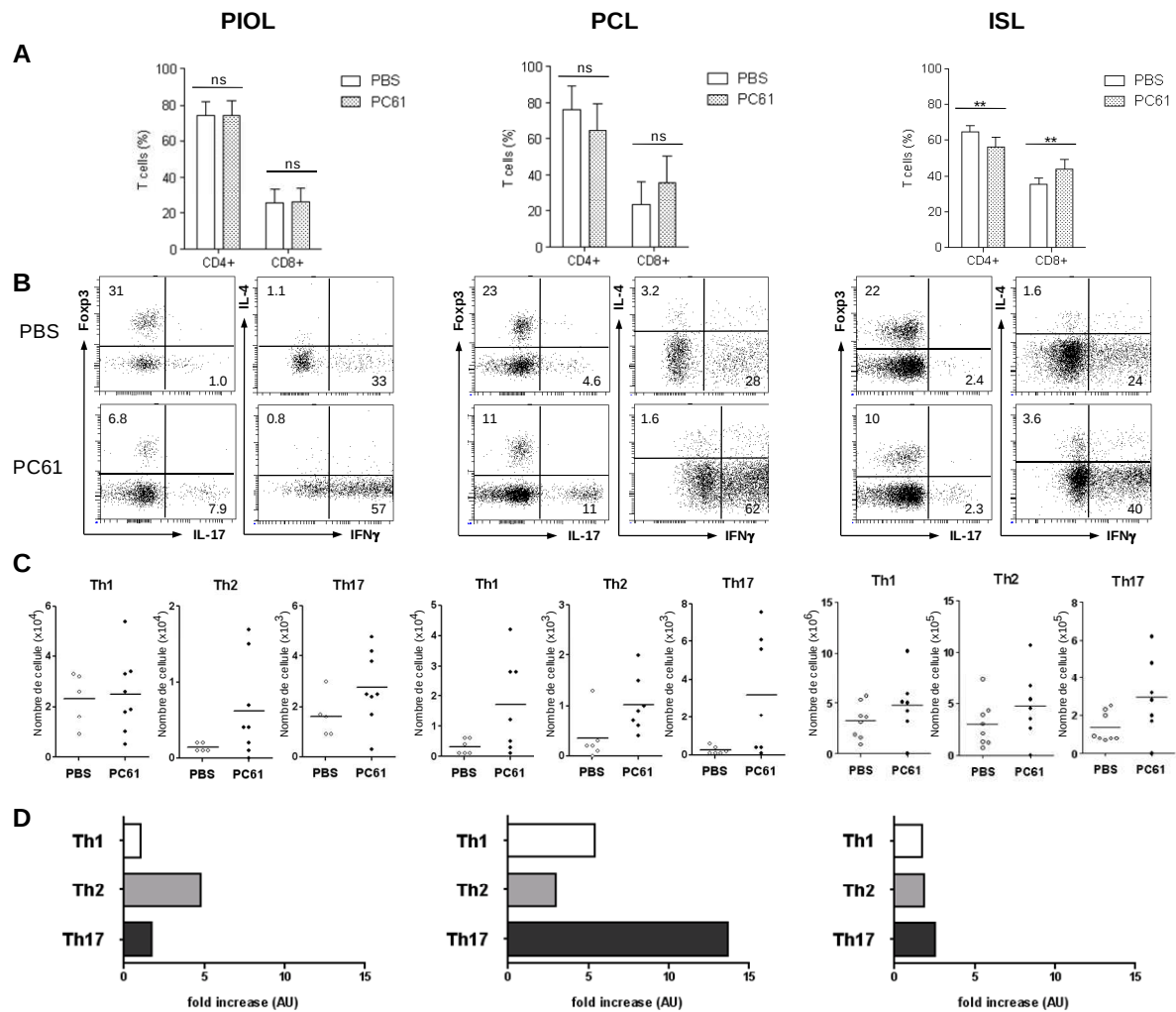


Figure 18. Impact de la déplétion des Treg sur le compartiment lymphocytaire T du micro-environnement tumoral dans les modèles de PIOL, PCL et ISL. A, B, C et D) Analyse par cytométrie en flux des cellules de l'œil, du cerveau ou de la rate des souris injectées à j-10 avec 150 μ g de PC61 ou avec du PBS puis à j0 avec des cellules A20.IIA-GFP. A) Analyse de la proportion des cellules CD4⁺ et CD8⁺ dans le compartiment lymphocytaire T. B) Dot-plots représentatifs de la proportion des cellules T CD4⁺ produisant de l'IFN γ , de l'IL-17, de l'IL-4 ou exprimant Foxp3. C) Nombre de cellules Th1 (CD3⁺CD4⁺IFN γ ⁺), Th2 (CD3⁺CD4⁺IL-4⁺) et Th17 (CD3⁺CD4⁺IL-17⁺). D) Augmentation moyenne des cellules Th1, Th2 et Th17 lorsque les souris sont déplétées en Treg. Figures représentatives d'1 expérience à 8 animaux par groupe. Les statistiques utilisées sont des tests de Mann et Whitney ainsi que des écarts-types.

b. Rôle de l'IL-17 dans le lymphome B en fonction de sa localisation

J'ai précédemment montré que l'IL-17 n'avait pas d'impact direct sur la prolifération tumorale. Pourtant, sans l'IL-17, dans un modèle murin KO pour cette cytokine, les cellules de mélanome murin prolifèrent plus rapidement (Martin-Orozco et al., 2009). J'ai donc voulu savoir quel serait l'impact d'une neutralisation de l'IL-17 dans nos modèles murins de lymphomes B. J'ai observé qu'à j14, après 2 injections d'un anticorps monoclonal

neutralisant anti-IL-17 par voie intra-péritonéale, que les cellules de PCL sont 1,7 fois plus nombreuses quand l'IL-17 est neutralisée et qu'elles le sont 1.3 fois plus dans l'ISL (Figure 19).

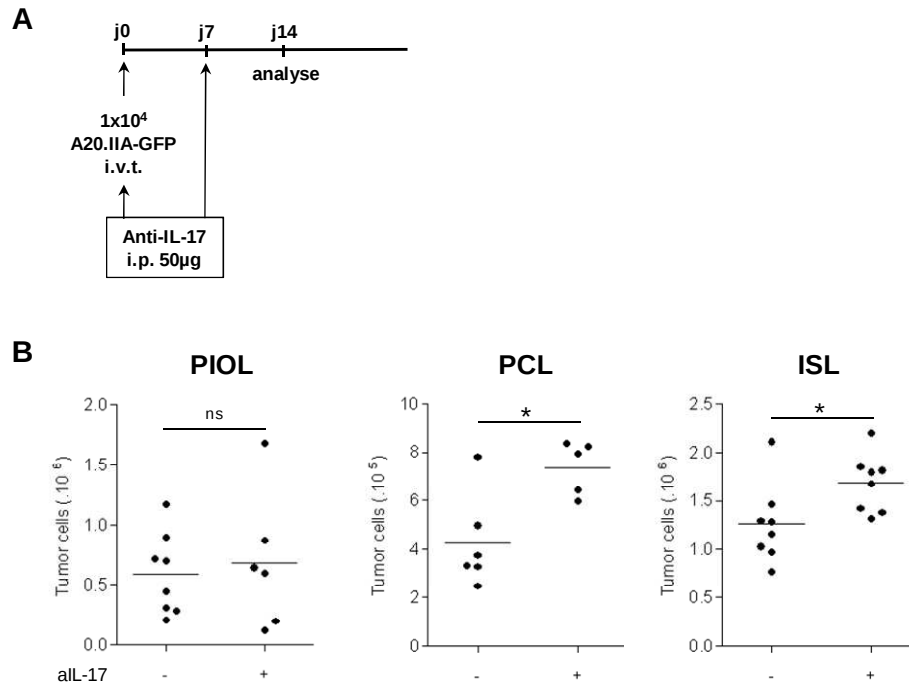


Figure 19. Impact de la neutralisation de l'IL-17 sur la tumeur dans les modèles murins de PIOL, PCL et ISL. A) Cinétique de l'expérience. Les souris BALB/c ont été injectées à j0 par 1.10^4 , 5.10^4 et 5.10^6 cellules respectivement dans la chambre postérieure de l'œil, le striatum et l'apex de la rate. Ces souris ont reçu 2 injections de 50 μ g d'anticorps monoclonal anti-IL-17 à j0 et j7. Elles ont été sacrifiées à j14. B) Analyse par cytométrie en flux du nombre de cellules tumorales de l'œil (PIOL), du cerveau (PCL) ou de la rate (ISL).

La neutralisation de l'IL-17, permet donc une croissance de la tumeur plus rapide pour le PCL et l'ISL. Cependant, cette neutralisation n'a pas d'impact sur la croissance des cellules tumorales du PIOL.

Discussion

Le traitement des lymphomes B a fait un progrès considérable depuis l'association des anticorps monoclonaux anti-CD20 à la chimiothérapie CHOP. Cependant, des patients ne répondent pas à ce traitement (10%) ou le deviennent après une rechute. Les rechutes des DLBCL sont de l'ordre de 40% des patients (Prichard et al., 2009).

Le système immunitaire et notamment les LT sont associés à un bon pronostic pour l'évolution des lymphomes B depuis 2004. Cependant, les traitements actuels ne les ciblent pas pour améliorer l'état des patients. Le principal obstacle dans le développement de nouvelles thérapies ciblant le système immunitaire est le manque de données quant à sa composition exacte, notamment dans les lymphomes B les plus représentés : les DLBCL. De plus, la classification actuelle des DLBCL ne permet pas de différencier les DLBCL en fonction de leur localisation qui peut être importante dans l'évolution de la maladie.

I. Etat du micro-environnement immunitaire des lymphomes de type DLBCL en fonction de la localisation

Nous avons développé au laboratoire 3 modèles murins permettant l'étude du micro-environnement immunitaire de lymphomes B de type nodal (ISL) et de lymphomes B de type extranodaux du SNC (PCL et PIOL) associés à des DLBCL. J'ai pu mettre en évidence une augmentation des CPA dans les ISL ainsi que les PCL et les PIOL. Ces cellules pourraient être le reflet de la formation de nouveaux centres germinatifs, or, aucune structure de ce genre n'a été observée. L'augmentation des cellules CD11b⁺ peut alors être le reflet d'une augmentation des cellules myéloïdes suppressives renforçant la capacité de la tumeur à échapper au système immunitaire anti-tumoral. L'augmentation des lymphocytes T dès j9 au niveau splénique suite à l'injection de cellules tumorales révèle le déclenchement d'une inflammation locale précoce. Dans le cerveau, l'apparition de cellules T est elle aussi précoce (dès j9) pour les cellules CD4⁺ mais retardée pour les cellules CD8⁺. **La tumeur se développe de manière exponentielle dans les 2 micro-environnements et les cellules CD4⁺ sont 2 fois plus nombreuses parmi les lymphocytes T que les cellules CD8⁺.** Ceci est aussi décrit par Grille et al dans un modèle murin de lymphome B.

Nous nous sommes alors orientés sur l'étude détaillée des lymphocytes T CD4⁺. Les **profils cytokiniques** de cette sous-population sont relativement **semblables** dans le PCL et l'ISL

et les 3 grands sous-types (Th1, Th2 et Th17) sont retrouvés. Cependant, sans une stimulation spécifique *ex vivo* au préalable, les cellules ne relarguent pas spontanément leurs cytokines (à l'exception de l'IFN γ dans les ISL) malgré la présence de CPA lors du test. Ces résultats sont en faveur d'une **régulation négative ayant lieu dans le micro-environnement des tumeurs des 2 localisations**, avec une suppression encore plus importante au niveau du PCL qui peut être expliquée par le caractère immuno-suppresseur de l'environnement cérébral. De plus, une **proportion importante de Treg** a été retrouvée dans le micro-environnement tumoral des ISL (25%) et encore **plus importante au niveau du PCL et du PIOL** (40% et 47% respectivement). Les Treg peuvent être une explication de l'immuno-suppression des 2 localisations, avec une corrélation entre leur proportion et leur capacité de suppression. Ceci suggère alors que le caractère immuno-suppresseur de l'environnement cérébral et oculaire favoriserait les Treg. Tran Thang et coll. montrent d'ailleurs que lors du développement d'un autre type de tumeur du cerveau, un astrocytome, l'infiltrat immunitaire est fortement constitué de cellules immuno-régulatrices (Tran Thang et al., 2010).

La régulation négative des réactions immunitaires dans le micro-environnement de DLBCL a déjà été évoquée par (Yang et al., 2009). Ce type de tumeur favoriserait les Treg au dépend des Th17.

II. Présence des lymphocytes Th17 dans le micro-environnement du PIOL

La première caractéristique du micro-environnement du PIOL est la présence concomitante de l'IL-6 et du TGF β . Ces cytokines induisent la polarisation de LT naïf en Th17 à condition qu'ils soient spécifiquement activés via leur TCR et qu'ils reçoivent des signaux de co-stimulation. **Dans le modèle du PIOL, les Th17 pourraient donc se polariser localement.**

Comme de nombreux auteurs s'intéressant aux cellules infiltrant les tumeurs, j'ai prouvé la **présence de Th17 au sein des PIOL**. La particularité de mon travail a été de définir plus finement cette population. J'ai montré que les Th17 infiltrant les PIOL sont des lymphocytes T CD4⁺ produisant de l'IL-17 et de l'IL-21 mais pas d'IL-22. L'IL-22 est une cytokine retrouvée dans les réactions inflammatoires liées à la peau comme le psoriasis ou la réparation tissulaire (Ouyang et al., 2008). Il est possible que les Th17 nécessitent un médiateur clé sécrété notamment par la peau et non par l'œil pour produire de l'IL-22.

En recherchant les cytokines produites par les Th17 dans le PIOL, j'ai remarqué que l'IL-21 était exprimée sous forme d'ARNm dans l'œil de souris BALB/c à l'état physiologique. Or, l'IL-

21 est décrite comme étant produite uniquement par des cellules immunitaires. De plus, il a été récemment montré que des neurones du cerveau peuvent produire de l'IL-21 (Tzartos et al., 2011). Cette cytokine pourrait alors être produite dans l'œil par des neurones rétiniens.

III. Rôle des lymphocytes Th17 dans le micro-environnement du PIOL

Le rôle des Th17 dans les tumeurs n'est pas encore clairement défini. D'ailleurs, le rôle des cytokines qu'ils produisent varie en fonction de modèles étudiés. L'IL-17 serait pro-tumorale chez un hôte immuno-déficient et anti-tumorale chez un hôte immuno-compétent. Dans le cadre de mon étude *in vitro*, l'IL-17 n'a pas d'impact direct sur la prolifération des cellules lymphomateuses B. Ceci est aussi le cas pour d'autres tumeurs : la tumeur du col de l'utérus, le fibrosarcome et l'adénocarcinome du colon entre autres (Tartour et al., 1999; Numasaki et al., 2003; Pongcharoen et al., 2006).

J'ai, pour ma part, montré que **la sécrétion d'IL-17 par les LT infiltrant l'œil PIOL était associée de manière négative à la masse tumorale**. Cependant, il est possible que cette sécrétion ne soit que le reflet de l'activation des Th17 producteurs d'IL-21. L'IL-21 est déjà décrite pour induire sur les lymphocytes B normaux des effets dépendant de leur stade d'activation (prolifération, différenciation ou encore apoptose). De plus, un rôle pro-apoptotique envers des cellules lymphomateuses B a été montré (Spolski and Leonard, 2008b). J'ai alors mis en évidence que **l'IL-21 recombinante murine diminuait la prolifération des cellules lymphomateuses B A20.IIA-GFP**, utilisées dans le modèle du PIOL, et que cette action passait par une diminution du nombre de cellule en phase G2/M ainsi que par une augmentation des cellules mortes. L'IL-21 n'induit pas de commutation de classe des cellules A20.IIA-GFP, à la différence des lymphocytes B normaux ou d'autres lignées lymphomateuses B, mais augmente leur capacité à sécréter leurs immunoglobulines. Une augmentation de la sécrétion des immunoglobulines a aussi été observée dans des MALT par co-culture avec *Helicobacter pylori* (Hussel et al., 1993). Ceci peut être le reflet d'une première étape de différenciation en plasmablaste. Dans le cas de DLBCL, la présence d'IgG est observée à la surface. Cependant, leur dosage dans le sérum n'est pas réalisé (Ortolani, 2011).

Du fait de l'action de l'IL-21 sur les cellules A20.IIA-GFP *in vitro*, j'ai souhaité tester le traitement par l'IL-21 *in vivo* dans le modèle du PIOL. Cependant, je n'ai pas réussi à montrer d'effet *in vivo* avec 2 injections de 400ng d'IL-21. Le fait que l'IL-21 n'agissent pas dans ces conditions n'est pas dû à une régulation négative de l'IL-21R à la surface des cellules tumorales, ni à une insensibilisation à la protéine. Je pense que soit l'IL-21 diffuse

hors de l'œil, soit elle est captée localement par l'IL-21R exprimé de manière ectopique par des cellules de la partie postérieure de l'œil. L'administration d'IL-21 à des doses plus importantes devrait être capable de maîtriser la croissance des cellules A20.IIA-GFP dans le modèle du PIOL. Il est à noter que Sarosiek fait régresser des DLBCL humains, implantés en sous-cutané chez une souris Nude, par des injections intra-tumorales quotidiennes pendant 7 jours de 10µg d'IL-21 humaine recombinante (Sarosiek et al., 2010). De nouvelles études approfondissant le rôle de l'IL-21 à plus fortes doses sont donc nécessaires pour évaluer son efficacité dans le traitement du PIOL.

IV. Rôle de la balance Treg/Th17 dans le micro-environnement du lymphome B en fonction de sa localisation

La relation des Th17 avec les Treg est très étudiée. Ils sont liés par leur origine commune avant différenciation (pour les iTreg), par les phénomènes de plasticité qui peuvent provoquer un changement de phénotype et aussi par l'ambivalence de leur rôle. Les Th17 sont pro-inflammatoires alors que les Treg sont immuno-régulateurs.

Mes résultats montrent que les Th17 ont un rôle anti-tumoral dans le PIOL. J'ai aussi montré que ce profil Th17 était partiellement inhibé dans le modèle de lymphome B murin quelle que soit sa localisation. La forte proportion des Treg pourrait en être la cause et cela expliquerait alors la croissance constante de la tumeur bien qu'elle soit en présence de Th17.

Dans le modèle murin de lymphome B A20.IIA-GFP, la déplétion systémique des Treg, testée afin de connaître leur rôle, induit un ralentissement de la prolifération de la tumeur lorsqu'elle est localisée dans l'œil ou le cerveau. Dans ces conditions, **les Treg seraient pro-tumoraux**. Cependant, avec le docteur Valérie Touitou, nous avons montré que Treg naturels ne sont pas les seuls inducteurs de l'échappement immunitaire du PIOL (voir article en annexe III). En revanche, la déplétion systémique des Treg n'a pas d'effet significatif dans le lymphome intra-splénique. Au vu des écart-types importants, incrémenter cette série par des données supplémentaires nous permettrait de conclure avec plus de certitude quant au rôle des Treg dans cette localisation. Cependant, Hasselblom et coll. montre qu'il n'existe pas de lien entre le nombre de Treg et la survie de patients atteints de DLBCL nodaux. Le rôle des Treg peut alors dépendre de la localisation de la tumeur.

La déplétion de Treg dans des modèles murins de développement tumoral avait déjà été expérimentée. Nous avons la particularité de présenter un modèle de lymphome B dont la

localisation est mieux adaptée pour comprendre les pathologies humaines. Cependant, il est à noter que dans une localisation ectopique, sous-cutanée, Heier et coll. montrent que des LT spléniques déplétés en lymphocytes T CD25⁺ sont plus efficaces que ceux non déplétés à ralentir la progression d'un lymphome issu de la lignée A20 chez une souris Rag2^{-/-}.

Les populations lymphocytaires T bénéficiant de la déplétion des Treg sont les CD8⁺ dans la rate alors que dans les organes immuno-privilégiés étudiés ce sont les sous-populations de CD4⁺ effectrices (Th2 dans le PIOL et Th17 dans le PCL). **Les Treg seraient donc en balance avec différentes populations lymphocytaires T en fonction de la localisation du lymphome** : Treg/TCD8⁺ dans la rate, Treg/Th2 dans l'œil et Treg/Th17 dans le cerveau. Un article récemment paru décrit le potentiel anti-tumoral des lymphocytes Th (et notamment des Th17) dans le micro-environnement tumoral du lymphome folliculaire chez l'Homme lorsque les mécanismes suppresseurs liés à la tumeur sont atténués (Hilchey et al., 2011). En effet, la réactivation des cellules T CD4⁺ du micro-environnement de ce lymphome augmente la proportion des Th2 et des Th17 mais pas des Th1. Ceci est tout à fait en accord avec mes résultats.

Dans les mêmes modèles murins, afin de tester le rôle des cellules productrices d'IL-17, j'ai ciblé la cytokine IL-17. La seule neutralisation de l'IL-17 permet une croissance plus rapide des cellules tumorales A20.IIA-GFP injectées dans le cerveau et la rate mais pas dans l'œil. **L'IL-17 serait anti-tumorale dans le PCL et l'ISL.** J'ai montré que cette cytokine n'agissait pas directement sur la prolifération des cellules A20.IIA-GFP. Les propriétés inflammatoires de l'IL-17, ciblant de nombreuses populations cellulaires, m'ont fait supposer que l'IL-17 pourrait agir via un (ou une série d') intermédiaire sur les cellules lymphomateuses. Dans le cas du PIOL, il est possible que l'intermédiaire en question soit manquant. Notamment, l'IL-17 fournit une « aide » aux LB dans le contexte de la polyarthrite rhumatoïde (Hickman-Brecks et al., 2011). Or, j'ai remarqué que les LB n'infiltraient pas les yeux de souris tumoraux (résultats non montrés). Cette population serait peut-être importante dans l'action anti-tumorale de l'IL-17.

Conclusion et perspectives

Dans ce travail de Thèse, j'ai pu mettre en évidence l'existence d'un infiltrat immunitaire adaptatif dans différentes localisations d'un même lymphome B murin. A l'instar d'autres études, j'ai noté que cet environnement était particulièrement riche en LT CD4⁺ et notamment en Treg. J'ai observé qu'en fonction du type de localisation du lymphome : nodale (dans la rate) ou de type extranodale (dans des sites immuno-privilegiés tels que le cerveau et l'œil), l'infiltrat peut varier.

J'ai montré que des Th17 étaient présents dans le micro-environnement des différentes localisations du lymphome. Cependant, les profils cytokiniques Th17, comme celui des autres Th, sont partiellement inhibés, vraisemblablement en grande partie par les Treg. D'ailleurs, la déplétion des nTreg avant implantation tumorale permet un ralentissement du développement tumoral dans les modèles de lymphomes extranodaux et une augmentation d'autres populations lymphocytaires T. Cette balance homéostatique au sein du compartiment lymphocytaire T est cependant différente en fonction de la localisation du lymphome. Elle penche en faveur des cellules T CD8⁺ dans la rate, vers les Th17 dans le cerveau et vers les Th2 et les Th17 dans l'œil.

J'ai décrypté le rôle propre des Th17 dans le modèle du lymphome intra-oculaire primitif (PIOL) comme étant anti-tumoral. Cette action serait le fruit d'une action directe de l'IL-21 sur les cellules lymphomateuses, inhibant partiellement la prolifération tumorale, et d'une action indirecte, dans le lymphome intra-cérébral primitif (PCL) et le lymphome intra-splénique primitif (ISL), de l'IL-17.

Pour conclure, si l'étude de l'infiltrat immunitaire du micro-environnement du lymphome est restreinte aux marqueurs CD3, CD11b et CD11c, celui-ci semble identique à chaque localisation. Cependant, des différences fines de grande importance existent. Les thérapies immuno-stimulatrices devraient alors être testées dans le traitement des lymphomes B à grandes cellules en tenant particulièrement en compte l'orientation préférentielle des réponses Th anti-tumorales de chaque organe.

Pour aller plus loin dans cette étude, il serait intéressant de rechercher la cause du manque d'efficacité de la neutralisation de l'IL-17 dans le PIOL et de savoir si les lymphocytes B sont

les intermédiaires de la réponse IL-17 anti-tumorale dans l'œil. Pour cela, il faudrait dépléter les LB de souris adultes dans les modèles de PCL et d'ISL et neutraliser l'IL-17 afin de comparer leurs progressions tumorales à celle d'un PIOL. Aussi, il serait intéressant de déterminer si les populations lymphocytaires qui augmentent lors de la déplétion des Treg sont les acteurs directs du ralentissement du développement tumoral. Pour cela, l'idéal serait d'utiliser des souris KO pour : l'IFN γ pour les LT CD8⁺, l'IL-4 et l'IL-13 pour les Th2 et l'IL-17 pour les Th17. Leur capacité à lyser les cellules tumorales pour les LT CD8⁺ et à relarguer leurs cytokines en présence de cellules tumorales *ex vivo* seraient aussi à tester.

L'étude des sous-populations T CD4⁺ effectrices impliquées dans les réponses anti-tumorales a pour but de compléter le traitement de patients réfractaires aux chimiothérapies actuelles qui sont l'association de la chimiothérapie CHOP et de l'anticorps monoclonal anti-CD20. Cibler la sous-population effectrice du type de lymphome voire de sa localisation spécifique serait prendre compte le paramètre de la capacité anti-tumorale du système immunitaire trop longtemps mis de côté (Hanahan and Weinberg, 2011).

Dans un projet plus lointain, il serait intéressant de tester la capacité de cellules T naïves spécifiques de la tumeur à se polariser et la capacité de plasticité de cellules Treg ou Teff dans le micro-environnement tumoral en fonction de la localisation du lymphome B.

A l'avenir, si je devais continuer ce projet, la question m'intéressant le plus serait de savoir quel est le rôle des cellules immunitaires envers le lymphome en fonction de l'état d'inflammation de la localisation avant la tumorigénèse, ceci en partant de l'observation du rôle pro-tumoral de l'IL-17 chez un hôte immuno-déficient en LT et anti-tumoral chez un hôte immuno-compétent ainsi que du rôle pro-tumoral des Th17 uniquement dans les cancers humains se développant dans le colon, l'estomac et le foie.

Bibliographie

- Ahmed, S., Winter, J. N., Gordon, L. I., and Evens, A. M. (2010). Radioimmunotherapy for the treatment of non-Hodgkin lymphoma: current status and future applications. *Leuk Lymphoma* 51, 1163–1177.
- Ai, W. Z., Hou, J.-Z., Zeiser, R., Czerwinski, D., Negrin, R. S., and Levy, R. (2009). Follicular lymphoma B cells induce the conversion of conventional CD4⁺ T cells to T-regulatory cells. *Int. J. Cancer* 124, 239–244.
- Alexander, D. D., Mink, P. J., Adami, H.-O., Chang, E. T., Cole, P., Mandel, J. S., and Trichopoulos, D. (2007). The non-Hodgkin lymphomas: A review of the epidemiologic literature. *Int. J. Cancer* 120, 1–39.
- Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., Boldrick, J. C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., et al. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503–511.
- Armitage, J. O. (2005). Staging Non-Hodgkin Lymphoma. *CA Cancer J Clin* 55, 368–376.
- Baban, B., Chandler, P. R., Johnson, B. A., 3rd, Huang, L., Li, M., Sharpe, M. L., Francisco, L. M., Sharpe, A. H., Blazar, B. R., Munn, D. H., et al. (2011). Physiologic Control of IDO Competence in Splenic Dendritic Cells. *J. Immunol.* 187, 2329–2335.
- Bashir, R., Chamberlain, M., Ruby, E., and Hochberg, F. H. (1996). T-cell infiltration of primary CNS lymphoma. *Neurology* 46, 440–444.
- Benchetrit, F., Ciree, A., Vives, V., Warnier, G., Gey, A., Sautès-Fridman, C., Fossiez, F., Haicheur, N., Fridman, W. H., and Tartour, E. (2002). Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood* 99, 2114–2121.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Fridman, W.-H., and Galon, J. (2011). The prognostic impact of anti-cancer immune response: a novel classification of cancer patients. *Semin Immunopathol.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21461991> [Accessed June 19, 2011].
- Bouchliou, I., Miltiades, P., Nakou, E., Spanoudakis, E., Goutzouvelidis, A., Vakalopoulou, S., Garypidou, V., Kotoula, V., Bourikas, G., Tsatalas, C., et al. (2011). Th17 and Foxp3(+) T regulatory cell dynamics and distribution in myelodysplastic syndromes. *Clin. Immunol* 139, 350–359.
- Brenchley, J. M., Paiardini, M., Knox, K. S., Asher, A. I., Cervasi, B., Asher, T. E., Scheinberg, P., Price, D. A., Hage, C. A., Kholi, L. M., et al. (2008). Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood* 112, 2826–2835.
- Brusamolino, E. (2009). First-line therapy of CD20⁺ diffuse large B-cell lymphoma: facts and open questions. *Haematologica* 94, 1194–1198.

- Callahan, M. K., Wolchok, J. D., and Allison, J. P. (2010). Anti-CTLA-4 antibody therapy: immune monitoring during clinical development of a novel immunotherapy. *Semin. Oncol* 37, 473–484.
- Carbone, A., Gloghini, A., Cabras, A., and Elia, G. (2009). Differentiating germinal center-derived lymphomas through their cellular microenvironment. *Am. J. Hematol* 84, 435–438.
- Di Carlo, E., Forni, G., Lollini, P., Colombo, M. P., Modesti, A., and Musiani, P. (2001). The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood* 97, 339–345.
- Carreras, J., Lopez-Guillermo, A., Fox, B. C., Colomo, L., Martinez, A., Roncador, G., Montserrat, E., Campo, E., and Banham, A. H. (2006). High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* 108, 2957–2964.
- Caspi, R. R. (2006). Ocular autoimmunity: the price of privilege? *Immunol. Rev* 213, 23–35.
- Cassoux, N., Merle-Beral, H., Leblond, V., Bodaghi, B., Miléa, D., Gerber, S., Fardeau, C., Reux, I., Xuan, K. H., Chan, C. C., et al. (2000). Ocular and central nervous system lymphoma: clinical features and diagnosis. *Ocul. Immunol. Inflamm* 8, 243–250.
- Chan, C.-C. (2003). Molecular pathology of primary intraocular lymphoma. *Trans Am Ophthalmol Soc* 101, 275–292.
- Chang, S. H., and Dong, C. (2009). IL-17F: regulation, signaling and function in inflammation. *Cytokine* 46, 7–11.
- Chaput, N., Darrasse-Jèze, G., Bergot, A.-S., Cordier, C., Ngo-Abdalla, S., Klatzmann, D., and Azogui, O. (2007). Regulatory T cells prevent CD8 T cell maturation by inhibiting CD4 Th cells at tumor sites. *J. Immunol* 179, 4969–4978.
- Chen, J. J. W., Lin, Y.-C., Yao, P.-L., Yuan, A., Chen, H.-Y., Shun, C.-T., Tsai, M.-F., Chen, C.-H., and Yang, P.-C. (2005). Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. *J. Clin. Oncol* 23, 953–964.
- Chiu, B. C. H., and Weisenburger, D. D. (2003). An update of the epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Lymphoma* 4, 161–168.
- Cirée, A., Michel, L., Camilleri-Bröet, S., Jean Louis, F., Oster, M., Flageul, B., Senet, P., Fossiez, F., Fridman, W. H., Bachelez, H., et al. (2004). Expression and activity of IL-17 in cutaneous T-cell lymphomas (mycosis fungoides and Sezary syndrome). *Int. J. Cancer* 112, 113–120.
- Codarri, L., Gyölvézi, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., Magnenat, L., Suter, T., and Becher, B. (2011). ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat. Immunol* 12, 560–567.
- Coquet, J. M., Kyparissoudis, K., Pellicci, D. G., Besra, G., Berzins, S. P., Smyth, M. J., and Godfrey, D. I. (2007). IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell

activation and cytokine production. *J. Immunol* 178, 2827–2834.

Cox, C. A., Shi, G., Yin, H., Vistica, B. P., Wawrousek, E. F., Chan, C.-C., and Gery, I. (2008). Both Th1 and Th17 are immunopathogenic but differ in other key biological activities. *J. Immunol* 180, 7414–7422.

Cua, D. J., and Tato, C. M. (2010). Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat. Rev. Immunol* 10, 479–489.

Cua, D. J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C. A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., et al. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421, 744–748.

Darrasse-Jèze, G., Bergot, A.-S., Durgeau, A., Billiard, F., Salomon, B. L., Cohen, J. L., Bellier, B., Podsypanina, K., and Klatzmann, D. (2009). Tumor emergence is sensed by self-specific CD44hi memory Tregs that create a dominant tolerogenic environment for tumors in mice. *J. Clin. Invest* 119, 2648–2662.

Dave, S. S., Wright, G., Tan, B., Rosenwald, A., Gascoyne, R. D., Chan, W. C., Fisher, R. I., Braziel, R. M., Rimsza, L. M., Grogan, T. M., et al. (2004). Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N. Engl. J. Med* 351, 2159–2169.

Delsol, G. (2010). [Molecular abnormalities in lymphomas]. *Bull Cancer* 97, 1347–1364.

Derhovanessian, E., Adams, V., Hähnel, K., Groeger, A., Pandha, H., Ward, S., and Pawelec, G. (2009). Pretreatment frequency of circulating IL-17+ CD4+ T-cells, but not Tregs, correlates with clinical response to whole-cell vaccination in prostate cancer patients. *Int. J. Cancer* 125, 1372–1379.

Dhodapkar, K. M., Barbuto, S., Matthews, P., Kukreja, A., Mazumder, A., Vesole, D., Jagannath, S., and Dhodapkar, M. V. (2008). Dendritic cells mediate the induction of polyfunctional human IL17-producing cells (Th17-1 cells) enriched in the bone marrow of patients with myeloma. *Blood* 112, 2878–2885.

Dieu-Nosjean, M.-C., Antoine, M., Danel, C., Heudes, D., Wislez, M., Poulot, V., Rabbe, N., Laurans, L., Tartour, E., de Chaisemartin, L., et al. (2008). Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J. Clin. Oncol* 26, 4410–4417.

Dominguez-Villar, M., and Hafler, D. A. (2011). Immunology. An innate role for IL-17. *Science* 332, 47–48.

Drach, J., Seidl, S., and Kaufmann, H. (2005). Treatment of mantle cell lymphoma: targeting the microenvironment. *Expert Rev Anticancer Ther* 5, 477–485.

Dunleavy, K., Pittaluga, S., Czuczman, M. S., Dave, S. S., Wright, G., Grant, N., Shovlin, M., Jaffe, E. S., Janik, J. E., Staudt, L. M., et al. (2009). Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 113, 6069–6076.

Elmasri, W. M., Tran, T. H., and Mulla, Z. D. (2010). A case-control study of asthma and

ovarian cancer. *Arch Environ Occup Health* 65, 101–105.

- Elpek, K. G., Lacelle, C., Singh, N. P., Yolcu, E. S., and Shirwan, H. (2007). CD4+CD25+ T regulatory cells dominate multiple immune evasion mechanisms in early but not late phases of tumor development in a B cell lymphoma model. *J. Immunol* 178, 6840–6848.
- von Euw, E., Chodon, T., Attar, N., Jalil, J., Koya, R. C., Comin-Anduix, B., and Ribas, A. (2009). CTLA4 blockade increases Th17 cells in patients with metastatic melanoma. *J Transl Med* 7, 35.
- Farinha, P., and Gascoyne, R. D. (2005). Molecular pathogenesis of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *J. Clin. Oncol* 23, 6370–6378.
- Feller, A. C., Diebold, J., and Lennert, K. (2004). Histopathology of nodal and extranodal non-Hodgkin's lymphomas: based on the WHO classification (Springer).
- Fijak, M., Bhushan, S., and Meinhardt, A. (2011). Immunoprivileged sites: the testis. *Methods Mol. Biol* 677, 459–470.
- Flinsenbergh, T. W. H., Compeer, E. B., Boelens, J. J., et Boes, M. (2011). Antigen cross-presentation: extending recent laboratory findings to therapeutic intervention. *Clin. Exp. Immunol.* 165, 8-18.
- Flowers, C. R., Sinha, R., and Vose, J. M. (2010). Improving Outcomes for Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma. CA: A Cancer Journal for Clinicians. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.20087/pdf> [Accessed February 7, 2011].
- Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G. S., and Albelda, S. M. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 16, 183–194.
- Fridman, W. H., Mlecnik, B., Bindea, G., Pagès, F., and Galon, J. (2011). Immunosurveillance in human non-viral cancers. *Curr. Opin. Immunol* 23, 272–278.
- Gerstner, E. R., and Batchelor, T. T. (2010). Primary central nervous system lymphoma. *Arch. Neurol* 67, 291–297.
- Godfrey, D. I., and Rossjohn, J. (2011). New ways to turn on NKT cells. *J. Exp. Med* 208, 1121–1125.
- Golgher, D., Jones, E., Powrie, F., Elliott, T., and Gallimore, A. (2002). Depletion of CD25+ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens. *Eur. J. Immunol* 32, 3267–3275.
- Gomes, A. Q., Martins, D. S., and Silva-Santos, B. (2010). Targeting $\gamma\delta$ T lymphocytes for cancer immunotherapy: from novel mechanistic insight to clinical application. *Cancer Res* 70, 10024–10027.
- Grille, S., Brugnini, A., Nese, M., Corley, E., Falkenberg, F. W., Lens, D., and Chabalgoity, J. A. (2010). A B-cell lymphoma vaccine using a depot formulation of interleukin-2

induces potent antitumor immunity despite increased numbers of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunol. Immunother* 59, 519–527.

- Groves, F. D., Linet, M. S., Travis, L. B., and Devesa, S. S. (2000). Cancer surveillance series: non-Hodgkin's lymphoma incidence by histologic subtype in the United States from 1978 through 1995. *J. Natl. Cancer Inst* 92, 1240–1251.
- Gurbuxani, S., Gurbaxani, S., Anastasi, J., and Hyjek, E. (2009). Diffuse large B-cell lymphoma--more than a diffuse collection of large B cells: an entity in search of a meaningful classification. *Arch. Pathol. Lab. Med* 133, 1121–1134.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., and Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol* 6, 1123–1132.
- Hasselblom, S., Sigurdadottir, M., Hansson, U., Nilsson-Ehle, H., Ridell, B., and Andersson, P.-O. (2007). The number of tumour-infiltrating TIA-1⁺ cytotoxic T cells but not FOXP3⁺ regulatory T cells predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol* 137, 364–373.
- He, D., Li, H., Yusuf, N., Elmets, C. A., Li, J., Mountz, J. D., and Xu, H. (2010). IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells. *J. Immunol* 184, 2281–2288.
- He, R., Kim, H. Y., Yoon, J., Oyoshi, M. K., MacGinnitie, A., Goya, S., Freyschmidt, E.-J., Bryce, P., McKenzie, A. N. J., Umetsu, D. T., et al. (2009). Exaggerated IL-17 response to epicutaneous sensitization mediates airway inflammation in the absence of IL-4 and IL-13. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124, 761-770.e1.
- Heier, I., Hofgaard, P. O., Brandtzaeg, P., Jahnsen, F. L., and Karlsson, M. (2008). Depletion of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells inhibits local tumour growth in a mouse model of B cell lymphoma. *Clin. Exp. Immunol* 152, 381–387.
- Hickman-Brecks, C. L., Racz, J. L., Meyer, D. M., LaBranche, T. P., et Allen, P. M. (2011). Th17 cells can provide B cell help in autoantibody induced arthritis. *J. Autoimmun.* 36, 65-75.
- Hilchey, S. P., Rosenberg, A. F., Hyrien, O., Secor-Socha, S., Cochran, M. R., Brady, M. T., Wang, J.-C. E., Sanz, I., Burack, W. R., Quataert, S. A., et al. (2011). Follicular lymphoma tumor infiltrating T-helper (TH) cells have the same polyfunctional potential as normal nodal TH cells despite skewed differentiation. *Blood*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21821704> [Accessed August 20, 2011].
- Hirota, K., Duarte, J. H., Veldhoen, M., Hornsby, E., Li, Y., Cua, D. J., Ahlfors, H., Wilhelm, C., Tolaini, M., Menzel, U., et al. (2011). Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat. Immunol* 12, 255–263.

- Holopainen, T., Bry, M., Alitalo, K., and Saaristo, A. (2011). Perspectives on lymphangiogenesis and angiogenesis in cancer. *J Surg Oncol* 103, 484–488.
- Horlock, C., Stott, B., Dyson, P. J., Morishita, M., Coombes, R. C., Savage, P., and Stebbing, J. (2009). The effects of trastuzumab on the CD4+CD25+FoxP3+ and CD4+IL17A+ T-cell axis in patients with breast cancer. *Br. J. Cancer* 100, 1061–1067.
- Hu, Y., Ota, N., Peng, I., Refino, C. J., Danilenko, D. M., Caplazi, P., and Ouyang, W. (2010). IL-17RC is required for IL-17A- and IL-17F-dependent signaling and the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol* 184, 4307–4316.
- Hu, Y., Shen, F., Crellin, N. K., and Ouyang, W. (2011). The IL-17 pathway as a major therapeutic target in autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 1217, 60–76.
- Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D., and Levitsky, H. (1998). The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J. Exp. Med* 188, 2357–2368.
- Hussell, T., Isaacson, P. G., Crabtree, J. E., et Spencer, J. (1993). The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*. *Lancet* 342, 571–574.
- Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S., et Nakae, S. (2011). Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* 34, 149–162.
- Jaffe, E. S. (2009). The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 523–531.
- Jäger, A., and Kuchroo, V. K. (2010). Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scand. J. Immunol* 72, 173–184.
- Jelić, S., and Filipović-Ljesković, I. (1999). Positive serology for Lyme disease borrelias in primary cutaneous B-cell lymphoma: a study in 22 patients; is it a fortuitous finding? *Hematol Oncol* 17, 107–116.
- de Jong, D., and Enblad, G. (2008). Inflammatory cells and immune microenvironment in malignant lymphoma. *Journal of Internal Medicine* 264, 528–536.
- Jin, H., Oyoshi, M. K., Le, Y., Bianchi, T., Koduru, S., Mathias, C. B., Kumar, L., Le Bras, S., Young, D., Collins, M., et al. (2009). IL-21R is essential for epicutaneous sensitization and allergic skin inflammation in humans and mice. *J. Clin. Invest.* 119, 47–60.
- June, C. H. (2007). Principles of adoptive T cell cancer therapy. *J. Clin. Invest* 117, 1204–1212.
- Juszczynski, P., Nowak, J., and Warzocha, K. (2008). Host immune response in B-cell lymphomas: friend or foe? *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 56, 245–255.
- Jutel, M., and Akdis, C. A. (2011). T-cell subset regulation in atopy. *Curr Allergy Asthma*

Rep 11, 139–145.

- Kagami, Y., Jung, J., Choi, Y. S., Osumi, K., Nakamura, S., Morishima, Y., and Seto, M. (2001). Establishment of a follicular lymphoma cell line (FLK-1) dependent on follicular dendritic cell-like cell line HK. *Leukemia* 15, 148–156.
- Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., and Prat, A. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med* 13, 1173–1175.
- Kim, J. M., Rasmussen, J. P., and Rudensky, A. Y. (2007). Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat. Immunol* 8, 191–197.
- Kim, K. J., Kanellopoulos-Langevin, C., Merwin, R. M., Sachs, D. H., and Asofsky, R. (1979). Establishment and characterization of BALB/c lymphoma lines with B cell properties. *J. Immunol* 122, 549–554.
- Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V., and Bettelli, E. (2007). Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin. Immunol* 19, 362–371.
- Kortylewski, M., Xin, H., Kujawski, M., Lee, H., Liu, Y., Harris, T., Drake, C., Pardoll, D., and Yu, H. (2009). Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 15, 114–123.
- Koyama, K., Kagamu, H., Miura, S., Hiura, T., Miyabayashi, T., Itoh, R., Kuriyama, H., Tanaka, H., Tanaka, J., Yoshizawa, H., et al. (2008). Reciprocal CD4⁺ T-cell balance of effector CD62L^{low} CD4⁺ and CD62L^{high}CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in small cell lung cancer reflects disease stage. *Clin. Cancer Res* 14, 6770–6779.
- Kryczek, I., Banerjee, M., Cheng, P., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., Huang, E., Finlayson, E., Simeone, D., Welling, T. H., et al. (2009a). Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 114, 1141–1149.
- Kryczek, I., Wei, S., Szeliga, W., Vatan, L., and Zou, W. (2009b). Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood* 114, 357–359.
- Kryczek, I., Wei, S., Zou, L., Altuwaijri, S., Szeliga, W., Kolls, J., Chang, A., and Zou, W. (2007). Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J. Immunol* 178, 6730–6733.
- Kryczek, I., Wu, K., Zhao, E., Wei, S., Vatan, L., Szeliga, W., Huang, E., Greenson, J., Chang, A., Roliński, J., et al. (2011). IL-17⁺ regulatory T cells in the microenvironments of chronic inflammation and cancer. *J. Immunol* 186, 4388–4395.
- Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A., and Cua, D. J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med* 201, 233–240.
- Lee, N.-R., Song, E.-K., Jang, K. Y., Choi, H. N., Moon, W. S., Kwon, K., Lee, J.-H., Yim, C.-Y., and Kwak, J.-Y. (2008). Prognostic impact of tumor infiltrating FOXP3

positive regulatory T cells in diffuse large B-cell lymphoma at diagnosis. *Leuk. Lymphoma* 49, 247–256.

- Lenz, G., and Staudt, L. M. (2010). Aggressive lymphomas. *N. Engl. J. Med* 362, 1417–1429.
- Leveque, L., Deknuydt, F., Bioley, G., Old, L. J., Matsuzaki, J., Odunsi, K., Ayyoub, M., and Valmori, D. (2009). Interleukin 2-mediated conversion of ovarian cancer-associated CD4⁺ regulatory T cells into proinflammatory interleukin 17-producing helper T cells. *J. Immunother* 32, 101–108.
- Lindqvist, C. A., Christiansson, L. H., Simonsson, B., Enblad, G., Olsson-Strömberg, U., and Loskog, A. S. I. (2010). T regulatory cells control T-cell proliferation partly by the release of soluble CD25 in patients with B-cell malignancies. *Immunology* 131, 371–376.
- López-Guillermo, A., Colomo, L., Jiménez, M., Bosch, F., Villamor, N., Arenillas, L., Muntanola, A., Montoto, S., Giné, E., Colomer, D., et al. (2005). Diffuse large B-cell lymphoma: clinical and biological characterization and outcome according to the nodal or extranodal primary origin. *J. Clin. Oncol* 23, 2797–2804.
- Louten, J., Boniface, K., and de Waal Malefyt, R. (2009). Development and function of TH17 cells in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol* 123, 1004–1011.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23, 549–555.
- Martin-Orozco, N., and Dong, C. (2009). The IL-17/IL-23 axis of inflammation in cancer: friend or foe? *Curr Opin Investig Drugs* 10, 543–549.
- Martin-Orozco, N., Muranski, P., Chung, Y., Yang, X. O., Yamazaki, T., Lu, S., Hwu, P., Restifo, N. P., Overwijk, W. W., and Dong, C. (2009). T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* 31, 787–798.
- Mattarollo, S. R., and Smyth, M. J. (2010). A novel axis of innate immunity in cancer. *Nat. Immunol* 11, 981–982.
- McGeachy, M. J., and Cua, D. J. (2007). The link between IL-23 and Th17 cell-mediated immune pathologies. *Semin. Immunol* 19, 372–376.
- McKenna, K. C., and Chen, P. W. (2010). Influence of immune privilege on ocular tumor development. *Ocul. Immunol. Inflamm* 18, 80–90.
- MEDAWAR, P. B. (1948). Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol* 29, 58–69.
- Meyer, R. G., and Herr, W. (2010). Addressing tumour tolerance to improve cancer immunotherapy. *Eur. J. Immunol* 40, 3302–3305.
- Minegishi, Y., Saito, M., Nagasawa, M., Takada, H., Hara, T., Tsuchiya, S., Agematsu, K., Yamada, M., Kawamura, N., Ariga, T., et al. (2009). Molecular explanation for the

contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome. *J. Exp. Med* 206, 1291–1301.

- Miossec, P. (2009). IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microbes Infect* 11, 625–630.
- Miyahara, Y., Odunsi, K., Chen, W., Peng, G., Matsuzaki, J., and Wang, R.-F. (2008). Generation and regulation of human CD4⁺ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105, 15505–15510.
- Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol* 7, 145–173.
- Mueller, C. G., Boix, C., Kwan, W.-H., Daussy, C., Fournier, E., Fridman, W. H., and Molina, T. J. (2007). Critical role of monocytes to support normal B cell and diffuse large B cell lymphoma survival and proliferation. *J. Leukoc. Biol.* 82, 567–575.
- Müller, A. M. S., Ihorst, G., Mertelsmann, R., and Engelhardt, M. (2004). Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. *Ann Hematol* 84, 1–12.
- Muranski, P., Boni, A., Antony, P. A., Cassard, L., Irvine, K. R., Kaiser, A., Paulos, C. M., Palmer, D. C., Touloukian, C. E., Ptak, K., et al. (2008). Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* 112, 362–373.
- Niederhorn, J. Y. (2006). See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nat. Immunol* 7, 354–359.
- Niederhorn, J. Y., and Stein-Streilein, J. (2010). History and physiology of immune privilege. *Ocul. Immunol. Inflamm* 18, 19–23.
- Numasaki, M., Fukushima, J.-ichi, Ono, M., Narula, S. K., Zavodny, P. J., Kudo, T., Robbins, P. D., Tahara, H., and Lotze, M. T. (2003). Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 101, 2620–2627.
- Numasaki, M., Watanabe, M., Suzuki, T., Takahashi, H., Nakamura, A., McAllister, F., Hishinuma, T., Goto, J., Lotze, M. T., Kolls, J. K., et al. (2005). IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J. Immunol* 175, 6177–6189.
- Nurieva, R., Yang, X. O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A. D., Ma, L., Schluns, K., Tian, Q., Watowich, S. S., Jetten, A. M., et al. (2007). Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448, 480–483.
- OLD, L. J., and BOYSE, E. A. (1964). IMMUNOLOGY OF EXPERIMENTAL TUMORS. *Annu. Rev. Med* 15, 167–186.
- Oldford, S. A., Haidl, I. D., Howatt, M. A., Leiva, C. A., Johnston, B., and Marshall, J. S. (2010). A critical role for mast cells and mast cell-derived IL-6 in TLR2-mediated inhibition of tumor growth. *J. Immunol* 185, 7067–7076.

- Oniki, S., Nagai, H., Horikawa, T., Furukawa, J., Belladonna, M. L., Yoshimoto, T., Hara, I., and Nishigori, C. (2006). Interleukin-23 and interleukin-27 exert quite different antitumor and vaccine effects on poorly immunogenic melanoma. *Cancer Res* 66, 6395–6404.
- Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., and Nakayama, E. (1999). Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 59, 3128–3133.
- Orsborne, C., and Byers, R. (2011). Impact of gene expression profiling in lymphoma diagnosis and prognosis. *Histopathology* 58, 106–127.
- Ortolani, C. (2011). *Flow Cytometry of Hematological Malignancies* (John Wiley & Sons).
- Ouyang, W., Kolls, J. K., and Zheng, Y. (2008). The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28, 454–467.
- De Paepe, P., and De Wolf-Peeters, C. (2007). Diffuse large B-cell lymphoma: a heterogeneous group of non-Hodgkin lymphomas comprising several distinct clinicopathological entities. *Leukemia* 21, 37–43.
- Pagès, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Asslaber, M., Tosolini, M., Bindea, G., Lagorce, C., Wind, P., Marliot, F., Bruneval, P., et al. (2009). In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J. Clin. Oncol* 27, 5944–5951.
- Phillips-Quagliata, J. M., Faria, A. M., Han, J., Spencer, D. H., Haughton, G., et Casali, P. (1999). The IgG2a/IgA produced by the murine T560 B lymphoma that arose during a graft-versus-host reaction is polyreactive and somatically mutated. *Autoimmunity* 29, 215–233.
- Platonova, S., Cherfils-Vicini, J., Damotte, D., Crozet, L., Vieillard, V., Validire, P., André, P., Dieu-Nosjean, M.-C., Alifano, M., Régnard, J.-F., et al. (2011). Profound Coordinated Alterations of Intratumoral NK Cell Phenotype and Function in Lung Carcinoma. *Cancer Res*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21708957> [Accessed August 15, 2011].
- Pongcharoen, S., Niumsup, P., Sanguansermisri, D., Supalap, K., and Butkhamchot, P. (2006). The Effect of Interleukin-17 on the Proliferation and Invasion of JEG-3 Human Choriocarcinoma Cells. *American Journal of Reproductive Immunology* 55, 291–300.
- Porrata, L. F., Ristow, K., Habermann, T., Inwards, D. J., Micallef, I. N., and Markovic, S. N. (2010). Predicting survival for diffuse large B-cell lymphoma patients using baseline neutrophil/lymphocyte ratio. *Am. J. Hematol* 85, 896–899.
- Prichard, M., Harris, T., Williams, M. E., and Densmore, J. J. (2009). Treatment strategies for relapsed and refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Expert Opin Pharmacother* 10, 983–995.
- Puel, A., Cypowyj, S., Bustamante, J., Wright, J. F., Liu, L., Lim, H. K., Migaud, M., Israel, L., Chrabieh, M., Audry, M., et al. (2011). Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* 332, 65–68.

- Qureshi, O. S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E. M., Baker, J., Jeffery, L. E., Kaur, S., Briggs, Z., et al. (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332, 600–603.
- Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., Uccelli, A., Lanzavecchia, A., Engelhardt, B., and Sallusto, F. (2009). C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat. Immunol* 10, 514–523.
- Riemersma, S. A., Oudejans, J. J., Vonk, M. J., Dreef, E. J., Prins, F. A., Jansen, P. M., Vermeer, M. H., Blok, P., Kibbelaar, R. E., Muris, J. J. F., et al. (2005). High numbers of tumour-infiltrating activated cytotoxic T lymphocytes, and frequent loss of HLA class I and II expression, are features of aggressive B cell lymphomas of the brain and testis. *J. Pathol* 206, 328–336.
- Roman, E., and Smith, A. G. (2011). Epidemiology of lymphomas. *Histopathology* 58, 4–14.
- Rosenwald, A., Wright, G., Leroy, K., Yu, X., Gaulard, P., Gascoyne, R. D., Chan, W. C., Zhao, T., Haioun, C., Greiner, T. C., et al. (2003). Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J. Exp. Med* 198, 851–862.
- Ruffell, B., DeNardo, D. G., Affara, N. I., and Coussens, L. M. (2010). Lymphocytes in cancer development: polarization towards pro-tumor immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 21, 3–10.
- Sakaguchi, S., Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., and Yamaguchi, T. (2009). Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int. Immunol* 21, 1105–1111.
- Sarosiek, K. A., Malumbres, R., Nechushtan, H., Gentles, A. J., Avisar, E., and Lossos, I. S. (2010). Novel IL-21 signaling pathway up-regulates c-Myc and induces apoptosis of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 115, 570–580.
- Schmidt-Weber, C. B., Akdis, M., and Akdis, C. A. (2007). TH17 cells in the big picture of immunology. *J. Allergy Clin. Immunol* 120, 247–254.
- Schultz, C. J., and Bovi, J. (2010). Current management of primary central nervous system lymphoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys* 76, 666–678.
- Sfanos, K. S., Bruno, T. C., Maris, C. H., Xu, L., Thoburn, C. J., DeMarzo, A. M., Meeker, A. K., Isaacs, W. B., and Drake, C. G. (2008). Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin. Cancer Res* 14, 3254–3261.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107–1111.
- Sharma, M. D., Hou, D.-Y., Baban, B., Koni, P. A., He, Y., Chandler, P. R., Blazar, B. R., Mellor, A. L., and Munn, D. H. (2010). Reprogrammed foxp3(+) regulatory T cells provide essential help to support cross-presentation and CD8(+) T cell priming in naive mice. *Immunity* 33, 942–954.

- Shevach, E. M. (2009). Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30, 636–645.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S. (1999). Induction of tumor immunity by removing CD25⁺CD4⁺ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J. Immunol* 163, 5211–5218.
- Smedby, K. E., Baecklund, E., and Askling, J. (2006). Malignant lymphomas in autoimmunity and inflammation: a review of risks, risk factors, and lymphoma characteristics. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 15, 2069–2077.
- Smith, A., Roman, E., Howell, D., Jones, R., Patmore, R., and Jack, A. (2010). The Haematological Malignancy Research Network (HMRN): a new information strategy for population based epidemiology and health service research. *Br. J. Haematol* 148, 739–753.
- Søndergaard, H., and Skak, K. (2009). IL-21: roles in immunopathology and cancer therapy. *Tissue Antigens* 74, 467–479.
- Spolski, R., and Leonard, W. J. (2008a). Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol* 26, 57–79.
- Spolski, R., and Leonard, W. J. (2008b). The Yin and Yang of interleukin-21 in allergy, autoimmunity and cancer. *Curr. Opin. Immunol* 20, 295–301.
- Stockinger, B., and Veldhoen, M. (2007). Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr. Opin. Immunol* 19, 281–286.
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., and Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655–669.
- Takeuchi, M., Alard, P., and Streilein, J. W. (1998). TGF-beta promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. *J. Immunol* 160, 1589–1597.
- Tanaka, H., Tanaka, J., Kjaergaard, J., and Shu, S. (2002). Depletion of CD4⁺ CD25⁺ regulatory cells augments the generation of specific immune T cells in tumor-draining lymph nodes. *J. Immunother* 25, 207–217.
- Tartour, E., Fossiez, F., Joyeux, I., Galinha, A., Gey, A., Claret, E., Sastre-Garau, X., Couturier, J., Mosseri, V., Vives, V., et al. (1999). Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res* 59, 3698–3704.
- Terabe, M., et Berzofsky, J. A. (2008). The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv. Cancer Res.* 101, 277–348.
- Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., Berger, A., Bruneval, P., Fridman, W.-H., Pagès, F., et al. (2011). Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 71, 1263–1271.

- Touitou, V., Daussy, C., Bodaghi, B., Camelo, S., de Kozak, Y., Lehoang, P., Naud, M.-C., Varin, A., Thillaye-Goldenberg, B., Merle-Béral, H., et al. (2007). Impaired th1/tc1 cytokine production of tumor-infiltrating lymphocytes in a model of primary intraocular B-cell lymphoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 48, 3223–3229.
- Tran Thang, N. N., Derouazi, M., Philippin, G., Arcidiaco, S., Di Berardino-Besson, W., Masson, F., Hoepner, S., Riccadonna, C., Burkhardt, K., Guha, A., et al. (2010). Immune infiltration of spontaneous mouse astrocytomas is dominated by immunosuppressive cells from early stages of tumor development. *Cancer Res.* 70, 4829–4839.
- Tzankov, A., Meier, C., Hirschmann, P., Went, P., Pileri, S. A., and Dirnhofer, S. (2008). Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 93, 193–200.
- Tzartos, J. S., Craner, M. J., Friese, M. A., Jakobsen, K. B., Newcombe, J., Esiri, M. M., and Fugger, L. (2011). IL-21 and IL-21 receptor expression in lymphocytes and neurons in multiple sclerosis brain. *Am. J. Pathol* 178, 794–802.
- van de Veerdonk, F. L., Gresnigt, M. S., Kullberg, B. J., van der Meer, J. W. M., Joosten, L. A. B., and Netea, M. G. (2009). Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB Rep* 42, 776–787.
- Verkarre, V., Romana, S.-P., and Cerf-Bensussan, N. (2004). Gluten-free diet, chromosomal abnormalities, and cancer risk in coeliac disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 38, 140–142.
- Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D., and Smyth, M. J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol* 29, 235–271.
- Vignali, D. A. A., Collison, L. W., and Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol* 8, 523–532.
- Wainwright, D. A., Sengupta, S., Han, Y., Ulasov, I. V., and Lesniak, M. S. (2010). The presence of IL-17A and T helper 17 cells in experimental mouse brain tumors and human glioma. *PLoS ONE* 5, e15390.
- Wang, L., Yi, T., Kortylewski, M., Pardoll, D. M., Zeng, D., and Yu, H. (2009). IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J. Exp. Med* 206, 1457–1464.
- Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R., and Harrington, L. E. (2007). IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol* 25, 821–852.
- Wu, S., Rhee, K.-J., Albesiano, E., Rabizadeh, S., Wu, X., Yen, H.-R., Huso, D. L., Brancati, F. L., Wick, E., McAllister, F., et al. (2009). A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat. Med* 15, 1016–1022.
- Yamazaki, S., and Steinman, R. M. (2009). Dendritic cells as controllers of antigen-specific

Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Dermatol. Sci* 54, 69–75.

- Yang, X. D., Ai, W., Asfaha, S., Bhagat, G., Friedman, R. A., Jin, G., Park, H., Shykind, B., Diacovo, T. G., Falus, A., et al. (2011). Histamine deficiency promotes inflammation-associated carcinogenesis through reduced myeloid maturation and accumulation of CD11b⁺Ly6G⁺ immature myeloid cells. *Nat. Med.* 17, 87-95.
- Yang, Z., Zhang, B., Li, D., Lv, M., Huang, C., Shen, G.-X., and Huang, B. (2010). Mast cells mobilize myeloid-derived suppressor cells and Treg cells in tumor microenvironment via IL-17 pathway in murine hepatocarcinoma model. *PLoS ONE* 5, e8922.
- Yang, Z.-Z., Novak, A. J., Stenson, M. J., Witzig, T. E., and Ansell, S. M. (2006). Intratumoral CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4⁺ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 107, 3639–3646.
- Yang, Z.-Z., Novak, A. J., Ziesmer, S. C., Witzig, T. E., and Ansell, S. M. (2009). Malignant B cells skew the balance of regulatory T cells and TH17 cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 69, 5522–5530.
- Yao, Z., Painter, S. L., Fanslow, W. C., Ulrich, D., Macduff, B. M., Spriggs, M. K., and Armitage, R. J. (1995). Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J. Immunol* 155, 5483–5486.
- Yoshimura, T., Sonoda, K.-H., Miyazaki, Y., Iwakura, Y., Ishibashi, T., Yoshimura, A., and Yoshida, H. (2008). Differential roles for IFN-gamma and IL-17 in experimental autoimmune uveoretinitis. *Int. Immunol* 20, 209–214.
- Zhang, B., Rong, G., Wei, H., Zhang, M., Bi, J., Ma, L., Xue, X., Wei, G., Liu, X., and Fang, G. (2008). The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 374, 533–537.
- Zhang, J.-P., Yan, J., Xu, J., Pang, X.-H., Chen, M.-S., Li, L., Wu, C., Li, S.-P., and Zheng, L. (2009). Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J. Hepatol* 50, 980–989.
- Zheng, W., and Flavell, R. A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587–596.
- Zhou, L., Ivanov, I. I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D. E., Leonard, W. J., and Littman, D. R. (2007). IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat. Immunol* 8, 967–974.
- Zucca, E. (2008). Extranodal lymphoma: a reappraisal. *Ann. Oncol* 19 Suppl 4, iv77–iv80.

Annexes

- I. Article « Cytokine profile in human eyes with intraocular lymphoma: contribution of a new cytokine combination for differential diagnosis with uveitis »

En préparation

II. Revue « Murine models of B cell lymphomas : promising tools for designing cancer therapies »

Sous press dans "Advances in hematology"

- III. Article « Naturally occurring CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells participate in but do not govern immune escape in primary intraocular lymphoma »

En préparation

IV. Matériel et méthodes

a. Figure 13

La procédure utilisée a été décrite dans l'article 2. Les séquences des amorces sont les suivantes : TGFβ1 sens TGCGCTTGCAGAGATTAAAA, TGFβ1 antisens CTGCCGTACAACCTCCAGTGA, TGFβ2 sens GACCCCACATCTCCTGCTAA, TGFβ2 antisens TGGTCGTCATCGTTGTCATT, TGFβ3 sens GATGAGCACATAGCCAAGCA, TGFβ3 antisens ATTGGGCTGAAAGGTGTGAC.

b. Figure 15 et 16

L'anticorps monoclonal 4A9 anti-IL-21R est couplé à la phycoérythrine et provient de chez Biolegend.

c. Figure 17

L'anticorps monoclonal PC61 anti-CD25 est déplétant. Il provient de chez BioXcell. L'anticorps monoclonal 7D4 anti-CD25 est couplé à la phycoérythrine et provient de chez BD Pharmingen.

d. Figure 18

L'anticorps monoclonal 53-6.7 anti-CD8 est couplé à l'eFluor 450 et provient de chez eBioscience. L'anticorps monoclonal 150D anti-Foxp3 est couplé à la phycoérythrine et provient de chez Biolegend. L'anticorps monoclonal BVD6-24G2 anti-IL-4 est couplé au tandem phycoérythrine-cyanine 7 et provient de chez eBioscience. L'anticorps monoclonal XMG1.2 anti-IFNγ est couplé à l'alexa fluor 647 et provient de chez BD Pharmingen.

e. Figure 19

L'anticorps monoclonal 17F3 anti-IL-17 est neutralisant. Il provient de chez BioXcell.