



HAL
open science

Cancer du poumon / Réponse immunitaire locale - modulation tumeur dépendante

Sophie Derniame

► **To cite this version:**

Sophie Derniame. Cancer du poumon / Réponse immunitaire locale - modulation tumeur dépendante. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2006. Français. NNT : 2006NAN10097 . tel-01748176

HAL Id: tel-01748176

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748176>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UCD UHP NANCY 1
54500 Vandœuvre-lès-Nancy
Axe de Service Biologie - CS 20148
54601 VILLERS LÈS NANCY CEDEX

FACULTE DES SCIENCES & TECHNIQUES

U.F.R Sciences & Techniques biologiques

Ecole Doctorale Biologie, Santé et Environnement (BioSE)

Département de Formation Doctorale Biologie Cellulaire -Immunologie

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I

en Biologie Cellulaire

par Sophie DERNIAME

**Cancer du poumon / Réponse immunitaire locale –
modulation tumeur dépendante**

Soutenance publique le 10 Juillet 2006

Membres du jury :

Rapporteurs :	Estelle SEILLES	Professeur, Université de Franche-Comté, Besançon
	Patrizia D'ALESSIO	Docteur (HDR), Université Paris XI
Examineurs :	Marie-Christine BENE	Professeur, UHP Nancy I (Directeur de thèse)
	Gilbert FAURE	Professeur, UHP Nancy I
	Jean-Louis MERLIN	Professeur, UHP Nancy I

Laboratoire d'Immunologie, EA4002-IFR 111
Faculté de Médecine - 54500 Vandœuvre-lès-Nancy

REMERCIEMENTS

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE SCIENCES
N° 20148
CEDEX

Je voudrais tout d'abord remercier la Ligue contre le Cancer de Meurthe et Moselle qui m'a accordé une bourse de doctorat finançant mes trois premières années de thèse (2003-2005), ainsi que la Ligue Nationale contre le Cancer qui m'a accordé une bourse de doctorat de six mois en 2006. Elles ont rendu ce travail possible.

Je voudrais également remercier les membres du jury.
Madame Estelle Seillès et Madame Patrizia D'Allessio qui ont bien voulu rapporter sur ce document.

Marie-Christine Béné qui a encadré la réalisation de ce travail, pour ses nombreux conseils.
Et Gilbert Faure qui m'a accueillie au sein de son laboratoire, pour les leçons qu'il m'a prodiguées.

Je remercie également tous les membres du laboratoire qui m'ont aidée dans ce travail.

Un très gros merci à toute ma famille qui m'a entourée et soutenue à chaque instant. J'ai également une pensée très émue pour ceux qui ne sont plus mais qui restent très présents dans mon cœur.

Je tiens enfin à remercier tous mes amis qui ont su m'aider et surtout me supporter même dans les moments les plus difficiles.

LISTE DES ABREVIATIONS.....	8
LISTE DES FIGURES.....	10
LISTE DES TABLEAUX	14
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	17
1. PREAMBULE	18
2. LE CANCER DU POUMON.....	20
2.1. Le poumon : constitution et rôle :	20
2.2. Epidémiologie du cancer bronchique non-à petites cellules (CBNPC)	21
2.2.1. Incidence et mortalité du cancer du poumon	21
2.2.2. Les facteurs de risque	24
2.2.2.1. Le tabagisme	24
2.2.2.1.1. Tabagisme actif.....	24
2.2.2.1.2. Tabagisme passif.....	27
2.2.2.2. L'amiante	28
2.2.2.3. Le radon	28
2.2.2.4. Les facteurs de risque professionnels	29
2.2.2.5. Le régime alimentaire.....	29
2.2.2.6. Les susceptibilités génétiques	31
2.2.2.7. Autres facteurs de risque	32
2.3. Types histologiques.....	32
2.3.1. Les cancers bronchiques non-à petites cellules.....	32
2.3.1.1. Adénocarcinomes.....	33
2.3.1.2. Carcinomes épidermoïdes	34
2.3.1.3. Carcinomes à grandes cellules	35
2.3.2. Les cancers bronchiques à petites cellules.....	36
2.4. Processus de carcinogenèse bronchique	37
2.4.1. Les différentes étapes de l'oncogénèse	38
2.4.2. Altérations géniques	39
2.4.2.1. Oncogènes	41
2.4.2.1.1. Gènes de la famille ras.....	42

2.4.2.1.2.	ErbB.....	42
2.4.2.1.3.	Cyclooxygénase 1 et 2 (COX-1-2).....	42
2.4.2.1.4.	Bombésine/gastrin releasing peptide (GRP).....	43
2.4.2.1.5.	Bcl-2.....	43
2.4.2.2.	Gènes suppresseurs de tumeurs.....	44
2.4.2.2.1.	p53.....	44
2.4.2.2.2.	Voie p16-Cycline-D1-Rétinoblastome (RB).....	44
2.4.3.	Cascade métastatique.....	45
2.5.	Diagnostic et traitements.....	48
2.5.1.	Stades de cancérisation selon la classification TNM.....	49
2.5.2.	Traitements.....	51
2.5.2.1.	Chirurgie.....	52
2.5.2.2.	Chimiothérapie.....	52
2.5.2.3.	Radiothérapie.....	54
2.5.2.4.	Autres traitements.....	55
3.	LES LYMPHOCYTES T.....	57
3.1.	Le récepteur pour l'antigène des cellules T (TCR).....	57
3.1.1.	TCR $\alpha\beta$ et TCR $\gamma\delta$	58
3.1.2.	Mécanismes de réarrangement des gènes du TCR.....	59
3.1.3.	Le complexe TCR-CD3.....	64
3.1.4.	Survie et sélection des lymphocytes T.....	65
3.2.	Reconnaissance de l'antigène.....	66
3.2.1.	Apprêtement et présentation de l'antigène.....	70
3.2.1.1.	Apprêtement et présentation de l'antigène par les molécules de CMH classe I.....	70
3.2.1.2.	Apprêtement et présentation de l'antigène par les molécules de CMH classe II.....	73
3.2.2.	Reconnaissance de l'antigène sur les molécules de CMH.....	76
3.2.2.1.	Reconnaissance de l'antigène sur les molécules de CMH classe I par les lymphocytes T CD8+	76
3.2.2.2.	Reconnaissance de l'antigène sur les molécules de CMH classe II par les lymphocytes T CD4+	77
3.2.3.	Génération des cellules T effectrices et des cellules T mémoires.....	78
3.3.	Production de cytokines.....	80
4.	IMMUNOLOGIE DU CANCER BRONCHIQUE NON-A PETITES CELLULES (CBNPC).....	84

4.1.	La stroma réaction	84
4.1.1.	Angiogénèse	84
4.1.1.1.	Facteurs de croissance	85
4.1.1.1.1.	Facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF).....	85
4.1.1.1.2.	Facteur de croissance fibroblastique basique (bFGF)	86
4.1.1.1.3.	Facteur de croissance hépatocytaire (HGF)	87
4.1.2.	Protéines de la matrice extra-cellulaire (MEC).....	87
4.1.2.1.	Fibroblastes	88
4.1.2.2.	Métalloprotéinases (MMPs).....	88
4.1.3.	Composante inflammatoire.....	89
4.1.3.1.	Cellules NK.....	89
4.1.3.2.	Macrophages	92
4.1.3.3.	Polynucléaires	92
4.2.	Les lymphocytes T de la stroma réaction	93
4.2.1.	Les lymphocytes T de la stroma réaction des CBNPC	93
4.2.2.	Production de cytokines	95
4.3.	Echappement des cellules tumorales au système immunitaire dans le CBNPC.....	96
4.3.1.	Modulation d'expression du complexe CD3-TCR.....	97
4.3.2.	Modulation d'expression des molécules du CMH.....	98
4.3.3.	Expression de molécules du CMH non-classiques	99
5.	OBJECTIFS DU TRAVAIL	100
	MATERIEL ET METHODES.....	103
6.	PATIENTS ET PRELEVEMENTS	104
6.1.	Patients	104
6.2.	Echantillons tissulaires.....	108
7.	CYTOMETRIE DE FLUX :	109
7.1.	Principe.....	109
7.1.1.	Immunophénotypage des lymphocytes T par quadruple marquage :.....	112
7.1.2.	Immunophénotypage du répertoire V β du TCR par triple marquage :	115
7.2.	Méthodes	119

7.2.1.	Cultures.....	119
7.2.1.1.	Cultures organotypiques courtes	119
7.2.1.2.	Cultures courtes de lymphocytes T	119
7.2.2.	Suspensions de lymphocytes intratissulaires	119
7.3.	Analyses statistiques.....	121
8.	ELECTROPHORESE EN GRADIENT DE TEMPERATURE (TTGE) ET ELECTROPHORESE EN GEL DE GRADIENT DENATURANT (DDGE).....	122
8.1.	Principe.....	122
8.1.1.	PCR :	122
8.1.2.	Electrophorèse en gradient de température (TTGE) et électrophorèse en gel de gradient dénaturant (DDGE)	125
8.2.	Méthode.....	127
8.2.1.	Digestion tissulaire et extraction phénolique de l'ADN.....	127
8.2.2.	Amplification en chaîne de l'ADN (PCR) des lymphocytes T tissulaires.....	128
8.2.3.	TTGE/DDGE.....	129
8.2.3.1.	DGGE :	129
8.2.3.2.	TTGE :	130
8.2.4.	Coloration argentique	130
8.2.5.	Analyses statistiques.....	131
9.	IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE SUR CRYOCOUPES	132
9.1.	Principe.....	132
9.2.	Méthode.....	133
9.3.	Analyses statistiques.....	134
10.	TRANSCRIPTION INVERSE D'ARN ET AMPLIFICATION EN CHAINE DE L'ADNC (RT-PCR).....	135
10.1.	Principe.....	135
10.2.	Méthode.....	139
10.2.1.	Extraction phénolique des ARN.....	139
10.2.2.	RT-PCR de cytokines présentes dans les tissus	139

10.2.3.	Electrophorèse en gel d'agarose	140
10.2.4.	Analyses statistiques	141
11.	FICHES TECHNIQUES.....	142
	RESULTATS.....	157
12.	SOUS POPULATIONS T ET REPERTOIRE V-BETA	158
12.1.	Caractérisation des lymphocytes T	158
12.1.1.	Immunophénotypage des lymphocytes T des différents tissus en quadruple marquage	158
12.1.2.	Immunophénotypage des lymphocytes T des différents tissus après culture organotypique courte en milieu non tumoral	159
12.1.3.	Immunophénotypage de lymphocytes T des échantillons sanguins	161
12.2.	Caractérisation du répertoire Vβ du TCR.....	162
12.2.1.	Caractérisation de l'utilisation du répertoire V β du TCR dans les différents tissus	162
12.2.1.1.	Caractérisation du répertoire V β du TCR dans les tissus sains	162
12.2.1.2.	Caractérisation du répertoire V β du TCR dans les tumeurs	163
12.2.1.3.	Caractérisation du répertoire V β du TCR dans les ganglions	163
12.2.2.	Comparaison de l'utilisation du répertoire V β du TCR dans les différents compartiments étudiés... ..	164
12.2.2.1.	Utilisation comparée du répertoire V β du TCR en fonction du type de tissu.....	164
12.2.2.2.	Utilisation comparée du répertoire V β en fonction du type de tumeur	167
12.2.2.3.	Utilisation comparée du répertoire V β en fonction du stade tumoral.....	169
12.2.2.4.	Autres utilisations comparées du répertoire V β du TCR.....	172
12.2.3.	Caractérisation de l'utilisation du répertoire V β du TCR dans les échantillons de sang périphérique	172
13.	ETUDE DE LA CLONALITE DES LYMPHOCYTES T PAR TTGE/DGGE..	173
13.1.	Etude de la restriction d'utilisation du répertoire Vγ du TCR dans les différents tissus	174
13.1.1.	Etude de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR dans les tissus sains.....	176
13.1.2.	Etude de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR dans les tumeurs.....	176
13.1.3.	Etude de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR dans les dans les ganglions.....	176
13.2.	Etude comparée de la restriction d'utilisation du répertoire Vγ du TCR	177

13.2.1.	Etude comparée de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR en fonction du type de tissu	177
13.2.2.	Etude comparée de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR en fonction du type de tumeur	178
13.2.3.	Etude comparée de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR en fonction du stade tumoral	180
13.2.4.	Etude comparée de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR en fonction de l'âge des patients	185
13.2.5.	Etude comparée de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR en fonction de la consommation tabagique.....	186
13.3.	Comparaison des résultats des études de clonalité obtenus en cytométrie de flux et par la technique de DGGE/TTGE.....	188
14.	ETUDES IMMUNOHISTOLOGIQUES	189
14.1.	Etudes histologiques des tissus sains, tumoraux et ganglionnaires	190
14.1.1.	Etude histologique sur cryocoupes des tissus sains.....	190
14.1.2.	Etude histologique sur cryocoupes des tumeurs	190
14.1.3.	Etude histologique sur cryocoupes des ganglions.....	191
14.1.4.	Etudes histologiques comparées des tissus sains et des tumeurs	192
14.2.	Expression de différents marqueurs lymphocytaires et pneumocytaires	194
14.2.1.	Expression de différents marqueurs lymphocytaires et pneumocytaires en fonction du type de tissu	194
14.2.2.	Expression comparée de différents marqueurs lymphocytaires et pneumocytaires en fonction du type de tumeur.....	203
14.2.3.	Expression comparée de différents marqueurs lymphocytaires et pneumocytaires en fonction du stade tumoral.....	205
14.2.4.	Expression comparée de différents marqueurs lymphocytaires et pneumocytaires en fonction de l'âge des patients	208
15.	PRODUCTIONS CYTOKINIQUES DES CANCERS BRONCHIQUES NON-A PETITES CELLULES (CBNPC)	210
15.1.	Amplification d'ARN cytokiniques.....	210
15.1.1.	Fréquence d'expression des ARNm de cytokines.....	210
DISCUSSION.....		217

CONCLUSION-PERSPECTIVES237

BIBLIOGRAPHIE.....241

ARTICLE.....273

CS 20143
NY CRONK

Liste des abréviations

AC : Adénocarcinome
AINS : Anti-Inflammatoires Non-Stéroïdiens
ANG : Angiogénine
β2m : β2 microglobuline
BET : Bromure d'Ethidium
bFGF : basic Fibroblastic Growth Factor
BSA : Sérum Albumine Bovine
CAM : Cell Adhesion Molecule
CBNPC : Cancer Bronchique Non-à Petites Cellules
CBPC : Cancer Bronchique à Petites Cellules
CD : Cluster de Différenciation
CE : Carcinome Epidermoïde
CGC : Carcinome à Grandes Cellules
CLIP : Class II Like Invariant chain Peptides
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DO : Densité Optique
EDFA : Eau Déminéralisée Filtrée Autoclavée
EGF : Epidermal growth Factor
ENA-78 : Epithelial Neutrophil-Activating 78
FITC : Fluorescein IsoThioCyanate
FLT1 : Fms-Like Tyrosine kinase 1
FP4 : Facteur Plaquettaire 4
FS : Forward Scatter
GAPDH : Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase
GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GRO : Growth Related Oncogene
GRP : Gastrin Releasing Factor
HEV : High Endothelial Venule
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
IRM : Imagerie à Résonance Magnétique
KDR : Kinase Domain containing Receptor
KIR : Killer Immunoglobulin Receptor
MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1
MEC : Matrice Extra Cellulaire
MFI : Mean Fluorescence Intensity
MMP : Matrix MetalloProteinase
NCR : Natural Cytotoxicity Receptors
NTP : Nucléotides TriPhosphates
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
RAM : Rabbit Anti Mouse (anticorps de lapin anti-immunoglobulines de souris)
RANTES : Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and presumably Secreted

RT-PCR : Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SRF : Stroma Réaction Faible
SRI : Stroma Réaction Importante
SS : Side Scatter
STE : Saline-TRIS-EDTA
TAE : Tris acide Acétique EDTA
TAP : Transporters of Antigen Processing
TAM : Tumor Associated Macrophages
TCR : T-Cell Receptor
TdT : Terminal Desoxynucleotidyl Transferase
TGF : Tumor Growth Factor
TIL : Tumor Infiltrating Lymphocytes
Tm : Température de demi dénaturation
TNF : Tumor Necrosis Factor
TTGE : Temporal Temperature Gradient Electrophoresis
u-PA : urokinase-Plasminogen Activator
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VLA-4 : Very Late Antigen 4

SCD UHP NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DE CONFERENCES
00 20148
17 FEB 2014

Liste des Figures

Figure 1	Schéma de la constitution des poumons humains.	20
Figure 2	Taux standardisés (population mondiale) d'incidence du cancer du poumon chez les hommes et chez les femmes, selon les départements français (1997-2002).....	23
Figure 3	Adénocarcinome pulmonaire.	33
Figure 4	Carcinome épidermoïde bronchique.	35
Figure 5	Carcinome neuroendocrine à grandes cellules.	36
Figure 6	Carcinome bronchique à petites cellules.	36
Figure 7	Différents modèles génétiques de la progression tumorale.....	39
Figure 8	Schématisation de la voie de transduction de signaux p16-Cycline-D1-RB.	45
Figure 9	Schématisation des différentes étapes de la cascade métastatique.....	47
Figure 10	Schématisation des étapes de réarrangement génique des TCR $\alpha\beta$	63
Figure 11	Schématisation de l'association du TCR au complexe multimoléculaire CD3.	65
Figure 12	Schématisation du processus de diapédèse.	69
Figure 13	Modèle d'association de peptides aux molécules du CMH I dans le réticulum endoplasmique.....	71
Figure 14	Localisation chromosomique des loci des molécules de classe II du CMH	73
Figure 15	Dégradation, transport et fixation aux molécules de classe II, de l'antigène	75
Figure 16	Reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T CD8+ sur les molécules de CMH classe I.	77
Figure 17	: Reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T CD4+ sur les molécules de CMH classe II.....	78
Figure 18	Schématisation de l'orientation de la réponse immune primaire vers une réponse de type Th1 ou Th2.	83
Figure 19	Régulation de l'activation de la cytotoxicité NK.	91
Figure 20	Schématisation des principales étapes des différents protocoles utilisés pour l'étude de la réponse immunitaire locale et de la modulation tumeur dépendante dans le cancer bronchique non-à petites cellules.....	108
Figure 21	Schématisation des étapes des différents protocoles utilisés pour les techniques de cytométrie de flux.....	109

Figure 22	Séparation des lymphocytes d'une suspension cellulaire par gradient de Ficoll-Hypaque	111
Figure 23	Exemple d'histogrammes monoparamétriques et biparamétriques utilisés pour l'immunophénotypage des lymphocytes T tissulaires par quadruple marquage	114
Figure 24	Exemple d'histogrammes monoparamétriques et biparamétriques utilisés pour l'immunophénotypage du répertoire V β du TCR par triple marquage.....	118
Figure 25	Principe d'amplification d'une séquence génique par réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN.....	123
Figure 26	Localisation des différentes amorces utilisées pour l'amplification en chaîne de l'ADN dans le locus γ du TCR (d'après Greiner, 1995).....	124
Figure 27	Exemples de bandes indiquant la présence de petits clones lymphocytaires T après amplification du répertoire V-J γ et DGGE/TTGE.....	127
Figure 28	Schématisation des étapes du protocole utilisé pour la technique d'immunofluorescence indirecte sur cryocoupes.....	133
Figure 29	Schématisation des étapes du protocole d'extraction d'ARN total et d'amplification par RT-PCR de gène de diverses cytokines.	135
Figure 30	Exemple de résultats obtenus en RT-PCR en utilisant des amorces spécifiques de l'IL-10.	138
Figure 31	Comparaison des pourcentages de cellules T et des sous populations CD4 et CD8 avant et après culture organotypique courte en milieu non tumoral.	161
Figure 32	Nombre de patients présentant des clones utilisant chaque V β du TCR dans les tissus sains tumoraux et ganglionnaires.	164
Figure 33	Médianes des pourcentages d'expression de chaque chaîne V β du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires en fonction du type de cancer.....	168
Figure 34	Médianes des pourcentages d'expression de chaque chaîne V β du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires en fonction de l'extension de la tumeur aux ganglions lymphatiques.....	170
Figure 35	Médianes des pourcentages d'expression de chaque chaîne V β du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires en fonction du stade de différenciation tumorale T.	171
Figure 36	Restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires.	178

Figure 37	Restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires en fonction du type de cancer.	179
Figure 38	Restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires en fonction de l'envahissement tumoral des ganglions lymphatiques proximaux.....	181
Figure 39	Comparaison de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires en fonction des stades de différenciation tumorale T1 et T2.....	184
Figure 40	Comparaison de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires en fonction des stades de différenciation tumorale T2 et T3-4.....	184
Figure 41	Comparaison de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires en fonction de l'âge des patients.....	186
Figure 42	Comparaison de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires en fonction de la consommation tabagique. ..	188
Figure 43	Exemple de coloration au bleu de toluidine d'une cryocoupe de tissu sain en microscopie optique. Grossissement : 100x.	193
Figure 44	Exemple de coloration au bleu de toluidine d'une cryocoupe de tumeur en microscopie optique. Grossissement : 100x.	193
Figure 45	Exemple d'immunomarquage de CD3 dans les tissus sains. Microscopie à fluorescence. Grossissement : x400.	195
Figure 46	Exemple d'immunomarquage de CD3 dans les tumeurs. Microscopie à fluorescence. Grossissement : x400.	195
Figure 47	Comparaison de l'expression de CD45RO et CD45RA dans les tumeurs, selon le type de tumeur et les stades d'évolution tumorale en fonction de la classification TNM.	197
Figure 48	Exemple d'immunomarquage de la β 2 microglobuline dans les tissus sains. Microscopie à fluorescence. Grossissement : x400.	198
Figure 49	Exemple d'immunomarquage de la β 2 microglobuline dans les tumeurs. Microscopie à fluorescence. Grossissement : x100.	199
Figure 50	Exemple d'immunomarquage de la β 2 microglobuline dans les tumeurs. Microscopie à fluorescence. Grossissement : x400.	199

Figure 51	Exemple d'immunomarquage de HLA-DR classe II dans les tissus sains. Microscopie à fluorescence. Grossissement : x400.	200
Figure 52	Exemple d'immunomarquage de HLA-DR classe II dans les tumeurs. Microscopie à fluorescence. Grossissement : x100.	200
Figure 53	Exemple d'immunomarquage de HLA-DR classe II dans les tumeurs. Microscopie à fluorescence. Grossissement : x400.	200
Figure 54	Comparaison des niveaux d'expression de CD3, CD8, β 2 microglobuline et HLA-DQ dans les tumeurs, en fonction du type de tumeur.	204
Figure 55	Comparaison des niveaux d'expression de CD4, TCR $\alpha\beta$, CD45RA et CD45RO dans les ganglions, en fonction du type histologique de tumeur.	205
Figure 56	Comparaison des niveaux d'expression de CD3, CD4 et CD8 dans les tissus sains et les tumeurs en fonction de l'extension tumorale aux ganglions proximaux.	206
Figure 57	Comparaison des niveaux d'expression de CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO, β 2 microglobuline et HLA-DQ dans les tissus sains et tumoraux en fonction des stades d'évolution tumorale T.	208
Figure 58	Comparaison du nombre de cellules constituant les foyers lymphocytaires et du nombre de cellules éparses dans les tissus sains et les tumeurs, en fonction de l'âge des patients.	209
Figure 59	Pourcentage d'expression de dix cytokines dans l'ensemble des tissus sains et des tumeurs.	216
Figure 60	Clusterisation active des molécules de TCR à l'interface entre les cellules T et les cellules présentatrices d'antigène (Baz, 2005).	227

Liste des tableaux

Tableau 1	Altérations de gènes suppresseurs de tumeurs et d'oncogènes dans diverses lignées cellulaires de cancer du poumon.....	41
Tableau 2	Description des stades tumeur primitive (T) et extension ganglionnaire (N) pour l'établissement de la classification TNM.....	50
Tableau 3	Données cliniques des patients.....	106
Tableau 4	Données cliniques des patients dont l'expression de diverses cytokines a été étudiée par RT-PCR.	107
Tableau 5	Anticorps monoclonaux composant le IOTest®Beta Mark TCR V β Répertoire Kit utilisé pour l'immunophénotypage du répertoire V-beta du TCR.....	116
Tableau 6	Séquence des amorces utilisées pour l'amplification en chaîne de l'ADN par une technique de PCR multiplex.....	124
Tableau 7	Séquences des amorces des cytokines utilisées pour la technique de RT-PCR. S : sens, AS : anti-sens.	137
Tableau 8	Moyennes des pics d'intensité de fluorescence des molécules CD3, CD4 et CD8 dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires.....	159
Tableau 9	Moyennes comparées des MFI des molécules CD3, CD4 et CD8 dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires avant et après culture organotypique courte en milieu non tumoral.	160
Tableau 10	Médianes des pourcentages d'expression des segments V des chaînes V β du TCR les plus fréquents, dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires.....	165
Tableau 11	Expression concomitante de clones V β chez un même patient.	167
Tableau 12	Nombre de cas présentant une ou plusieurs bandes caractérisant la présence de un ou plusieurs clones lymphocytaires T dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires.	175
Tableau 13	Niveaux d'expression de marqueurs immunologiques dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires par immunofluorescence sur coupes à la congélation.	202
Tableau 14	Expression comparée de dix cytokines dans l'ensemble des tissus pulmonaires sains et tumoraux testés.....	215

Tableau 15 Test de significativité statistique Khi2 pour l'ensemble des cytokines étudiées.
..... 216

SCD UFR NANCY 1
Sciences
2014

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1. PREAMBULE

Le cancer du poumon est un problème de santé majeur, mais si son épidémiologie et ses facteurs de risques sont à peu près compris, il reste beaucoup d'inconnues quant aux événements biologiques et surtout immunologiques conduisant à son développement chez les patients. Une étude approfondie des mécanismes caractéristiques de la cancérogenèse bronchique, de leurs effets sur l'organisme et de leur échappement au système immunitaire, est donc cruciale pour combattre ce fléau.

Les cancers bronchiques non-à petites cellules (CBNPC) représentent 75 % des cancers bronchiques, ils incluent des carcinomes à cellules squameuses ou épidermoïdes, des carcinomes à grandes cellules et des carcinomes bronchoalvéolaires ou adénocarcinomes.

Les CBNPC sont caractérisés par le développement intriqué de cellules cancéreuses et d'une réaction tissulaire évoluant dans le tissu tumoral et à sa périphérie appelée la stroma réaction. Le stroma est un tissu conjonctif néo-formé, non tumoral, assurant le soutien et la nutrition des cellules tumorales. Il est en remaniement constant et composé de protéines de la matrice extracellulaire, de vaisseaux néo-formés et de cellules inflammatoires. La composante majeure des cellules inflammatoires du cancer bronchique est représentée par les lymphocytes T infiltrant la tumeur qui contiennent des cellules T reconnaissant des antigènes tumoraux, mais dont les caractéristiques fines ont été assez peu étudiées dans les CBNPC.

Le système immunitaire exerce une surveillance constante afin d'éliminer les cellules tumorales potentielles. De nombreux mécanismes sont impliqués dans cette surveillance immune parmi lesquels on peut citer les anticorps dirigés contre des antigènes tumoraux, la cytotoxicité anticorps dépendante, la réponse des cellules Natural Killer liée à la dérégulation de l'expression des molécules de classe I du CMH sur les cellules tumorales et les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques d'antigènes tumoraux. Lorsque une tumeur parvient à se développer c'est que le système immunitaire a été dépassé ou que les cellules tumorales ont réussi à échapper au système immunitaire. Si l'expansion tumorale résulte d'un échappement au système immunitaire il ne doit pas rester de lymphocytes T anti-tumoraux dans la stroma

réaction au moment de l'ablation tumorale ou alors ces cellules présentent des caractéristiques de non fonctionnalité ou d'anergie. Il peut s'agir d'une suppression de clones anti-tumoraux, d'une non fonctionnalité de la synapse immunologique, de la production de cytokines immunosuppressives ou d'une combinaison de ces événements.

Ce travail a porté, in situ, sur l'étude de la réponse immunitaire locale et de sa modulation tumeur dépendante dans le CBNPC. L'objectif principal était la caractérisation de la stroma réaction et en particulier des lymphocytes intratumoraux et de leurs relations avec les cellules tumorales. Cette étude comporte quatre volets principaux qui sont :

- La détermination de l'existence d'une clonalité potentielle des lymphocytes T des tissus sains, tumoraux et ganglionnaires obtenus chez les mêmes patients
- L'étude de la modulation des partenaires de la synapse immunologique
- L'étude des caractéristiques immunophénotypiques des lymphocytes intratumoraux
- L'identification des facteurs solubles impliqués dans l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire.

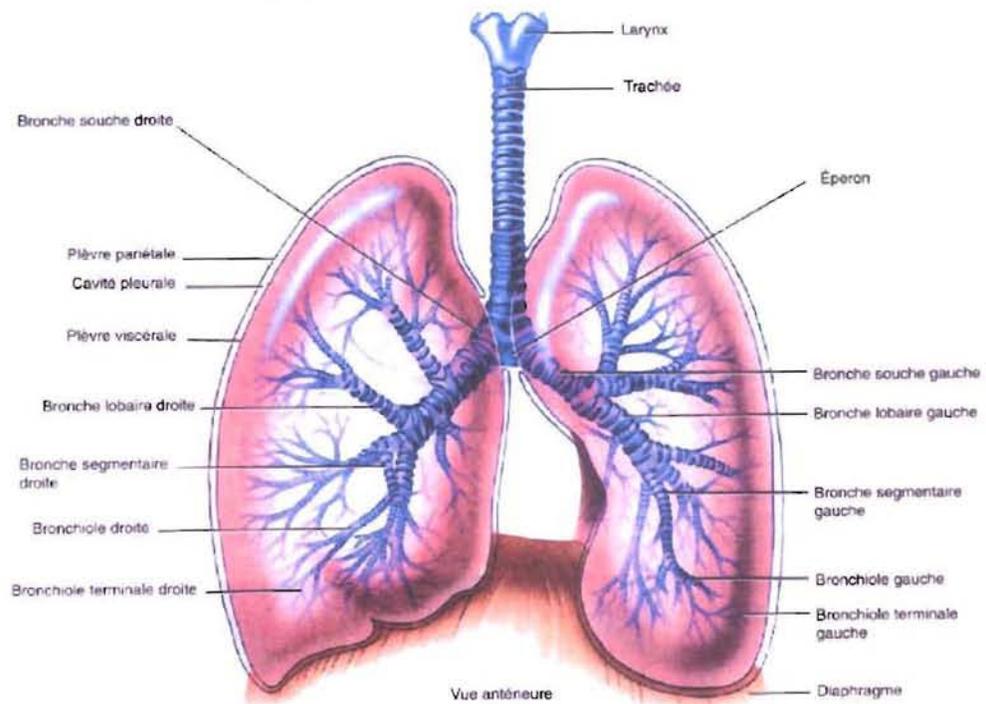
Ces différents objectifs sont exposés après une revue de la littérature concernant d'une part les cancers bronchiques, d'autre part les lymphocytes T et enfin l'état de l'art sur l'immunologie du cancer bronchique.

2. Le cancer du poumon

2.1. Le poumon : constitution et rôle :

Le poumon droit est constitué de trois lobes, tandis que le gauche est constitué de deux lobes, en raison de l'espace occupé par le cœur. Les poumons d'un adulte peuvent contenir environ trois litres d'air. Puisque les poumons n'ont pas de muscles eux-mêmes, ce sont les muscles thoraciques, et essentiellement le diaphragme, qui sont chargés du travail de la respiration. L'air inspiré descend dans la trachée, et se répand jusqu'aux bronches, qui pénètrent dans les poumons droit et gauche au niveau du hile. Les bronches elles-mêmes se ramifient en plusieurs bronchioles, qui se divisent à leur tour en une demi douzaine de canaux alvéolaires, étroits conduits s'ouvrant dans les sacs alvéolaires (Figure 1) (Wheater, 1987).

Figure 1 Schéma de la constitution des poumons humains.



(uhp-Nancy, cancérogenèse bronchique et rétinoides)

Le poumon a plusieurs rôles. Il permet les échanges gazeux entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. Il procure l'oxygène nécessaire à l'organisme et élimine le CO₂ produit par le métabolisme.

Il participe également à la protection immunitaire de l'organisme, car il comporte du tissu lymphoïde associé aux muqueuses, ainsi qu'au métabolisme de certains xénobiotiques (Wheater, 1987).

L'air inspiré est conduit par les bronches puis les bronchioles jusqu'aux alvéoles pulmonaires où l'oxygène traverse la membrane de la paroi alvéolaire pour être transféré vers les globules rouges contenus dans les capillaires. Inversement, les déchets gazeux passent des globules rouges aux alvéoles, afin d'être éliminés par l'expiration (Wheater, 1987).

2.2. Epidémiologie du cancer bronchique non-à petites cellules (CBNPC)

2.2.1. Incidence et mortalité du cancer du poumon

Le cancer du poumon représente un problème de santé publique majeur. En effet c'est le type de cancer le plus fréquent au monde chez l'homme comme chez la femme. De plus, le cancer du poumon est la cause principale de mort par cancer dans le monde (Bilello, 2002 ; Travis, 2002) et représente à lui seul plus d'un sixième des décès imputables aux cancers (Hoffman, 2000). Plus de 90% des patients affectés par un cancer du poumon en meurent. Le cancer du poumon est responsable de plus de 25000 nouveaux cas chaque année en France (Tutin, dossier cancer du poumon). Le tabagisme est la première cause de cette maladie et l'incidence du cancer du poumon dans une population donnée reflète de façon précise les habitudes de tabagisme de cette population (Bilello, 2002). Le cancer du poumon est responsable à ce jour d'environ 1,2 millions de décès (Matakidou, 2006). Le cancer du poumon est une maladie très virulente, qui, en l'absence de symptômes réellement spécifiques, est souvent diagnostiquée tardivement. De ce fait, le taux de survie moyen à cinq ans est faible, il est de 14% pour les cancers bronchiques non-à petites cellules (CBNPC) et il chute drastiquement pour les cancers bronchiques à petites cellules (4,6%). Ceci explique également que l'incidence et la mortalité du cancer du poumon soient similaires (Merrill, 2000). De plus le

taux de survie à 5 ans des CBNPC n'a pas augmenté depuis plus de 25 ans malgré les progrès thérapeutiques. Il en résulte que la prévention du cancer du poumon et des moyens diagnostiques précoces sont les éléments majeurs à développer pour lutter contre cette maladie (Williams, 2001). En effet, dans la majorité des cas, la tumeur est déjà étendue au moment du diagnostic (Muller-Hagen, 2004).

L'incidence et la mortalité par cancer du poumon sont les plus fortes dans les pays industrialisés, en particulier aux Etats-Unis et en Europe. En revanche, l'incidence et la mortalité sont les plus faibles en Afrique sub-saharienne. Cependant, l'incidence du cancer du poumon augmente très rapidement dans les pays en voie de développement (Bilello, 2002).

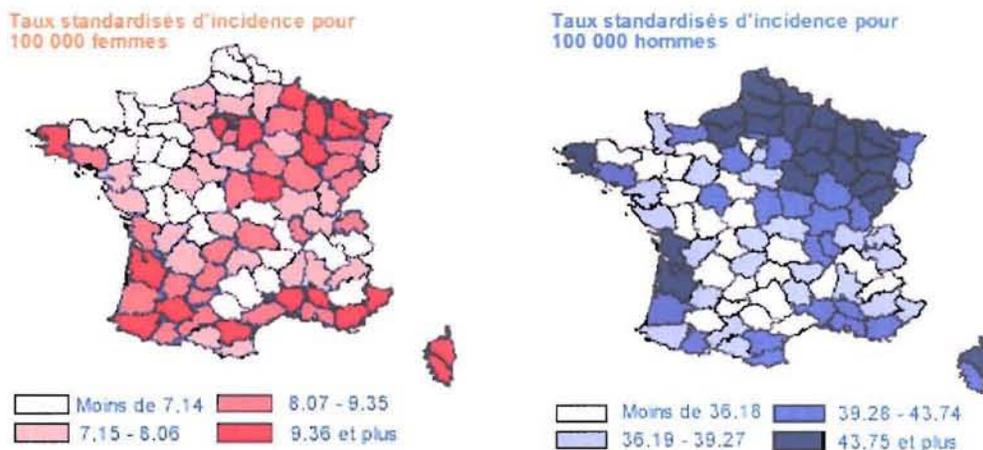
Le cancer du poumon affecte principalement les seniors. En effet, le cancer du poumon apparaît rarement avant 40 ans, l'âge moyen du diagnostic est de 65 à 70 ans avec la moitié des nouveaux cas diagnostiqués chez des personnes âgées de 65 à 79 ans dans le monde (Bilello, 2002). En France, l'âge moyen des malades est de 64 ans. Ce phénomène nécessite des précautions particulières liées à la présence fréquente d'autres maladies ainsi qu'à une santé générale plus fragile (Tutin, dossier cancer du poumon). Cependant, l'incidence du cancer du poumon tend à augmenter à la fois chez les sujets plus âgés et chez les plus jeunes (Bilello, 2002).

Depuis les années 1950, la mortalité par cancer du poumon chez les femmes blanches a augmenté de 600%. Ceci est dû, comme préalablement chez les hommes, à l'augmentation importante de leur consommation tabagique. En effet, les femmes n'ont commencé à fumer en grand nombre qu'à partir de la seconde guerre mondiale. Certaines études suggèrent de plus que les femmes pourraient être plus sensibles au cancer du poumon que les hommes (Tanoue, 2000 ; Pauk, 2005). Cette différence de sensibilité au cancer du poumon pourrait être due aux oestrogènes (Stabile, 2002). Si les femmes ont une susceptibilité biologique accrue au cancer du poumon, elle peut ainsi être liée à des facteurs dits de sexe et de genre. Les facteurs liés au sexe sont ceux responsables des différences biologiques entre hommes et femmes (hormones, système de reproduction). Les facteurs liés au genre résultent de différences sociétales existant entre hommes et femmes (expositions différentes en raison des habitudes de consommation tabagique, ou de métiers non effectués par des femmes) (Pauk, 2005). Ces facteurs liés au sexe et au genre seraient associés à des différences d'activation et de détoxification des carcinogènes entre hommes et femmes. De plus, les femmes développent majoritairement des

adénocarcinomes alors que la prévalence des carcinomes épidermoïdes est la plus forte chez les hommes (Billelo, 2002).

Le cancer du poumon est à l'origine de 7,6 % des décès masculins et 1,6 % des décès féminins, toutes causes confondues, en France. La mortalité féminine par cancer du poumon en France a augmenté de 3% par an ces vingt dernières années alors que la mortalité masculine a augmenté de 0,8% par an pendant la même période. De plus, les prévisions pour la période 2010-2014, annoncent une diminution de 3% chez l'homme, alors que chez la femme l'incidence du cancer du poumon pourrait augmenter de 60% (INVS, 2005). En France, des différences d'un sexe à l'autre sont également observées en fonction du degré d'urbanisation et des disparités socioéconomiques, (Figure 2).

Figure 2 **Taux standardisés (population mondiale) d'incidence du cancer du poumon chez les hommes et chez les femmes, selon les départements français (1997-2002).**



http://www.doctissimo.fr/html/dossiers/cancer_poumon/sa_8065_cancer_poumon_femmes_explosion.htm, selon les données de la CNAMTS (Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés).

2.2.2. Les facteurs de risque

La consommation de tabac, et en particulier celle de cigarettes, est responsable de plus de 90% de la mortalité par cancer du poumon dans le monde. Cependant, moins de 20% des fumeurs de cigarettes développent un cancer du poumon ce qui suggère que d'autres facteurs jouent également un rôle dans le développement de cette maladie (Bilello, 2002). Une étude originale de Merrill et Lyon (2005) a comparé le risque de cancer du poumon dans l'Utah chez les Mormons et les non Mormons. En effet, du fait de leurs convictions religieuses, les Mormons ont la consommation de tabac et d'alcool la plus faible des Etats-Unis, ainsi que le plus fort taux d'adultes mariés avec des enfants vivant dans le milieu familial. Cette étude montre un risque significativement inférieur chez les Mormons de développer un cancer, et en particulier un cancer du poumon.

Une étude de l'épidémiologie du cancer du poumon chez les non fumeurs montre que chez ces patients, certains facteurs de risque professionnels tels que l'exposition à l'amiante et au radon jouent un rôle dans l'apparition de la maladie (Kreuser, 2001).

2.2.2.1. Le tabagisme

2.2.2.1.1. Tabagisme actif

Dans les pays développés, plus de 90% des cas de cancer du poumon chez l'homme et 80% des cas chez la femme sont imputables au tabagisme (Hoffman, 2000).

Historiquement, les hommes ont commencé à fumer en grand nombre lors de la première Guerre Mondiale. Les femmes ont, quant à elles, commencé à fumer en grand nombre 20 à 25 ans plus tard, lors de la deuxième Guerre Mondiale. Cette différence est reflétée dans les courbes de mortalité du cancer du poumon, la hausse de mortalité chez les femmes étant observée environ 20 ans après celle notée chez les hommes. L'incidence du cancer du poumon aujourd'hui reflète donc le degré de consommation de tabac qui avait cours il y a 20 ans (Rioux, 2000).

Au niveau mondial, on dénombre 1,3 milliards de fumeurs, 1,1 milliard d'hommes et 230 millions de femmes, soit près d'un tiers de la population de plus de 15 ans, qui consomment annuellement quelque 6000 milliards de cigarettes (WHO, 2004). C'est en Corée que l'on

observe la plus forte prévalence du tabagisme au monde, qui est de 68% chez les hommes. L'Ex-URSS, la République Dominicaine, le Tonga, la Turquie et la Chine suivent de près avec des taux de tabagisme de 67 à 61% chez les hommes, ce qui est plus du double des taux observés au Canada et aux USA (WHO, 1996). Si l'incidence du tabagisme commence à diminuer un peu dans les pays industrialisés, elle augmente dramatiquement d'année en année dans les pays en voie de développement (WHO, 2004).

Les premières études montrant une association forte entre la consommation de cigarettes et le cancer du poumon datent de 1950 (Doll et Hill). Le risque de mourir d'un cancer du poumon chez les fumeurs est ainsi 10 fois plus élevé que chez les non-fumeurs. Il existe une relation dose-réponse très forte entre la consommation cumulée de cigarettes et le risque de mourir d'un cancer du poumon (Bilello, 2002). En effet, plus un individu commence jeune à fumer, plus le nombre de cigarettes consommées par jour est élevé et plus longtemps il fumera, accroissant ainsi son risque de développer un cancer du poumon (Rioux, 2000). Un homme fumant 20 cigarettes par jour a 22 fois plus de risque de développer un cancer du poumon qu'un homme n'ayant jamais fumé de sa vie (Bilello, 2002).

La fumée de cigarette contient plus de 50 carcinogènes connus. Parmi eux se trouvent les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les N-nitrosamines qui nécessitent une activation métabolique avant d'exercer leur effet carcinogène. Les métabolites de ces composants sont très réactifs, ils sont capables de se fixer à l'ADN et de causer des mutations, notamment dans le gène suppresseur de tumeurs p53 et dans l'oncogène K-ras, tous deux impliqués dans la cancérogenèse de nombreux cancers, dont le cancer du poumon (Bilello, 2002).

D'autres facteurs associés à la consommation tabagique contribuent à augmenter le risque de développer un cancer du poumon. Ce sont l'âge de début de la consommation tabagique, la durée de la consommation tabagique, une inhalation plus profonde de la fumée, les cigarettes contenant de fortes concentrations en nicotine et goudrons et la consommation de cigarettes sans filtre (Bilello, 2002). Le pourcentage de jeunes fumeurs augmente, et l'âge d'initiation au tabagisme diminue. Actuellement, 80% des fumeurs adultes ont commencé à fumer avant l'âge de 18 ans (Rioux, 2000). Une étude de Hirao et al (2001) montre, chez des patients présentant un carcinome épidermoïde, une augmentation de la perte d'hétérozygotie 3p21 chez les patients ayant commencé le plus tôt à fumer. De plus, des changements dans la composition des cigarettes semblent avoir provoqué une modification de la prévalence des

types histologiques, l'adénocarcinome devenant le type histologique le plus répandu (cf. chapitre 1.3.1.1) (Bilello, 2002). Ce changement de prévalence implique également un développement de métastases précoces plus fréquent (Hoffman, 2000).

La consommation tabagique crée une addiction chez le fumeur, due à la nicotine et à ses dérivés, en particulier les nitrosamines qui agissent sur les récepteurs nicotiques neuronaux à l'acétylcholine, dans les régions du cerveau contrôlant la volonté (Minna, 2003). La nicotine crée une dépendance dont seulement environ la moitié des fumeurs parviendra à se défaire. La cessation du tabagisme entraîne des effets de sevrage tels que l'anxiété, l'irritabilité, la frustration, la rage, des céphalées, des difficultés de concentration, une augmentation de l'appétit et surtout une forte envie de fumer. Généralement, un fumeur ne cesse de fumer qu'après plusieurs tentatives d'arrêt. A peine 18% des fumeurs ayant commencé à fumer à 13 ans ou moins ont arrêté dans les 10 années suivantes, comparativement à 42% de ceux ayant commencé à 20 ans ou plus (Rioux, 2000). L'arrêt du tabagisme, s'il n'annule pas en soi les risques de développer un cancer du poumon, permet de diminuer ce risque. Le risque relatif de développer un cancer du poumon chez les anciens fumeurs commence à diminuer après 5 ans de sevrage tabagique. Ce risque continue de diminuer ensuite sans toutefois jamais atteindre le risque relatif d'une personne n'ayant jamais fumé. De plus l'arrêt de la consommation tabagique avant 40 ans réduit de plus de 90% le risque, attribué au tabac, de développer un cancer du poumon (Bilello, 2002).

Les effets de la fumée de cigare sur le risque d'apparition d'un cancer du poumon sont beaucoup moins étudiés. Toutefois, ce risque est réel et ne doit pas être négligé. En effet, la consommation de cigares multiplie le risque de développer un cancer du poumon par rapport aux non fumeurs (Bilello, 2002). De plus, le risque de survenue d'un cancer du poumon chez les fumeurs de pipe, bien que largement inférieur à celui des fumeurs de cigarettes, est non-négligeable et supérieur à celui des fumeurs de cigares. Ces différences sont liées, au moins en partie, à l'inhalation ou non de la fumée et au degré d'intensité de l'inhalation (Milleron, 1995). Les tabacs dits « sans fumée » (tabac à chiquer et tabac à priser) ne constituent pas un réel facteur de risque pour le cancer du poumon. En revanche, ces tabacs sans fumée constituent un réel facteur de risque pour les cancers de la bouche, du larynx, de la gorge et de l'estomac (Fondation québécoise du cancer, 2006).

La meilleure stratégie de prévention du cancer du poumon est donc l'arrêt de la consommation tabagique, ce qui implique, en terme de santé publique, la mise en place de

mesures pour promouvoir la cessation du tabagisme mais également pour prévenir l'initiation au tabagisme. Ces mesures consistent, en France comme dans la majorité des pays industrialisés, en une augmentation du coût des produits dérivés du tabac, dont les cigarettes, en la diffusion de messages visant à informer de façon « coup de poing » les consommateurs des dangers du tabagisme sur les paquets de cigarettes comme par exemple « fumer tue » ou « fumer peut provoquer le cancer », en la limitation voire l'interdiction des publicités pour des produits dérivés du tabac, en des mesures de protection des non fumeurs dans les lieux publics (Billelo, 2002). L'augmentation de la taxation des cigarettes est, à ce jour, l'une des interventions les plus efficaces, surtout chez les jeunes. En effet, aucune autre maladie n'a montré une aussi forte relation entre une conduite, une habitude, qui sont évitables et l'incidence de la maladie (Billelo, 2002). Cependant, les interventions actuelles au niveau de la prévention primaire du tabagisme sont insuffisantes pour faire fortement décliner le nombre de fumeurs, surtout de jeunes fumeurs (Rioux, 2000).

Le tabagisme ne se limite pas à l'induction du cancer du poumon, il limite également l'efficacité des traitements. En effet, la nicotine, qui n'est pas par elle-même un carcinogène, peut favoriser la prolifération cellulaire ainsi que l'angiogenèse et inhiber l'apoptose induite par certains agents. Ainsi, une étude de Dasgupta *et al* (2006) montre que l'exposition à la nicotine réduit le potentiel apoptotique des agents de chimiothérapie. De ce fait, les malades traités pour un cancer du poumon qui continuent de fumer, ou les patients en sevrage qui prennent des substituts nicotiques, sont faiblement répondeurs aux traitements.

2.2.2.1.2. Tabagisme passif

La composition chimique de la fumée inhalée directement de la cigarette et celle de la fumée d'une cigarette se consommant sont similaires (Billelo, 2002). En effet plusieurs carcinogènes présents dans la fumée de cigarette inhalée, dont les nitrosamines, se dégagent directement du bout incandescent ou du filtre après une bouffée, ce qui constitue la fumée secondaire (Rioux, 2000). Ainsi, des carcinogènes spécifiques de l'absorption tabagique sont présents dans les urines de non-fumeurs exposés à la fumée de cigarettes (Billelo, 2002).

Il a été estimé que le risque de développer un cancer du poumon est augmenté de 30% pour une personne non fumeuse vivant avec un fumeur. De plus il existe une relation dose-réponse aussi chez les fumeurs passifs. Les non fumeurs présentant le risque le plus important

de développer un cancer bronchique sont ceux qui sont exposés au tabagisme dans leur environnement familial pendant l'enfance et l'adolescence (Billelo, 2002).

Le risque de cancer du poumon chez les non fumeurs victimes de tabagisme passif semble être, comme chez les fumeurs, influencé par un certain nombre de facteurs génétiques (Billelo, 2002).

2.2.2.2. L'amiante

L'amiante a été utilisée de façon extensive pour ses propriétés isolantes et résistantes, dans la construction des maisons, des écoles et des bâtiments commerciaux, touchant ainsi une grande majorité de la population, à des taux néanmoins inférieurs à ceux des métiers à risques (Billelo, 2002).

La première étude montrant un risque accru de développer un cancer du poumon chez les personnes exposées à l'amiante date de 1955 (Doll). Le risque de cancer du poumon associé à une exposition à l'amiante varie en fonction du degré d'exposition, du type de fibre et de la consommation tabagique concomitante. En effet, si le risque de cancer du poumon est 6 fois supérieur chez les personnes exposées à l'amiante seule, il est 59 fois supérieur chez les fumeurs exposés à l'amiante (Billelo, 2002).

2.2.2.3. Le radon

Le radon est un gaz inerte produit par la désintégration de l'uranium. Il est présent dans les sols et les roches, il est capable de diffuser à travers la terre et de ce fait peut être présent à plus ou moins forte concentration dans les habitations. Le radon produit des dérivés radioactifs à durée de vie courte qui émettent des particules α capables de détruire les épithéliums respiratoires (Billelo, 2002). Il existe une relation dose-réponse entre le degré d'exposition au radon et le risque de cancer du poumon. De plus, il existe une synergie entre l'exposition au radon et la consommation tabagique (Billelo, 2002).

Bien que l'exposition domestique au radon ne confère pas les mêmes risques de développer un cancer du poumon que la consommation tabagique, le grand nombre de

personnes exposées au radon « résidentiel » en fait une cause de survenue de cancer du poumon à ne pas négliger (Billelo, 2002).

2.2.2.4. Les facteurs de risque professionnels

Les carcinogènes connus d'origine professionnelle incluent l'amiante, les métaux lourds comme l'arsenic, le chrome et le nickel, les produits de la combustion du charbon, les radiations, incluant le radon, les éthers de chlorométhyl, le chlorure de vinyl ainsi que les composés aromatiques polycycliques (Billelo, 2002 ; Matakidou, 2006).

Quinze pourcent des cancers du poumon chez les hommes et 5% chez les femmes sont dus à une exposition répétée à des carcinogènes dans un cadre professionnel, aux Etats Unis. Onze et demi pourcent des cancers bronchiques sont provoqués par une exposition professionnelle à l'amiante. Il est de plus observé un risque supérieur de développer un cancer du poumon chez les mineurs d'uranium, qui sont exposés au radon, avec une relation dose-réponse (Billelo, 2002).

Le risque relatif aux facteurs professionnels augmente de façon significative et linéaire avec le nombre d'années passées dans un métier à risques (Ruano-Ravina, 2003).

La plupart de ces facteurs de risque professionnels agissent de façon synergique avec la consommation tabagique dans le développement du cancer bronchique. Cette relation est particulièrement vraie pour l'amiante et le radon (Billelo, 2002).

L'amiante reste toutefois le facteur de risque professionnel le plus commun.

2.2.2.5. Le régime alimentaire

Diverses études épidémiologiques ont démontré que le contenu en matières grasses de l'alimentation joue un rôle important dans la carcinogenèse bronchique. Il a été observé une association dose-dépendante entre la consommation en grandes quantités de produits riches en matières grasses tels les produits carnés « gras » (charcuteries, saucisse), les produits laitiers (lait entier, crème glacée), les oeufs, et particulièrement les desserts (gâteaux, tartes aux fruits ou à la crème), et le risque de cancer du poumon. L'effet dose-réponse est particulièrement important chez les fumeurs, démontrant une synergie possible entre le tabagisme et un régime

riche en matières grasses. De plus, un apport élevé en calories provenant de matières grasses est statistiquement significativement associé à la mortalité du cancer du poumon ($p=0.001$), et ce après exclusion du tabagisme comme facteur de risque (Rioux, 2000). Un régime alimentaire riche en graisses ainsi que l'obésité, même chez les non fumeurs, sont associés avec un risque accru de développer un cancer du poumon (Billelo, 2002).

De nombreuses études épidémiologiques ont montré une association entre un régime alimentaire riche en fruits et légumes et un risque moindre de développer un cancer du poumon. Le β carotène, présent dans les fruits et légumes, est vraisemblablement l'agent protecteur principal responsable de cet effet bénéfique. En effet, les personnes consommant le moins d'aliments riches en β carotène sont les plus à risque de développer un cancer du poumon. De plus, l'effet protecteur du β carotène est supérieur chez les fumeurs ayant fumé plus longtemps. Une prévention du cancer du poumon par l'arrêt du tabagisme accompagné d'un régime alimentaire équilibré représente un moyen efficace, simple à mettre en œuvre. Le β carotène n'est toutefois pas la seule molécule impliquée. En effet, les personnes ayant un régime alimentaire riche en α carotène et en lycopesines voient leur risque de cancer du poumon diminuer de 20 à 25% (Billelo, 2002).

La consommation de carottes, de sauce tomate, d'huile de foie de morue, ainsi que d'aliments riches en vitamines (ou de compléments vitaminés) est associée à une diminution significative du risque de cancer du poumon. De même d'autres micronutriments sont importants pour diminuer le risque de cancer du poumon, comme les flavonoïdes contenus dans les pommes ou les isothiocyanates présents entre autres dans les différentes sortes de choux. Les vitamines A, C et E, contenues dans différents types d'aliments, sont proposées comme étant des molécules ayant un effet protecteur (Williams, 2001).

En France, le Programme National Nutrition-Santé (PNNS) a, depuis 2001, déterminé neuf objectifs nutritionnels prioritaires en termes de santé publique. Le premier objectif consiste en l'augmentation de la consommation de fruits et légumes avec un apport quotidien recommandé de 5 fruits et légumes différents. Les autres objectifs principaux comportent une augmentation de la consommation de calcium, une réduction des apports lipidiques totaux avec une diminution en particulier des acides gras saturés et monoinsaturés au profit des acides gras polyinsaturés, une augmentation de la consommation glucidique en favorisant en particulier la consommation d'aliments riches en amidon comme source d'énergie au détriment des sucres

simples, une réduction de la consommation d'alcool et une augmentation de l'activité physique (PNNS, 2001-2005).

2.2.2.6. Les susceptibilités génétiques

Une étude de familles a montré que les fumeurs, ayant dans leur famille une ou plusieurs personnes ayant développé un cancer du poumon, ont un risque de cancer bronchique deux fois supérieur aux personnes n'ayant pas d'antécédent familial. Le risque de cancer du poumon est ainsi multiplié par quatre chez les non fumeurs ayant des antécédents familiaux de cancer du poumon. De même, les patients atteints de cancer du poumon sont statistiquement plus susceptibles d'avoir un ou plusieurs cas de cancer du poumon dans leur famille (Billelo, 2002).

Des études sur les différences d'expression de produits de gènes de métabolisation des carcinogènes du tabac et sur les mutations de gènes suppresseurs de tumeurs et d'oncogènes ont procuré des preuves plus directes de l'implication de susceptibilités génétiques dans le risque de développer un cancer du poumon. Les carcinogènes de la fumée de cigarette sont oxydés par les enzymes du cytochrome P-450 en intermédiaires réactifs qui sont finalement transformés en formes excrétables par des enzymes telles la glutathion S-transférase. En particulier, les enzymes CYP1A1 et GSTM1 sont inductibles par la fumée de cigarette et leur expression est incriminée dans le risque de cancer du poumon (Billelo, 2002).

Le gène p53 est muté dans plus de 50% des cancers du poumon, les mutations du gène K-ras sont quant à elles mises en évidence dans 25 à 50% des adénocarcinomes (Billelo, 2002 ; Matakidou, 2006).

Il a de plus été montré un lien intrafamilial entre le cancer du poumon, le cancer du larynx et celui du pharynx, et une région du chromosome 6q23-25 (Schwartz, 2006). Un risque accru de développer un cancer du poumon est également associé à une hétérozygotie de xeroderma pigmentosum (XP) qui est une maladie autosomale récessive rare caractérisée par une prédisposition importante à des cancers de la peau de types variés. La prédisposition du cancer du poumon associée à XP implique la voie de la réparation de l'ADN par excision nucléotidique dans le processus de carcinogenèse lié au tabac (Matakidou, 2006). Certaines autres maladies à caractère héréditaire telles que le syndrome de Werner (sclérodermie

atrophique récessive) ou le syndrome de Bloom (érythème congénital) sont associées à un risque augmenté de développer un cancer du poumon (Matakidou, 2006).

2.2.2.7. Autres facteurs de risque

Plusieurs maladies pulmonaires non malignes préexistantes ont été associées avec un risque accru de cancer du poumon. Ces maladies incluent les bronchopneumopathies chroniques obstructives, la fibrose pulmonaire idiopathique, la pneumoconiose et la tuberculose. Les bronchopneumopathies chroniques obstructives présentent le plus fort risque de cancer bronchique associé (Billelo, 2002).

2.3. Types histologiques

Les deux types histologiques majeurs de cancer du poumon sont les cancers bronchiques non-à petites cellules (CBNPC) et les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC). En effet, ces deux types de cancer du poumon présentent des caractéristiques cliniques différentes dans leur présentation, leur dissémination métastatique et leur réponse à la thérapie. (Travis, 2002).

Le diagnostic du cancer bronchique peut être établi par histologie ou par cytologie. L'étude histologique dans le diagnostic du cancer du poumon est basée sur l'examen de divers types de prélèvements, incluant la bronchoscopie, la biopsie par aspiration, les lavages broncho-alvéolaires et les biopsies chirurgicales (thoracoscopie, biopsie d'excision, lobectomie ou pneumonectomie) (Travis, 2002).

2.3.1. Les cancers bronchiques non-à petites cellules

Les cancers bronchiques non-à petites cellules représentent 75% des cancers bronchiques (Cersosimo, 2002). Ils regroupent les carcinomes épidermoïdes, les adénocarcinomes et les carcinomes à grandes cellules car ces types histologiques présentent des caractéristiques cliniques et biologiques similaires (Yokota, 2004).

Les CBNPC sont relativement chimiorésistants et sont traités dans un premier temps par chirurgie si le diagnostic est précoce (Yokota, 2004).

2.3.1.1. Adénocarcinomes

Les adénocarcinomes représentent actuellement le type histologique de cancer du poumon le plus fréquent aux Etats Unis et au Canada. Environ 30% des cancers bronchiques sont des adénocarcinomes. Ils sont souvent accompagnés d'une effusion pleurale maligne (Travis, 2002). Les adénocarcinomes sont caractérisés par le développement précoce de métastases alors que souvent les symptômes du développement de la tumeur primaire ne sont pas encore visibles (Hoffman, 2000).

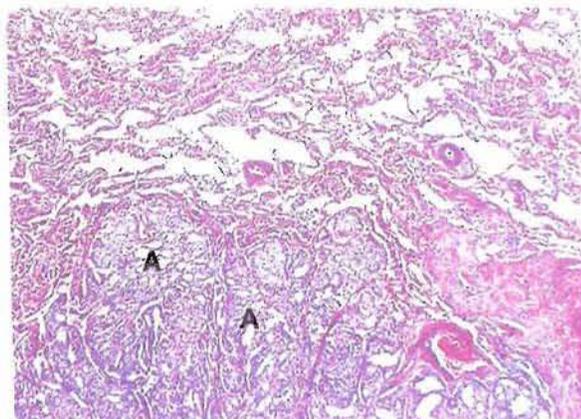
Les adénocarcinomes sont divisés en plusieurs sous-groupes de cancers bronchiques qui comprennent les adénocarcinomes glandulaires, les adénocarcinomes papillaires, les adénocarcinomes bronchoalvéolaires et les adénocarcinomes muco-sécrétants. La plupart des adénocarcinomes sont histologiquement hétérogènes consistant en deux types histologiques ou plus coexistant dans la même tumeur (Travis, 2002).

Les adénocarcinomes glandulaires sont caractérisés par le développement de cellules tumorales formant des glandes et des acini. Les adénocarcinomes papillaires sont caractérisés par le développement de structures papillaires à la surface de fins noyaux fibrovasculaires. Les adénocarcinomes bronchoalvéolaires sont peu communs, ils sont constitués de cellules uniformes cuboïdales proliférant le long de septums alvéolaires. Les adénocarcinomes muco-sécrétants sont quant à eux caractérisés par des cellules tumorales peu différenciées produisant de la mucine dans leur cytoplasme (Figure 3) (Travis, 2002).

Figure 3 **Adénocarcinome pulmonaire.**

A : acinus rempli de mucus.

(Wheater, 1986)



Les adénocarcinomes sont préférentiellement rencontrés chez les femmes et les hommes jeunes. Les cancers du poumon se développant chez des non fumeurs sont typiquement des adénocarcinomes, de même que ceux se développant chez des ex-fumeurs (Brambilla, 2001).

L'évolution de la fabrication des cigarettes avec d'abord l'utilisation d'un filtre puis la commercialisation de cigarettes « light » contenant des concentrations inférieures de nicotine et de nitrosamines, semble être à l'origine de ce changement de type histologique prédominant (Bilello, 2002). En effet, initialement, le développement de cigarettes avec filtres et/ou à plus faible teneur en nicotine et en goudron a fait diminuer l'incidence des cancers du poumon. Puis, le risque chez les fumeurs de cigarettes avec filtre a graduellement augmenté pour atteindre le niveau de risque précédemment observé chez les fumeurs de cigarettes sans filtre. De plus, les fumeurs de cigarettes à faible teneur en nicotine (moins de 1.2 mg de nicotine par cigarette) ont commencé à inhaler la fumée plus profondément, afin de maintenir leur niveau d'absorption de nicotine. Une inhalation profonde augmente la biodisponibilité des nitrosamines au niveau des régions bronchoalvéolaires, favorisant ainsi le développement d'adénocarcinomes (Rioux, 2000, Brooks, 2005). Une autre hypothèse suggère que l'utilisation du filtre diminue la taille moyenne des particules de fumée inhalées favorisant leur dépôt dans des régions pulmonaires périphériques (Brooks, 2005).

2.3.1.2. Carcinomes épidermoïdes

Les carcinomes épidermoïdes représentent environ 30% de l'ensemble des cancers bronchiques (Travis, 2002). Ils restent le type de cancer le plus fréquemment diagnostiqué en Europe (Hoffman, 2000, Berg, 2005). Deux tiers des carcinomes épidermoïdes sont formés par des tumeurs de localisation centrale, le tiers restant est constitué de tumeurs pulmonaires périphériques (Travis, 2002). Les carcinomes épidermoïdes sont constitués de cellules tumorales bien différenciées avec un cytoplasme abondant et kératinisé (Travis, 2002).

Il n'y a pas d'épithélium épidermoïde dans le poumon normal, et les carcinomes épidermoïdes proviennent de cellules épithéliales bronchiques par dysplasie épidermoïde (Yokota, 2004). La différenciation épidermoïde comprend la formation de ponts intercellulaires ainsi que la kératinisation sous deux formes principales : la kératinisation unicellulaire et la kératinisation en couches concentriques de cellules squameuses anormales. Les carcinomes

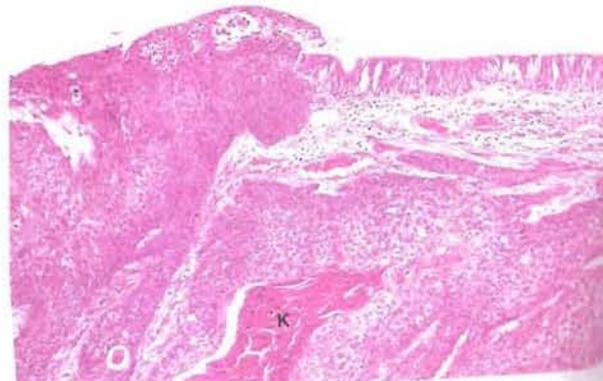
épidermoïdes se développent principalement dans les bronches segmentaires. La transformation des bronches lobaires et principales apparaît par extension (Figure 4) (Travis, 2002).

Les carcinomes épidermoïdes sont divisés en plusieurs sous-groupes de cancers bronchiques qui comprennent les carcinomes épidermoïdes papillaires, les carcinomes épidermoïdes à cellules claires, les carcinomes épidermoïdes à petites cellules et les carcinomes épidermoïdes basaloïdes (Travis, 2002).

Figure 4 **Carcinome épidermoïde bronchique.**

K : foyer de kératinisation

(Wheater, 1986)



Parmi les CBNPC, les carcinomes épidermoïdes sont les plus fréquemment rencontrés chez les fumeurs (Le Calvez, 2005).

2.3.1.3. Carcinomes à grandes cellules

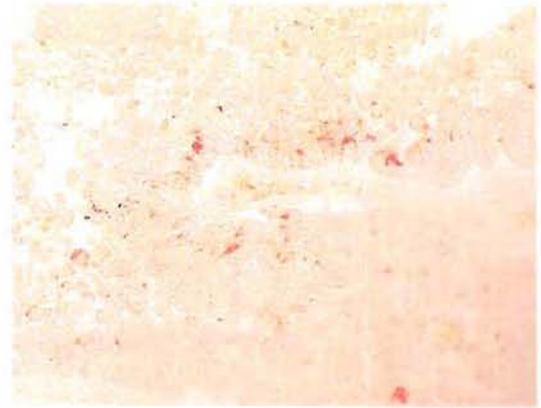
Les carcinomes à grandes cellules (CGC) représentent 9% de l'ensemble des cancers du poumon. La plupart du temps les CGC se développent dans la périphérie pulmonaire. Ils peuvent cependant parfois avoir une localisation centrale (Travis 2002).

Les CGC sont caractérisés par l'apparition de grandes plages tumorales nécrotiques. Ils sont constitués de grandes cellules organisées en couches ou en nodules avec un cytoplasme abondant et des noyaux vésiculaires avec un nucléole saillant (Figure 5). Les CGC incluent les CGC neuroendocrines, les CGC basaloïdes et les CGC à cellules claires (Travis, 2002).

Figure 5 **Carcinome neuroendocrine à grandes cellules.**

Marquage à la chromogranine A (Les chromogranines sont une famille de protéines localisées exclusivement dans les granules de sécrétion des cellules endocrines, neuroendocrines et des neurones).

(Milleron, 1995)



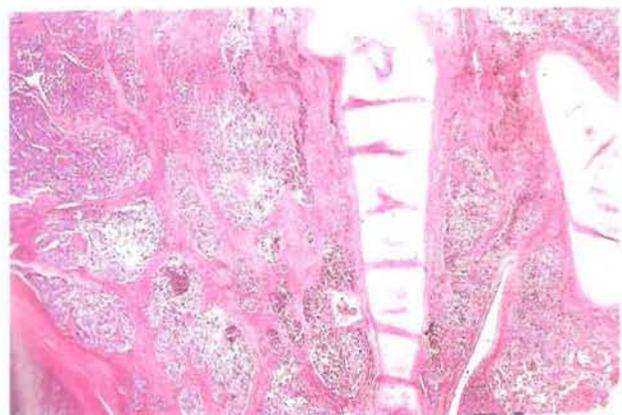
2.3.2. Les cancers bronchiques à petites cellules

Les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC) proviennent de cellules épithéliales présentant des caractéristiques neuro-endocrines (Yokota, 2004). Les CBPC représentent 20% de l'ensemble des cancers bronchiques. Deux tiers des CBPC sont des masses tumorales périhilaires. Un CBPC typique est péribronchique avec infiltration de la sous-muqueuse bronchique et des tissus péribronchiques (Travis 2002).

Les CBPC sont caractérisés par le développement de petites cellules cancéreuses en amas denses avec un cytoplasme peu abondant, une chromatine nucléaire finement granulaire, un nucléole petit ou absent et de multiples mitoses. Ce type de cancer bronchique provoque souvent l'apparition de métastases ganglionnaires nombreuses et d'une nécrose tissulaire importante (Figure 6) (Travis 2002).

Figure 6 **Carcinome bronchique à petites cellules.**

(Wheater, 1986)



Les CBPC sont généralement agressifs avec une dissémination métastatique précoce. Ils présentent donc souvent des métastases au moment du diagnostic (Travis, 2002). Les lésions précancéreuses de ces cancers sont alors peu connues puisqu'ils sont déjà à des stades avancés au moment du diagnostic. Les CBPC sont radio- et chimio-sensibles, c'est pourquoi ils sont traités de façon quasi-systématique par ces deux techniques (Yokota, 2004).

L'association avec la consommation tabagique est très forte pour les CBPC (Hoffman, 2000 ; Le Calvez, 2005).

2.4. Processus de carcinogenèse bronchique

Le but de l'étude moléculaire de la carcinogenèse bronchique est d'améliorer les techniques de diagnostic précoce et d'identifier les processus responsables de la prolifération cellulaire incontrôlée et de la dissémination métastatique, afin de transcrire la dysfonction de régulateurs « clés » du cycle cellulaire et de cascades de transduction de signaux en outils cliniques. L'épidémiologie moléculaire du cancer du poumon peut aider à l'élaboration de nouvelles stratégies cliniques en complément de la chirurgie, de la radiothérapie et de la chimiothérapie (Fong, 2002).

Le cancer bronchique est d'origine unicellulaire, provient d'un progéniteur commun, et se développe de façon hétérogène. Dans la majorité des cas, la cellule d'origine requiert jusqu'à 10 mutations pour devenir maligne. Les agents mutagènes et carcinogènes créent des altérations génétiques qui, de concert avec un processus de réparation de l'ADN défaillant et une augmentation de la réplication, aboutissent finalement à l'émergence d'un phénotype malin. Plusieurs anomalies génétiques sont observées, avec une fréquence élevée, dans la majorité des types de cancer du poumon. La population tumorale initiale, plutôt homogène, progresse vers une population plus hétérogène, et plus instable génétiquement. A ce stade, les cellules transformées sont plus susceptibles de présenter des brisures chromosomiques, ainsi que des changements de ploïdie. Tous les clones pré-malins ou malins sont sujets à une sélection, les clones les mieux adaptés seront favorisés, notamment ceux qui échappent à la reconnaissance du système immunitaire, qui ont une expression accrue de facteurs de croissance et de leurs récepteurs, ou encore qui expriment des facteurs d'angiogenèse (Rioux, 2000).

Les carcinogènes majeurs contenus dans la fumée de cigarette sont les hydrocarbures polycycliques (comme le benzo(a)pyrène), les nitrosamines et les amines aromatiques. Les carcinogènes de la fumée de cigarette sont enzymatiquement activés en électrophiles chimiquement réactifs qui se fixent à l'ADN et produisent des lésions dans certains oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs, ainsi que dans des gènes codant pour des protéines de réparation de l'ADN. La susceptibilité au cancer du poumon chez les fumeurs peut être reliée à la balance individuelle entre la capacité d'activation de procarcinogènes inhalés et la capacité de détoxification de ces carcinogènes. La susceptibilité individuelle au cancer du poumon peut être influencée par des polymorphismes génétiques et être modifiée par le tabac (Fong, 2002)

2.4.1. Les différentes étapes de l'oncogénèse

Les cancers résultent de la transformation progressive de lésions précurseurs. Les cellules pré-néoplasiques acquièrent des altérations génétiques somatiques qui évoluent par étapes vers une tumeur invasive par expansion clonale. Les stades de cancérisation passent de la cellule normale à l'hyperplasie (ou métaplasie), puis à la dysplasie, pour aboutir à la formation d'un carcinome in situ.(Fong, 2002).

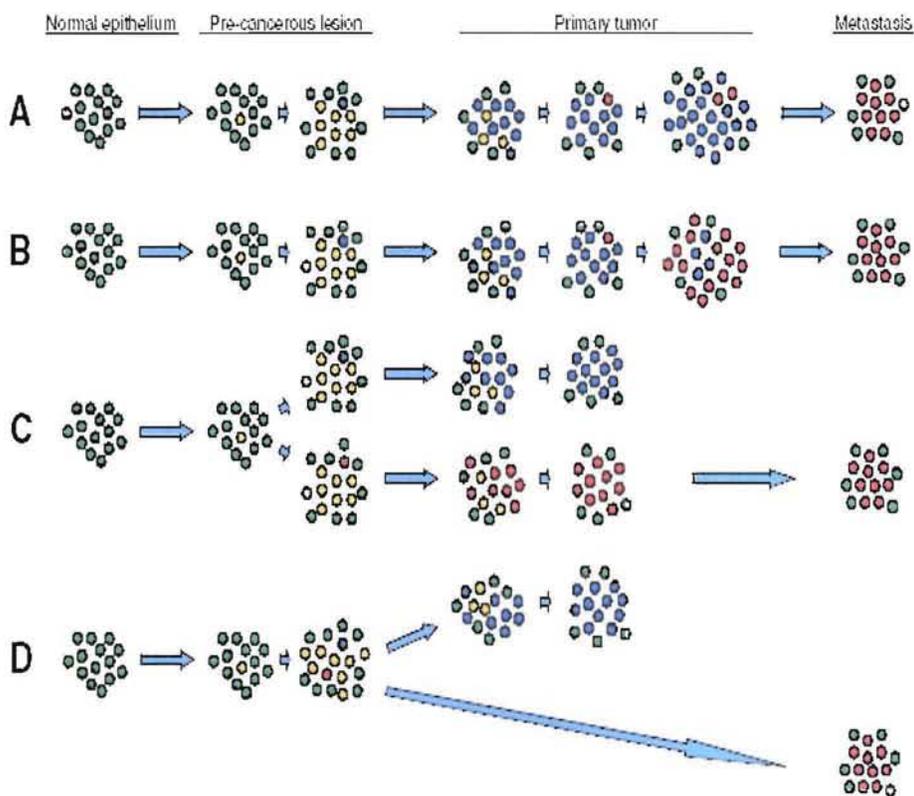
La première étape est souvent une perte allélique en 3p, puis en 9p (p16), 13q (RB) 8p et 17p, suivie par des mutations des gènes de la famille ras. Viennent ensuite les mutations de p53 (Fong, 2002 ; Yokota, 2004). La perte d'hétérozygotie sur les chromosomes 2q, 9p, 18q et 22q est significativement plus fréquente chez les patients présentant des métastases (Yokota, 2004).

Plusieurs modèles de la progression tumorale du cancer du poumon sont proposés. La formation de métastases peut provenir d'une cellule unique située dans la tumeur primaire. Dans ce cas, les gènes responsables du processus métastatique n'influencent pas la prolifération de la tumeur primaire, mais toutes les cellules métastatiques sont susceptibles de porter des gènes responsables du processus métastatique (Figure 7 A). Cette formation métastatique peut avoir lieu très tôt dans la carcinogénèse, et la tumeur primaire et les métastases auront alors des croissances indépendantes (Figure 7 D). Un autre modèle de développement tumoral du cancer du poumon peut être l'apparition de plusieurs cellules à caractère métastatique dans la tumeur primaire produisant la formation de métastases et influençant les capacités de prolifération de la tumeur primaire (Figure 7 B). Cette formation métastatique peut là aussi avoir lieu très tôt dans

la carcinogenèse, la tumeur primaire et les métastases auront alors également des croissances indépendantes (Figure 7 C) (Yokota, 2004).

Figure 7 **Différents modèles génétiques de la progression tumorale.**

● : cellules épithéliales normales, ○ : cellules pré-cancéreuses, ● : cellules cancéreuses sans capacités métastatiques, ● : cellules cancéreuses avec capacités métastatiques.



Yokota, 2004.

2.4.2. Altérations géniques

L'instabilité génétique et épigénétique du cancer du poumon existe à deux niveaux :

- au niveau chromosomique, avec des pertes et des gains massifs,

- et au niveau nucléotidique incluant des modifications d'une ou plusieurs bases et des méthylations des gènes promoteurs.

Les cancers du poumon sont caractérisés par de nombreuses anomalies chromosomiques numériques (aneuploïdie) et des anomalies de structure incluant des délétions, des amplifications et des translocations non réciproques. Des altérations des microsatellites sont rencontrées dans 35% des carcinomes bronchiques à petites cellules et dans 22% des carcinomes bronchiques non-à petites cellules (Fong, 2002).

Les altérations géniques incluent de nombreuses pertes alléliques totales ou segmentaires à divers loci (dont 3p, 9p, 13q 8p et 17p), l'aneuploïdie, les altérations de p53 et la surexpression de K-ras, myc et de Bcl-2 (Fong, 2002 ; Yokota, 2004).

L'hyperméthylation de promoteurs tumeur-spécifiques est un mode majeur d'inactivation de nombreux gènes. L'hyperméthylation des promoteurs constitue une modification épigénétique et non pas génétique de l'ADN (Yokota, 2004).

Les études de cartographie des délétions apparaissant dans les cancers bronchiques définissent plus de 30 régions situées sur 21 bras chromosomiques différents comme des loci potentiels de gènes suppresseurs de tumeurs dans les CBNPC et les CBPC. Ceci suggère que de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs restent à identifier (Yokota, 2004).

La perte d'hétérozygotie est très fréquente chez les patients atteints de cancer du poumon et le nombre de pertes d'hétérozygotie augmente avec l'augmentation de la consommation tabagique (Yoshino, 2003) (Tableau 1).

Tableau 1 Altérations de gènes suppresseurs de tumeurs et d'oncogènes dans diverses lignées cellulaires de cancer du poumon.

Cell line	Histological subtype ¹⁾	Genetic and epigenetic alterations ²⁾														
		Tumor suppressor gene										Oncogene				
		p53	RB	p16	p15	p14ARF	FHIT	PTEN	SMAD4	TGF β RII	MYO18B	PPP1R3	KRAS	β -catenin	C-myc	N-myc
Lu24	SCC	Mut	Mut								HD					
Lu135	SCC	Mut	Mut													Amp
N417	SCC	Mut	Mut						HD			Mut				Amp
NCI-H209	SCC	Mut	Mut									Mut				
Lu134	SCC	Mut	—						HD							
Lu139	SCC	Mut	—													Amp
NCI-H526	SCC	Mut	—									Mut				Amp
NCI-H774	SCC	Mut	—						HD							
SBC-5	SCC	Mut		Mut												
NCI-H841	SCC	Mut		Met												Amp
NCI-H69	SCC	Mut										Mut				Amp
NCI-H82	SCC	Mut														Amp
Ms18	SCC															
NCI-H322	ADC	Mut		HD	HD	HD										
PC-3	ADC	Mut		HD	HD	HD										
PC-14	ADC	Mut		HD	HD	HD										
RERF-LCOK	ADC	Mut		HD	HD	HD										
VMRC-LCD	ADC	Mut		HD	HD	HD					Mut					Amp
Ma-17	ADC	Mut		HD	HD	HD										
Ma-24	ADC	Mut		HD	HD	HD						Mut				
PC-9	ADC	Mut		Mut												
Ma-1	ADC	Mut		Mut												
Ma-29	ADC	Mut		Mut		Mut		HD			Mut					
RERF-LCMS	ADC	Mut		Mut		Mut		HD								
ABC-1	ADC	Mut		Met												
NCI-H23	ADC	Mut		Met							Mut					Amp
NCI-H441	ADC	Mut		Met								Mut (12Cys)				Amp
Ma-10	ADC	Mut		Met								Mut (12Val)				
PC-7	ADC	Mut	—													Amp
A427	ADC			HD	HD	HD							Mut (12Asp)	Mut		
A549	ADC			HD	HD	HD					Mut		Mut (12Ser)			
Ma-26	ADC				Met											
LC1-Sq	SQC	Mut		HD	HD	HD										
NCI-H157	SQC	Mut		Mut		Mut			Mut			Mut	Mut (12Arg)			
NCI-H520	SQC	Mut		Mut												
EBC-1	SQC	Mut		Met	HD	HD										
PC-10	SQC	Mut						HD					Mut			
NCI-H596	ASC	Mut	—							Mut						
Ma-25	LCC	Mut		HD	HD	HD										
Lu99	LCC	Mut		HD		HD										
Lu65	LCC	Mut	Mut	Mut									Mut (12Cys)			Amp
Ma-2	LCC	Mut		Mut		Mut		HD			Mut	Mut				
PC-13	LCC	Mut		Met												
NCI-H1155	LCC	Mut	Mut						Mut	Mut				Mut (61His)		

1) SCC, small cell carcinoma; ADC, adenocarcinoma; SQC, squamous cell carcinoma; ASC, adenosquamous carcinoma; LCC, large cell carcinoma.
2) Mut, mutation; HD, homozygous deletion; Met, hypermethylation; —, loss of expression (given for RB only); Amp, amplification. Blue, inactivation of tumor suppressor gene; Pink, activation of oncogene; Gray, not examined; Blank, no aberration.

Yokota, 2004

2.4.2.1. Oncogènes

L'activation des oncogènes est souvent due à des mutations ponctuelles, des amplifications géniques ou des réarrangements. Les produits des oncogènes induisent l'expression de facteurs de croissance par stimulation de boucles autocrines et paracrines ainsi

que l'activation de nombreuses voies de signalisation aboutissant à la production de peptides régulateurs par les cellules tumorales ou les cellules saines adjacentes (Osada, 2002 ; Fong, 2002).

2.4.2.1.1. Gènes de la famille ras

Les gènes de la famille ras (K-ras, H-ras et N-ras) codent pour des protéines membranaires et leur activation au niveau cellulaire provoque des modifications lipidiques de la membrane. K-ras est le gène ras le plus exprimé dans les cancers du poumon et il est muté dans 15 à 20% des CBNPC et dans 20 à 30% des adénocarcinomes (Fong, 2002). Les mutations de K-ras sont rares dans les carcinomes épidermoïdes (Le Calvez, 2005). K-ras est moins fréquemment altéré que p53 ou que la voie p16-Cycline D1-RB dans les cancers bronchiques, ce qui suggère que les mutations de K-ras pourraient être associées à des stades plus tardifs de progression maligne ou à des sous types de cancers bronchiques (Yokota, 2004). Les mutations de K-ras sont corrélées avec la consommation tabagique. La voie de signalisation ras active des produits de proto-oncogènes, comme Myc, qui induisent la transcription de gènes de croissance cellulaire (Fong 2002).

2.4.2.1.2. ErbB

Des anomalies des récepteurs des neurégulines ErbB1 (=récepteur de l'EGF) et ErbB2 (=HER2/neu) sont fréquemment mises en évidence dans les cancers bronchiques. Les récepteurs ErbB font partie d'une famille de récepteurs transmembranaires aux tyrosines kinases. Des taux élevés de récepteurs ErbB augmentent le potentiel métastatique des CBNPC (Fong, 2002). ErbB2 est plus fréquemment surexprimé dans les adénocarcinomes que dans les carcinomes épidermoïdes (Nakamura, 2003).

2.4.2.1.3. Cyclooxygénase 1 et 2 (COX-1-2)

Les enzymes cyclooxygénases ont beaucoup attiré l'attention car l'utilisation d'aspirine a été associée à une diminution de 40 à 50% du risque de cancer du colon. Or COX est la cible

principale de la plupart des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS). Les AINS inhibent la formation d'un cancer bronchique dans des modèles animaux. Deux isoformes de COX sont identifiées : COX1 qui est exprimée constitutivement dans la majorité des tissus et joue un rôle dans l'homéostasie tissulaire et COX2 qui est inductible par de nombreuses substances dont des mitogènes et des médiateurs de l'inflammation (Hastürk, 2002).

L'expression de COX2 apparaît préférentiellement dans les adénocarcinomes par rapport aux carcinomes épidermoïdes alors que COX1 est exprimée par plus de cellules tumorales dans les carcinomes épidermoïdes que dans les adénocarcinomes (Hastürk, 2002).

COX2 est plus exprimée chez les patients montrant une dissémination métastatique ou ganglionnaire, ce qui suggère que COX2 pourrait jouer un rôle dans l'acquisition d'un potentiel métastatique dans les adénocarcinomes. De plus, l'expression de COX2 est associée à la consommation tabagique (Hastürk, 2002).

2.4.2.1.4. Bombésine/gastrin releasing peptide (GRP)

La bombésine/GRP joue un rôle dans le développement et la réparation pulmonaire au niveau embryonnaire. Chez l'adulte, elle est exprimée dans de nombreux tissus parmi lesquels le système nerveux central et le tube digestif. La réactivation de la bombésine/GRP est mise en évidence dans 20 à 60% des CBPC, elle est moins présente dans les CBNPC (Fong, 2002 ; Saurin, 2000).

Dans le poumon, la bombésine/GRP est détectée à la fois dans l'épithélium tumoral et non tumoral. L'activation autocrine du récepteur à la bombésine/GRP a été mise en évidence dans des lignées de CBPC. La bombésine/GRP exerce un effet chimiotactique vis-à-vis des cellules tumorales exprimant les récepteurs à la bombésine/GRP dans les CBPC (Saurin, 2000).

2.4.2.1.5. Bcl-2

Bcl2 est un proto-oncogène anti-apoptotique. Bcl2 est exprimé dans 75 à 95% des CBPC, il est plus exprimé dans les carcinomes épidermoïdes que dans les adénocarcinomes (Fong, 2002). Bcl-2 joue un rôle important dans la régulation de la survie des cellules B et T

sélectionnées ainsi que lors de la maturation. Le virus d'Epstein-Barr contient un gène présentant une séquence homologue de Bcl-2 (Goldsby, 2000).

2.4.2.2. Gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs de tumeurs sont classiquement inactivés par la délétion structurale d'un allèle parental combinée avec une mutation ponctuelle (ou petite) ou avec l'inactivation épigénétique de l'autre allèle par méthylation (Fong, 2002). Les mutations intervenant dans l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs sont pour la plupart des anomalies de réparation de l'ADN avec transversion G : C (en particulier pour p53) et T : A ou des cassures aux points de jonctions terminales (Yokota, 2004).

2.4.2.2.1. p53

Le gène suppresseur de tumeur p53 participe au maintien de l'intégrité génomique dans le contexte de dommages de l'ADN causés par les carcinogènes ainsi que par les radiations γ et les ultra violets. L'activation de p53 aide à réguler la transition G1/S du cycle cellulaire, l'analyse des dommages de l'ADN en phase G2/M et l'entrée de la cellule en processus d'apoptose. Des dysfonctions dans le gène p53 permettent la survie de cellules contenant des dommages de l'ADN, ouvrant une brèche pour l'évolution en cellule tumorale (Fong, 2002).

La mutation ponctuelle d'un G en T dans la séquence de p53 est caractéristique, elle est présente très fréquemment dans les cancers bronchiques. La fréquence de mutation de p53 est la plus forte dans les carcinomes épidermoïdes et les CBPC (Yokota, 2004).

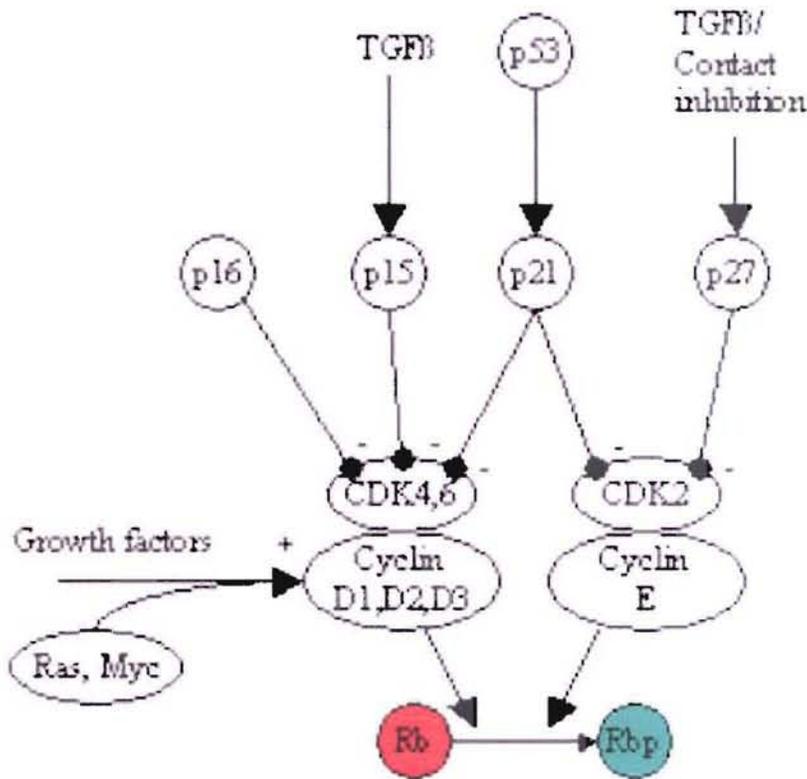
Les mutations de p53 sont très fréquentes dans les cas de cancer du poumon chez les fumeurs (Le Calvez, 2005 ; Yokota, 2004).

2.4.2.2.2. Voie p16-Cycline-D1-Rétinoblastome (RB)

La voie de transduction p16-Cycline-D1-RB est essentielle dans le contrôle de la transition G1/S du cycle cellulaire. Des anomalies protéiques de RB sont mises en évidence dans 90% des CBPC et dans 15 à 30% des CBNPC. Des anomalies de la cycline D1 sont mises

en évidence dans 25 à 47% des CBNPC. Les altérations de p16 peuvent être associées à la progression tumorale, au stade et à la survie (Fong, 2002) (Figure 8).

Figure 8 Schématisation de la voie de transduction de signaux p16-Cycline-D1-RB.



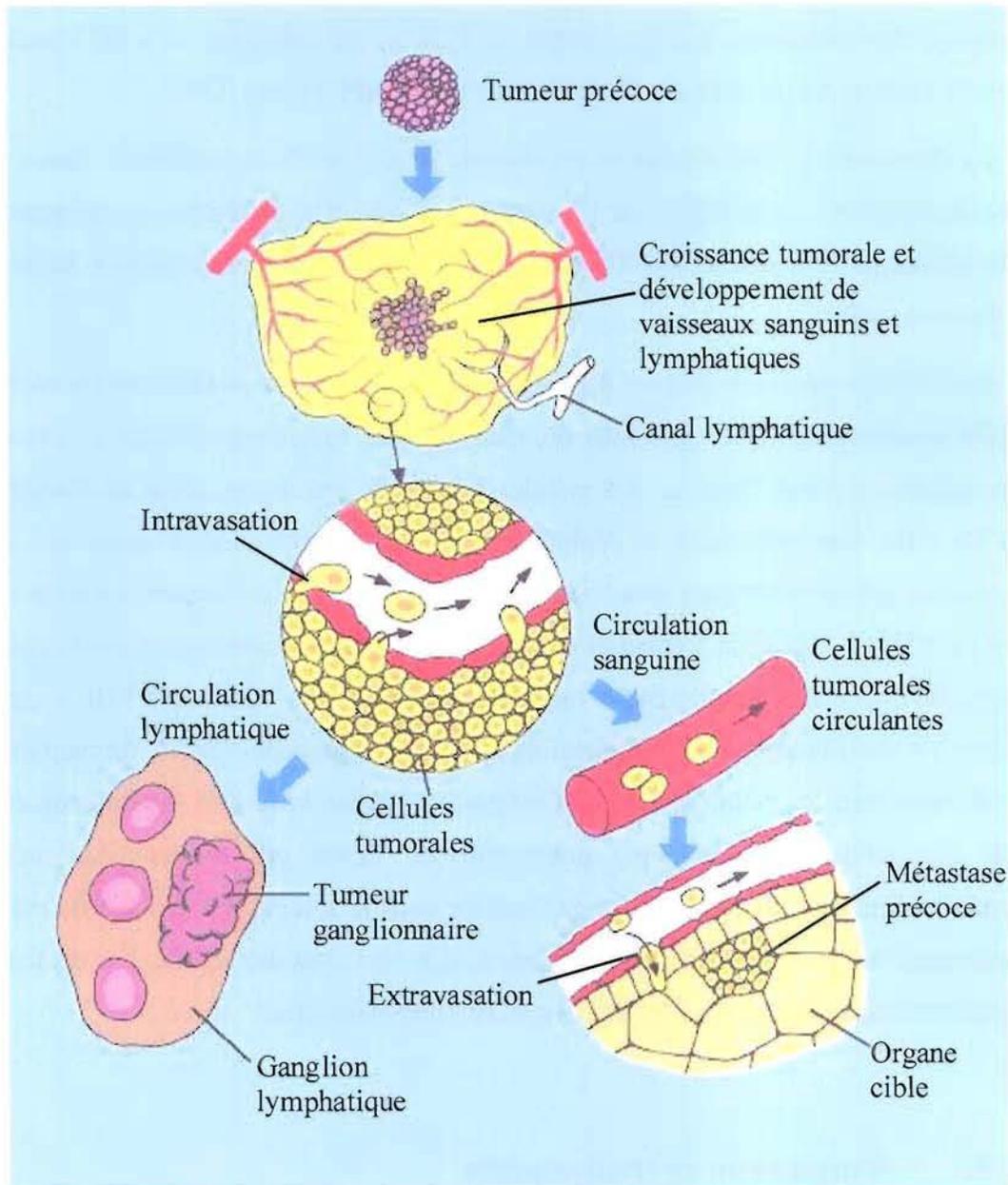
<http://www.leiomyosarcoma.info/images/geneti2.jpg>

2.4.3. Cascade métastatique

Le processus de métastase tumorale est un phénomène dynamique complexe impliquant à la fois des interactions des cellules tumorales entre elles et des interactions entre les cellules tumorales et le tissu hôte. Le processus de métastase tumorale peut être sous divisé en un certain nombre d'étapes biologiques séquentielles dont la régulation n'est pas encore entièrement comprise (Figure 9).

La première étape du processus métastatique est caractérisée par la dissociation de cellules tumorales de la tumeur primaire et leur infiltration active du stroma environnant. C'est l'étape *d'invasion*. Ces cellules tumorales pénètrent le système vasculaire ou lymphatique dans une étape qualifiée *d'intravasation*. Elles sont ensuite distribuées de façon passive par le courant vasculaire ou lymphatique vers les organes distants où elles sont arrêtées par leur taille dans les plus petits vaisseaux. Les cellules quittent alors les vaisseaux et envahissent l'organe cible, c'est *l'extravasation*. Cette dernière étape d'invasion n'aboutit pas forcément à l'apparition de métastases détectables puisque les cellules tumorales peuvent être éliminées par le système immunitaire ou rester "silencieuses" pendant un temps variable, c'est la *dormance tumorale*. Les cellules tumorales dormantes, lorsqu'elles sont stimulées par des facteurs environnementaux, augmentent leur activité proliférative afin d'établir des masses tumorales secondaires détectables (MacDonald, 2002 ; Massin, 2004).

Figure 9 Schématisation des différentes étapes de la cascade métastatique.



http://www.drugdevelopment-technology.com/projects/erbitux/images/3_Tumour_Spread_Mechanisms.jpg

D'un point de vue moléculaire, la dissociation des cellules tumorales nécessite la perte des liaisons intercellulaires homotypiques qui sont médiées par des molécules d'adhésion, notamment celles de la superfamille des cadhérines (Massin, 2004). Les E-cadhérines sont responsables de l'organisation, de la structure et de la morphogenèse des tissus épithéliaux. L'expression des intégrines, qui permettent la fixation au collagène et à la laminine des membranes basales, est par ailleurs diminuée dans les CBNPC (Fong, 2002).

La dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) et de la membrane basale par les cellules tumorales est essentielle pour l'invasion tumorale et la formation de métastases. Les métalloprotéinases de la matrice (MMP) sont responsables de la dégradation de la MEC (Fong, 2002 ; Gouyer, 2005).

Des cellules hématopoïétiques dérivant de la moelle osseuse et exprimant le récepteur 1 du VEGF semblent constituer des sites pré-métastatiques tumeur-spécifiques et forment des clusters cellulaires avant l'arrivée des cellules tumorales, selon une étude de Kaplan *et al.* (2005). En effet, dans cette étude, la déplétion en VEGF1 chez des souris annule la formation de ces clusters pré-métastatiques et prévient le développement de métastases. La reconstitution du pool de VEGF1 permet la formation de ces clusters et le développement métastatique. De plus, les cellules VEGF1+ expriment le very late antigen 4 (VLA-4). Or, le VEGF augmente la production par les fibroblastes de fibronectine, qui est un ligand de VLA-4, formant ainsi une niche tolérante pour les cellules tumorales migrantes. Kaplan *et al.* ont réalisé cette étude en utilisant des cellules de carcinome pulmonaire de Lewis qui forment des métastases préférentiellement dans les poumons et quelquefois dans le foie, et des cellules de mélanome B16 présentant un profil métastatique plus étendu, injectées chez des souris. Les résultats cités précédemment sont valables pour les deux types cellulaires injectés.

2.5. Diagnostic et traitements

Les symptômes associés aux cancers du poumon sont peu spécifiques, ce qui explique en partie un diagnostic souvent tardif. Il faut effectivement déplorer que plus de 80 % des

cancers broncho-pulmonaires ne soient actuellement pas accessibles à la chirurgie, leur diagnostic se faisant encore à un stade trop tardif (Rossant, dossier cancer du poumon).

Les symptômes les plus souvent reliés à une tumeur pulmonaire primaire incluent une toux (inquiétante, rebelle mais souvent négligée chez le fumeur bronchitique chronique), une dyspnée (gêne respiratoire), une hémoptysie (crachats sanguinolents), voire une pneumonie obstructive. Des douleurs thoraciques peuvent suggérer une extension à la plèvre pariétale ou une extension extra-pulmonaire (Hoffman, 2000). D'autres symptômes peuvent également aiguiller le médecin vers la recherche d'une tumeur primaire pulmonaire, comme une expectoration variable et inconstante, un wheezing (respiration sifflante) survenant dans certaines positions, des pneumopathies à répétition, une dysphonie (changement dans le timbre de la voix), une suppuration pulmonaire, un syndrome de compression de la veine cave supérieure (l'obstruction par la tumeur du drainage veineux provoque la dilatation des veines collatérales du cou et de la partie supérieure du thorax) (Rossant, dossier cancer du poumon).

Parfois, le début est plus trompeur, il peut s'agir de troubles neurologiques provoqués par des métastases (compression médullaire, épilepsie, hypertension intracrânienne (HIC)...), d'un syndrome paranéoplasique (cutané, endocrinien, neurologique), de troubles ostéo-articulaires, de fracture(s) spontanée(s) (métastases osseuses) (Rossant, dossier cancer du poumon).

Le développement d'une tumeur pulmonaire produit également une altération de l'état général du malade (asthénie, anorexie, amaigrissement, fièvre au long cours et grande fatigue) (Hoffman, 2000).

Les métastases sont fréquentes dans le cancer du poumon. Les tumeurs bronchiques métastasent préférentiellement dans un autre lobe pulmonaire ou dans l'autre poumon, dans le cerveau, la cavité pleurale, les os, le foie, les glandes surrénales ou la peau. Le processus métastatique apparaît le plus souvent chez les patients présentant un cancer à petites cellules (CBPC) ou un adénocarcinome (Hoffman, 2000).

2.5.1. Stades de cancérisation selon la classification TNM

La classification T.N.M remplit plusieurs rôles : aider le clinicien à établir le traitement, fournir des indications sur le pronostic, faciliter l'évaluation des résultats thérapeutiques,

permettre l'échange de renseignements entre les centres et concourir à la poursuite des recherches concernant le cancer du poumon chez homme.

Cette classification repose sur la définition précise de l'envahissement de la tumeur par la détermination de 3 critères. Ce sont les stades :

T concernant la localisation primitive du néoplasme

N concernant l'envahissement tumoral des ganglions pulmonaires

M décrivant la présence ou non de métastases à distance.

La technique de description et de classification applicable à toutes les localisations de cancer consiste en l'identification de l'extension de la maladie en utilisant les 3 symboles : T, N et M, l'attribution à chacun d'entre eux d'une série de chiffres indiquant les degrés de l'envahissement ou de l'extension tumorale ainsi que le groupement des facteurs TNM en un petit nombre de classes cliniques (Mountain, 2002), (Tableau 2).

Tableau 2 Description des stades tumeur primitive (T) et extension ganglionnaire (N) pour l'établissement de la classification TNM.

Classification du stade T

Statut T	Description
T1	Tumeur de 3 cm ou moins, entourée de parenchyme pulmonaire ou la plèvre, sans invasion des bronches lobaires proximales en bronchoscopie.
T2	Tumeur de plus de 3cm ou tumeur envahissant la plèvre viscérale ou associée à une atélectasie n'intéressant pas tout un poumon. A la bronchoscopie, la tumeur est située au niveau lobulaire et à au moins 2cm de la carène.
T3	Tumeur de taille indifférente avec une extension à la paroi thoracique, au diaphragme, à la plèvre ou au péricarde sans atteinte du cœur, des grands vaisseaux, de la trachée, de l'oesophage ou du corps vertébral. ou atteinte de la bronche principale sans atteinte de la carène. ou atélectasie de tout un poumon.
T4	Atteinte du médiastin, du cœur, des grands vaisseaux, de la trachée, de l'oesophage, du corps vertébral, de la carène ou épanchementpleural positif.

Classification du stade N

Statut N	Description
N0	Pas de métastases des ganglions régionaux.
N1	Atteinte(s) ganglionnaire(s) homolatérale(s) péri-bronchique(s) et/ou homolatérale(s) hilare(s) y compris une extension directe à partir de la tumeur primitive.
N2	Adénopathie(s) régionale(s) médiastinale(s) homolatérale(s) et/ou sous-carénaire(s).
N3	Atteinte(s) ganglionnaire(s) médiastinale(s) contro-latérale(s), hilare(s) contro-latérale(s), scalénique(s) homo- ou contro-latérale(s) ou sus-claviculaire(s).

Mountain, 2002

Diverses techniques sont utilisées pour le diagnostic et la classification des cancers du poumon. La radiographie pulmonaire constitue le premier examen de détection de la tumeur et de son extension. Le scanner permet une analyse beaucoup plus précise de la localisation et de l'étendue de la tumeur. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est utile pour la détection et la localisation de la tumeur et de nodules périphériques. La plupart des tumeurs sont caractérisées par une augmentation du métabolisme du glucose. Cette augmentation peut être détectée par tomographie par émission de positrons (PET-scan) (McLoud, 2002).

2.5.2. Traitements

La chirurgie est indiquée en première intention chaque fois que possible. Une combinaison de radiothérapie et de chimiothérapie est maintenant couramment utilisée, en particulier pour traiter les cancers bronchiques de stade avancé ainsi que dans le traitement de tumeurs présentant des métastases. Cette combinaison est utilisée de façon quasi systématique pour le traitement des cancers bronchiques à petites cellules (CBPC) (Hoffman, 2000).

2.5.2.1. Chirurgie

La chirurgie est indiquée lorsqu'elle permet d'enlever la totalité de la tumeur. Pour opérer, il faut que le cancer soit de petite taille, localisé au poumon et que le patient soit dans un état général suffisamment bon pour supporter l'ablation d'une partie ou de tout un poumon (Rossant, dossier cancer du poumon).

Les tumeurs primaires pulmonaires peu étendues (stades T1N0 et T2N0) sont traitées préférentiellement par ablation chirurgicale. Il en est de même pour les tumeurs moyennement étendues (stades T1N1, T2N1 et T3N0). L'ablation chirurgicale de la tumeur est beaucoup moins souvent possible chez les patients présentant une tumeur étendue (stades T3 et T4 ainsi que les stades N2 et N3). La chirurgie n'est pas utilisée comme traitement des tumeurs de stade 4 (tumeurs présentant une ou des métastases). Les cancers bronchiques à petites cellules sont agressifs et disséminent facilement. Pour cette raison les CBPC ne sont généralement pas traités par ablation chirurgicale (Hoffman, 2000).

La chirurgie n'est possible que dans environ 25% des CBNPC. Le traitement chirurgical est généralement suivi d'une radiothérapie pour éliminer les cellules cancéreuses résiduelles et, parfois, de chimiothérapie. Le taux de guérison est fonction de la taille de la tumeur et de l'extension éventuelle (Rossant, dossier cancer du poumon).

2.5.2.2. Chimiothérapie

La chimiothérapie a pour objectif de détruire les cellules cancéreuses et d'éviter rechutes locales et métastases. Même si les résultats s'améliorent au cours du temps, ce but est loin d'être toujours atteint et elle doit presque toujours être associée à d'autres traitements : chirurgie, radiothérapie, hormonothérapie et immunothérapie. La chimiothérapie est un traitement systémique toxique pour la totalité des cellules capables de se diviser. Les chimiothérapies empêchent la synthèse d'ADN indispensable à la duplication des cellules et en détruisent le cytosquelette. Ces traitements s'appliquent particulièrement aux cancers à petites cellules, pour lesquels il est commun de supposer une extension du cancer à d'autres organes même si cette extension n'est pas localisée avec précision. De nombreux effets secondaires sont liés au caractère toxique systémique de ces traitements : anémie, fatigue, leucopénie (en

particulier neutropénie), thrombopénie, nausées et vomissements, aphtes, perte des cheveux, perte de poids, irritation des muqueuses, troubles digestifs et gynécologiques... (Heron, 2005).

Dans les tumeurs peu étendues (stades T1N0 et T2N0), la chimiothérapie réalisée avant une ablation chirurgicale (chimiothérapie néo-adjuvante) permet de prévenir le développement de tumeur secondaire. Une chimiothérapie post-opératoire est fréquemment réalisée chez les patients présentant des tumeurs moyennement étendues (stades T1N1, T2N1 et T3N0), afin d'éliminer les tumeurs satellites éventuelles et de diminuer les risques de résurgence tumorale (Hoffman, 2000). Les patients présentant une tumeur étendue (stades T3 et T4 ainsi que les stades N2 et N3) sont souvent traités par chimio- et radiothérapie combinées. Les patients chez qui il a été diagnostiqué une ou des métastases sont traités de façon systématique par une combinaison de chimiothérapie et de radiothérapie. La chimiothérapie est le traitement de prédilection des CBPC (Hoffman, 2000).

Les divers médicaments utilisés combinés en chimiothérapie proviennent de trois grandes classes pharmacologiques.

Les *anti-métabolites* interfèrent avec la synthèse des acides nucléiques pendant la phase S du cycle cellulaire. Ils comportent les antifolates, les analogues des bases puriques et les analogues des bases pyrimidiques (Heron, 2005).

Les médicaments *agissant au niveau de l'ADN* peuvent être alkylants, intercalants, inhibiteurs des topo-isomérases I et scindants. Ils agissent sur la duplication ou la transcription (Heron, 2005).

Les médicaments *agissant sur les fonctions cellulaires* contiennent les alcaloïdes antimétaboliques de la pervenche (inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline), les dérivés de l'if qui sont cytotoxiques pour les cellules en mitose (inhibiteurs de dépolymérisation de la tubuline), les épipodophyllotoxines (inhibiteurs de topo-isomérase) qui empêchent l'entrée en prophase, les éthers lipidiques (proches des phospholipides membranaires) qui induisent l'apoptose en créant des désordres membranaires, les anticorps monoclonaux, les inhibiteurs de transduction des signaux des tyrosines kinases (Heron, 2005).

2.5.2.3. Radiothérapie

La radiothérapie est un traitement local qui provoque beaucoup moins d'effets secondaires que la chimiothérapie. Du fait de son caractère local, la radiothérapie ne peut toutefois s'appliquer qu'à des tumeurs primaires localisées et peu profondes (Heron, 2005).

La radiothérapie est utilisée chez les patients présentant une tumeur primaire peu étendue, qui ne sont pas traitables par chirurgie. Une radiothérapie post-opératoire peut être réalisée chez les patients présentant des tumeurs moyennement étendues (stades T1N1, T2N1 et T3N0) afin d'éliminer les tumeurs satellites éventuelles et de diminuer les risques de récurrence tumorale. Les patients présentant une tumeur étendue (stades T3 et T4 ainsi que les stades N2 et N3) sont souvent traités par radio- et chimio-thérapie combinées. Les patients chez qui il a été diagnostiqué une ou des métastases sont traités de façon systématique par une combinaison de radiothérapie et de chimiothérapie. La radiothérapie peut être utilisée en combinaison avec la chimiothérapie pour le traitement des CBPC (Hoffman, 2000).

Il existe différentes sortes de radiothérapie :

- la radiothérapie externe transcutanée : elle utilise une source de rayonnements ionisants placée à distance des tissus irradiés (rayons gamma du cobalt, rayons X ou électrons des accélérateurs linéaires). Plus l'énergie de rayonnement est élevée plus les tissus touchés par la dose maximale sont profonds. Par exemple les rayons gamma et X touchent les tissus sous-cutanés alors que des rayons d'énergie supérieure les épargne (Heron, 2005).

- la curiethérapie : elle utilise des éléments radioactifs artificiels scellés, se présentant sous forme de fils (aiguilles vectrices, fils parallèles, Iridium 192), de source maintenue par une gaine (Cesium 137) ou de grains (Iode 125). Ces éléments radioactifs sont placés dans le tissu tumoral (curiethérapie interstitielle) ou à leur contact (curiethérapie endocavitaire). Ces sources sont parfois implantées définitivement (grains d'Iode 125). La curiethérapie est utilisée seule ou en complément de la radiothérapie externe, elle est réservée au traitement de la tumeur primaire qui doit être accessible. La curiethérapie permet de soumettre la tumeur à des doses élevées de radioactivité avec une décroissance de doses dans sa périphérie, permettant de délivrer la dose nécessaire à l'éradication de la tumeur visible et une dose inférieure adaptée aux extensions tumorales éventuelles non visibles macroscopiquement. Cette technique permet un assez bon respect des tissus sains (Heron, 2005).

- la radiothérapie métabolique : elle utilise des particules injectées dans la circulation et qui se fixent dans des gîtes préférentiels. Elle fait le plus souvent appel à l'iode 131 dans certaines formes de cancers de la thyroïde. De plus, certaines substances chimiques sont captées par les cellules tumorales de certains types de cancers et y atteignent des concentrations plus élevées que dans les tissus sains. (Heron, 2005).

2.5.2.4. Autres traitements

Un certain nombre d'autres traitements sont utilisés dans la prise en charge des cancers. Ils sont généralement non curatifs à eux seuls mais apportent une augmentation d'efficacité des autres traitements et une amélioration de la qualité de vie du patient (Heron, 2005)

L'immunothérapie utilisant divers anticorps monoclonaux peut être envisagée dans le cancer du poumon, deux médicaments disponibles sur le marché pouvant être utilisés dans certaines tumeurs bronchiques. En effet, le Trastuzumab (Herceptin™) est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre ErbB2 (=HER2/neu) et peut être utilisé pour le traitement des tumeurs surexprimant cette molécule. Le Cetuximab (Erbix™) est un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre ErbB1 (récepteur de l'EGF) et peut de même être utilisé pour le traitement des tumeurs surexprimant cette molécule (Heron, 2005).

Deux médicaments disponibles sur le marché : le Gefitinib (Iressa™) et l'Erlotinib (Tarceva™) sont également des inhibiteurs de la voie de prolifération tumorale dépendante de l'EGF. Ces deux médicaments sont de petites molécules qui inhibent spécifiquement la tyrosine kinase responsable de la transduction des signaux résultant de la liaison entre l'EGF et son récepteur (Heron, 2005).

Le proliférateur de péroxysomes PPAR γ est un régulateur cellulaire important car il inhibe la croissance et induit la différenciation des cellules cancéreuses. L'utilisation de ligands de PPAR γ pourrait représenter une nouvelle voie de thérapie anti-angiogénique pour les tumeurs multi-drogues résistantes (Panigrahy, 2002). Cependant il existe divers médicaments anti-angiogéniques sur le marché dont le Bevacizumab (Avastin™), un anticorps monoclonal humanisé qui se lie au VEGF, empêchant sa fixation à son récepteur cellulaire (Heron, 2005).

Le cancer du poumon n'est pas considéré comme un cancer hormono-dépendant et l'hormonothérapie n'est pas envisagée dans ce type de cancer (Heron, 2005).

La thérapie photodynamique constitue une autre modalité de traitement des cancers. C'est un traitement local utilisant des molécules photosensibles s'activant par éclairage à certaines longueurs d'onde. L'activation de ces photosensibilisateurs provoque la production de radicaux libres et de dérivés réactifs de l'oxygène capables de lyser directement les cellules tumorales. La production des espèces réactives de l'oxygène induit également une réponse immunitaire inflammatoire et des dommages dans la microvascularisation tumorale (Schneider, 2005). Une stratégie de photothérapie peut être utilisée dans le traitement de certains cancers du poumon, en particulier les tumeurs de stades précoces, centrales et de petite taille (Furukawa, 2005).

3. Les lymphocytes T

Les lymphocytes T tiennent leur nom de leur site de maturation principal, le thymus.

Les lymphocytes T sont des cellules essentielles du système immunitaire. Ils se différencient dans le thymus à partir de précurseurs hématopoïétiques s'engageant dans la lignée lymphocytaire T au niveau de la moelle osseuse. Le progéniteur commun des cellules lymphoïdes dérive lui même d'une cellule souche hématopoïétique pluripotente. Suite à une succession d'étapes de différenciation, elle est en effet capable de générer l'ensemble des lignées des cellules sanguines, c'est-à-dire les lignées lymphoïde, myéloïde, mégacaryocytaire et érythroïde (Legrand, 2002).

Les lymphocytes T constituent, avec les lymphocytes B, une classe cellulaire particulière, capable de reconnaître une molécule antigénique avec un très haut degré de spécificité. Cette reconnaissance est possible grâce aux récepteurs pour l'antigène (TCR pour les lymphocytes T et BCR pour les lymphocytes B) (Valitutti, 1997).

3.1. Le récepteur pour l'antigène des cellules T (TCR)

Le TCR est un hétérodimère formé de deux sous unités, respectivement α et β ou γ et δ . Les chaînes du TCR comportent chacune un domaine variable V et un domaine constant C présentant respectivement des homologies avec les domaines variables et constants des immunoglobulines (Flug, 1985). Les domaines variable et constant des chaînes du TCR sont reliés par un petit domaine charnière comportant un résidu cystéine impliqué dans la liaison inter-chaînes. Chaque chaîne contient un domaine transmembranaire hydrophobe dont les acides aminés, chargés positivement, interviennent dans les interactions avec les domaines transmembranaires des chaînes du complexe CD3, chargés négativement. Contrairement aux immunoglobulines (Ig), le TCR est monovalent et n'est pas sécrété (Janeway, 2001).

Chaque cellule T exprime environ 10^5 molécules de TCR, toutes identiques, à sa surface. Les descendants de cette cellule T, après prolifération clonale, expriment des molécules de TCR identiques à celles de la cellule « mère », mise à part l'apparition de quelques mutations somatiques individuelles (Goldsby, 2000).

3.1.1. TCR $\alpha\beta$ et TCR $\gamma\delta$

Les lymphocytes T circulants peuvent exprimer deux types de TCR : $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$.

Les lymphocytes T $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ diffèrent par le type d'antigène qu'ils reconnaissent, le pattern d'expression des co-récepteurs CD4 et CD8, et leur distribution anatomique en périphérie. Ils diffèrent également dans leurs fonctions, bien que les fonctions des lymphocytes T $\gamma\delta$ ainsi que les ligands qu'ils reconnaissent soient moins bien connus que ceux des lymphocytes T $\alpha\beta$. Les réarrangements géniques mis en évidence dans les thymocytes matures $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ suggèrent que ces deux lignées cellulaires dérivent d'un précurseur commun après certains réarrangements (Allison, 2001).

Dans le cas des lymphocytes T $\gamma\delta$, la reconnaissance de l'antigène par les cellules T ne passe pas par l'intermédiaire d'une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) : le TCR $\gamma\delta$ peut directement reconnaître les antigènes sous la forme de protéines intactes ou de composés non peptidiques. Ce TCR présente une variabilité restreinte. Seules 5% des cellules T périphériques portent un TCR $\gamma\delta$. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont préférentiellement localisés dans les épithéliums muqueux (peau, intestin et bronches principalement) où ils représentent une grande partie des lymphocytes intra épithéliaux (Allison, 2001). Contrairement aux cellules T $\alpha\beta$ qui circulent intensément dans la circulation périphérique, les lymphocytes T $\gamma\delta$ semblent fixes, résidant dans certains sites épithéliaux. Les cellules T $\gamma\delta$, de par leur localisation et les antigènes reconnus, constituent une première barrière de protection en particulier contre les agents pathogènes extérieurs pénétrant dans l'organisme par les diverses muqueuses (Goldsby, 2000).

A l'inverse, la reconnaissance de l'antigène par les cellules T $\alpha\beta$ passe nécessairement par sa présentation dans une molécule du CMH en coopération avec les molécules co-réceptrices CD4 ou CD8. En effet, les lymphocytes T $\alpha\beta$ sont incapables de reconnaître un

antigène libre, contrairement aux immunoglobulines. La variabilité du TCR $\alpha\beta$ est essentiellement concentrée dans la région de reconnaissance du peptide antigénique présenté par la molécule du CMH (Janeway, 2001).

Les loci γ , δ et β commencent leur réarrangement pratiquement simultanément dans le développement des thymocytes. Les facteurs régulant l'engagement des lignées dans l'une ou l'autre voie ne sont pas connus, cependant l'engagement dans la lignée $\gamma\delta$ semble provenir simplement du réarrangement productif à la fois de la chaîne γ et de la chaîne δ dans la même cellule. Ainsi, le réarrangement productif des gènes $\gamma\delta$ conduit à l'expression d'un TCR $\gamma\delta$ fonctionnel menant à la différenciation de la cellule en lymphocyte T $\gamma\delta$ (Janeway, 2001).

3.1.2. Mécanismes de réarrangement des gènes du TCR

Pour permettre la reconnaissance d'une grande variété d'épitopes antigéniques à partir d'une portion relativement restreinte du génome, les lymphocytes B et T utilisent un mécanisme spécifique de cette classe cellulaire, le réarrangement génomique. Le réarrangement au hasard des gènes du TCR permet de créer environ 10^{13} spécificités différentes. Cette énorme diversité potentielle est par la suite diminuée par un processus de sélection thymique qui élimine toutes les cellules T possédant des récepteurs autoréactifs et s'assure que seules les cellules T possédant des TCR capables de reconnaître un antigène en association à une molécule du CMH sont sélectionnées (Goldsby, 2000).

Le mécanisme de réarrangement se déroule au hasard dans les thymocytes selon plusieurs étapes avec d'abord un réarrangement de la chaîne γ , suivi, s'il est fonctionnel, par celui de la chaîne δ . Si ce dernier est également fonctionnel, un TCR $\gamma\delta$ est créé. En revanche, si l'un des deux réarrangements γ ou δ est non fonctionnel ce sont les chaînes β puis α qui subissent un réarrangement pour créer un TCR $\alpha\beta$. Ainsi, tous les lymphocytes T d'un clone ont la même séquence génique réarrangée de la chaîne γ (Kuby, 2000).

Lorsque le réarrangement β n'est pas productif il peut être sauvé par un autre réarrangement sur le même chromosome grâce à la présence pour cette chaîne d'un deuxième cluster de segments D, J et C : D_b , J_b et C_b . Il existe de plus des réarrangements α multiples. Les chances de réussite sont ainsi augmentées de 80 %. Lorsque le réarrangement β est effectif,

la chaîne β est exprimée et est transportée à la surface cellulaire en même temps que les molécules CD3, présentes dans le cytoplasme dès la phase de différenciation médullaire initiale. Les co-récepteurs CD4 et CD8 sont ensuite exprimés, associés à la tyrosine kinase lck. La production d'un réarrangement β effectif entraîne la prolifération clonale des cellules pré-T. Durant la phase de prolifération induite par ce pré-TCR β , les gènes RAG-1 et RAG-2 sont réprimés afin d'empêcher les réarrangements α de se produire avant la fin de la phase proliférative. Quand les gènes RAG-1 et 2 sont de nouveau transcrits, les hétérodimères RAG-1-RAG-2 s'accumulent ce qui permet à chaque cellule contenant un réarrangement β productif d'aboutir à de nombreux thymocytes. Lorsque stoppe la division cellulaire, chaque cellule réarrange les gènes de sa chaîne α permettant ainsi à chaque chaîne β fonctionnelle d'être associée avec beaucoup de chaînes α différentes dans les cellules progénitrices. Le TCR $\alpha\beta$ est exprimé et la sélection par les complexes peptide-CMH dans le thymus peut commencer (Janeway, 2001).

La possibilité de réarrangements multiples de la chaîne α au niveau des deux allèles du locus garantit à chaque cellule T développée d'avoir une chaîne α fonctionnelle. De plus, les cellules T ont la possibilité de réarranger la chaîne α sur le deuxième chromosome si les réarrangements multiples réalisés sur le premier chromosome n'ont pas produit de TCR $\alpha\beta$ fonctionnel. Le réarrangement des gènes de la chaîne α peut se poursuivre même après l'expression du TCR à la surface cellulaire. Ceci permet de produire de nombreuses chaînes α différentes candidates à la sélection via le CMH en partenariat avec la même chaîne β (Janeway, 2001).

Les premiers progéniteurs des cellules T ne portent ni la molécule CD4 ni la molécule CD8, ils sont appelés "doubles négatifs". Les précurseurs T double négatifs montrent divers patterns d'expression des molécules CD44 et CD25. Les cellules T doubles négatives réarrangent la chaîne β et la pré chaîne α afin de former un pré-TCR. Ce pré-TCR fournit un signal indiquant l'arrêt des réarrangements β ce qui provoque à la fois l'arrêt provisoire des réarrangements du TCR et la prolifération des cellules pré-T; et induit l'expression sur les cellules pré-T à la fois de CD4 et de CD8. Ces cellules sont appelées "double positives". Les cellules T double positives initient le réarrangement de la chaîne α . Ces cellules double positives contenant un TCR réarrangé subissent deux sélections dans le thymus : la sélection positive qui implique l'interaction des thymocytes immatures et des cellules épithéliales

corticales et la sélection négative qui élimine les cellules possédant des récepteurs T d'affinité variable pour des antigènes du soi présentés par des molécules de CMH classe I. Lors de la sélection positive, il existe une compétition entre les molécules CD4 et CD8 pour la reconnaissance des molécules de CMH classe I ou des molécules de CMH classe II. Une cellule T double positive qui parviendra à se lier à une molécule de CMH classe I exprimée par les cellules corticales thymique va se différencier en cellule "simple positive" CD8+. A l'inverse, une cellule T double positive qui parviendra à se lier à une molécule de CMH classe II va se différencier en cellule "simple positive" CD4+ (Kuby, 2000 ; Baldwin, 2005).

Le domaine variable des chaînes α et γ , comme celui des chaînes légères d'Ig, est codé à partir de segments V (Variabilité) et J (Jonction). Le domaine variable des chaînes β et δ , comme celui des chaînes lourdes d'immunoglobulines, utilise des segments D (Diversité) en plus de segments V et J spécifiques (Janeway, 2001).

La diversité des TCR est le résultat du réarrangement au hasard des gènes codant pour la synthèse des domaines variables des chaînes du TCR.

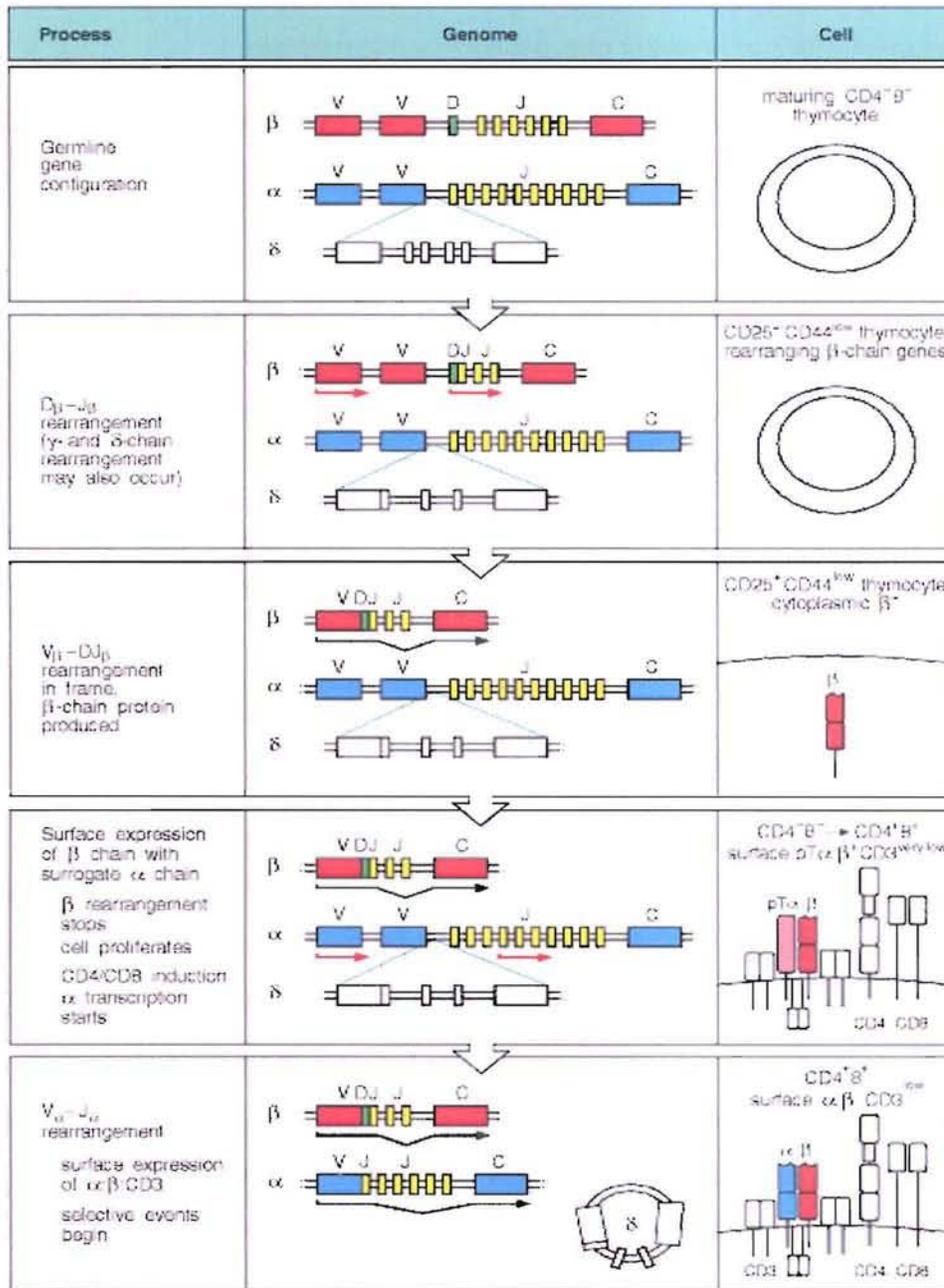
L'organisation des réarrangements des chaînes α et β et des chaînes γ et δ est similaire.

Le complexe de gènes codant la chaîne δ est totalement localisé à l'intérieur du complexe de gènes codant la chaîne α , entre le groupe de segments V et J (Hayday, 2001), sur le chromosome 14 chez l'homme (Verschuren, 1998). Le complexe de gènes codant la chaîne β est localisé sur le chromosome 7, ainsi que le complexe de gènes codant la chaîne γ (Figure 10). Les segments V et J des chaînes γ et δ sont beaucoup moins nombreux que ceux des chaînes α et β et des immunoglobulines. Le répertoire du TCR β contient 73 segments V dont 18 pseudogènes et 9 ORF ; 2 segments D ; 2 segments J et 2 segments C. Le répertoire du TCR γ contient 14 segments V dont 5 pseudogènes et 3 ORF ; 5 segments J et 2 segments C. Le répertoire du TCR α contient 56 segments V dont 10 pseudogènes et 1 ORF ; 61 segments J dont 3 pseudogènes et 7 ORF et 1 segments C. Enfin, le répertoire du TCR δ contient 9 segments V dont 1 pseudogène ; 3 segments D ; 4 segments J et 1 segments C (Lefranc, 2006). Le répertoire des chaînes γ et δ est donc beaucoup plus restreint que celui des chaînes α et β . Ainsi, les lymphocytes T $\gamma\delta$ reconnaissent des antigènes sous forme de protéines entières ou de composés non peptidiques qui ne nécessitent pas une grande spécificité de reconnaissance (Janeway, 2001).

Dans le cas des chaînes α et γ , un segment J, « choisi » au hasard parmi les segments du répertoire J, s'accrole et réarrange avec un segment V « choisi » au hasard parmi les segments du répertoire V. La séquence génique comprise entre ces deux segments est excisée. Le complexe de gènes codant pour la chaîne δ étant inclus dans le complexe de gènes codant pour la chaîne α , le réarrangement de la chaîne α excise la chaîne δ .

Pour les chaînes β et δ , un segment J « choisi » au hasard parmi les segments du répertoire J s'accrole et réarrange avec un segment D « choisi » au hasard parmi les segments du répertoire D. La séquence génique comprise entre ces deux segments est excisée. De la même façon, la séquence réarrangée JD s'accrole et réarrange avec un segment V « choisi » au hasard parmi les segments du répertoire V. Après excision du segments génique compris entre ces deux séquences, il est produit un segment VDJ réarrangé (Goldsby, 2000) (Figure 10).

Figure 10 Schématisation des étapes de réarrangement génique des TCR $\alpha\beta$.



(Revillard, 2001)

L'énorme diversité créée par les combinaisons V, D et J est considérablement augmentée par trois phénomènes supplémentaires générateurs de diversité :

1. la variabilité de jonction : la recombinaison des segments V, D et J nécessite la jonction de séquences signal de recombinaison et des régions codantes. La jonction des séquences signal est toujours précise. En revanche, la jonction des séquences codantes est généralement imprécise générant une diversité supplémentaire.

2. l'addition P consiste en une addition de nucléotides de séquence palindromique à l'extrémité de jonction des séquences codantes ce qui induit une variation de séquence de la jonction codante.

3. l'addition N consiste en l'ajout de nucléotides (jusqu'à 6) de séquence totalement aléatoire au niveau de la jonction des séquences codantes par la desoxynucléotidyl transférase terminale (TdT). Certaines additions N génèrent des réarrangements non-productifs en insérant un codon stop dans la séquence codante.

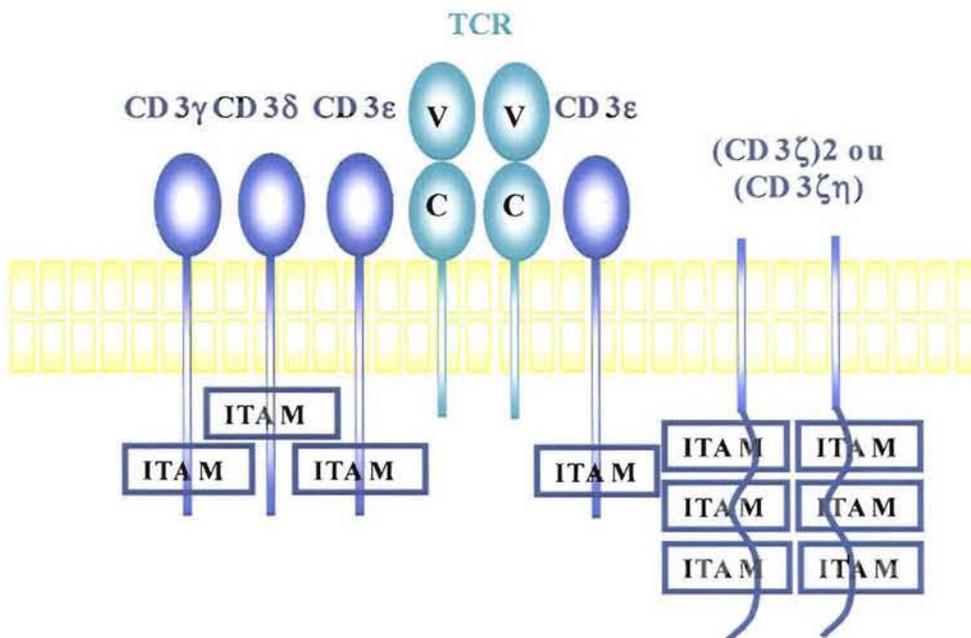
Les effets combinés de ces trois mécanismes peuvent créer jusque 10^{13} séquences différentes, rien que dans les régions jonctionnelles des TCR (Goldsby, 2000).

3.1.3. Le complexe TCR-CD3

Le TCR présent à la surface cellulaire est étroitement associé au complexe multimoléculaire CD3. Ce complexe protéique invariant intervient dans l'expression du TCR à la surface des cellules T et dans la transduction du signal suite à la reconnaissance d'un antigène (Werlen, 2002). Le complexe CD3 est constitué de cinq protéines : CD3 γ , δ , ϵ , ζ et η , dont trois appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (CD3 γ , δ , ϵ). Chaque chaîne de CD3 contient un domaine transmembranaire chargé négativement qui interagit avec le domaine transmembranaire chargé positivement des deux chaînes du TCR. L'expression de chacune des chaînes de CD3 à la surface cellulaire est dépendante de l'expression correcte des autres chaînes du complexe CD3 et de celles du TCR. Inversement l'expression du TCR à la surface cellulaire est dépendante de l'expression membranaire de CD3 (Janeway, 2001 ; Goldsby, 2000).

Chaque chaîne du complexe CD3 est munie d'un long domaine cytoplasmique contenant un ou plusieurs domaines ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) leur permettant d'interagir avec des protéines de transduction de signaux. La liaison du ligand par le TCR entraîne la phosphorylation des domaines ITAM par l'intermédiaire de tyrosine-kinases de la famille Src (Lck, Fyn...) (Werlen, 2002) (Figure 11).

Figure 11 Schématisation de l'association du TCR au complexe multimoléculaire CD3.



3.1.4. Survie et sélection des lymphocytes T

Lorsque le réarrangement du TCR $\alpha\beta$ est effectif les cellules T réarrangées subissent une double sélection dans le thymus avant d'être libérées dans le sang périphérique. La sélection positive implique l'interaction des thymocytes immatures et des cellules épithéliales corticales. Les thymocytes immatures exprimant un TCR fonctionnel capable de reconnaître les molécules de CMH portées par les cellules thymiques reçoivent un signal protecteur les protégeant de l'apoptose. Les thymocytes n'exprimant pas de TCR fonctionnel capable de reconnaître les molécules du CMH ne reçoivent pas ce signal protecteur ce qui conduit à leur mort par apoptose. La population de thymocytes restreints au CMH qui survivent à la sélection

positive subit la sélection négative. En effet, cette population comprend certaines cellules possédant des récepteurs T d'affinité variable pour des antigènes du soi présentés par des molécules de CMH classe I. Les cellules T auto-réactives sont éliminées par apoptose (Goldsby, 2000).

On estime que 90 à 95% des cellules T périphériques expriment les complexes TCR-CD3 parmi lesquels environ deux fois plus de cellules CD4+ que de cellules CD8+. Les cellules T CD4+ et CD8+ quittent le thymus et entrent dans la circulation générale en tant que cellules au repos en phase G0 du cycle cellulaire. Ces cellules T qui n'ont pas encore rencontré l'antigène sont caractérisées par une chromatine condensée, très peu de cytoplasme et une faible activité transcriptionnelle. Les cellules T résident dans les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques et recirculent régulièrement dans le sang périphérique. Le lymphocyte T naïf a donc un tropisme naturel pour ces organes lymphoïdes secondaires. Il n'a en revanche aucun tropisme pour les tissus périphériques non lymphoïdes. La recirculation à grande échelle augmente la probabilité qu'une cellule T naïve rencontre l'antigène approprié. Les cellules T naïves survivent en moyenne 5 à 7 semaines en l'absence de stimulation antigénique. Les cellules T sont capables de circuler dans les tissus et les organes lymphoïdes grâce à l'expression de récepteurs pour les molécules d'adhésion de la famille des CAM (Cell Adhesion Molecule) présentes à la surface des cellules endothéliales. Les cellules T naïves ne présentent pas de préférence pour un type particulier de tissu lymphoïde secondaire et circulent de façon non discriminative vers les tissus lymphoïdes secondaires de l'ensemble de l'organisme en reconnaissant les molécules d'adhésion des cellules endothéliales. L'attachement initial des lymphocytes naïfs aux veinules à haut endothélium (HEV) est généralement médié par la liaison entre la sélectine-L portée par le lymphocyte et des molécules d'adhésion telles que GlyCAM-1 et CD34 (famille des molécules mucine-like) portées par les cellules endothéliales (Goldsby, 2000).

3.2. Reconnaissance de l'antigène

La stimulation antigénique des lymphocytes T induit secondairement leur prolifération, ainsi que l'expression de marqueurs d'activation (CD28) et de molécules d'adhésion (CD11a/CD18=LFA1) (Noble, 2000). Elle conduit à la synthèse de cytokines qui

activent d'autres lymphocytes T et B, des cellules monocytaires et endothéliales, ainsi que des granulocytes (Kuby, 2000).

Les lymphocytes T $\alpha\beta$ reconnaissent l'antigène sur les molécules présentatrices d'antigènes que sont les molécules de CMH.

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), appelé HLA chez l'homme, comporte deux classes de glycoprotéines membranaires :

- les molécules de classe I du CMH qui présentent des antigènes endogènes aux cellules T CD8+.

- les molécules de classe II du CMH qui présentent des antigènes exogènes aux cellules T CD4+.

Les molécules de classe III du CMH forment un ensemble hétérogène comportant des molécules sans relevance immunologique (hormones stéroïdiennes par exemple) et des molécules d'intérêt immunologique direct (C4A, C4B, TNF, les deux sous-unités TAP1, TAP2 des pompes à peptides associés à la présentation antigénique par les molécules d'histocompatibilité de classe I, les gènes codant certaines sous-unités LMP-2, LMP-7 du protéasome) (Lemonnier, 2001).

Les gènes codant pour les molécules de classe I et de classe II du CMH sont hautement polymorphiques. Etant donné que chaque individu hérite d'un allèle de chacun de ses parents pour chaque locus, de multiples molécules de classe I et de classe II du CMH sont exprimées chez chaque individu (Goldsby, 2000).

Les molécules du CMH, comme les TCR, fonctionnent comme des molécules de reconnaissance de l'antigène mais ne possèdent pas la spécificité de reconnaissance de l'antigène qui est celle des TCR. En effet, chaque molécule du CMH peut se lier à tout un spectre de peptides antigéniques dérivés de la dégradation intracellulaire d'antigènes (Goldsby, 2000).

Les régions distales à la membrane des différents allèles des molécules du CMH montrent une grande variation dans leur séquence d'acides aminés. Ces régions distales forment une cavité, appelée sillon présentatoire de l'antigène, à l'intérieur de laquelle se situe le peptide antigénique qui est présenté aux lymphocytes T. Chaque allèle possède une structure et une spécificité différente pour le sillon présentatoire. La capacité de présentation de

l'antigène aux cellules T dépend, pour chaque individu, du groupe particulier d'allèles du CMH dont il a hérité (Goldsby, 2000).

Lors de la reconnaissance antigénique, les cellules T en mouvement doivent s'arrêter afin de former des interactions cellule-cellule stables avec la cellule présentatrice d'antigène. Ce contact stable entre une cellule T et une cellule présentatrice d'antigène est appelé synapse immunologique (Friedman, 2005). Le contact entre les cellules doit durer plusieurs heures afin de produire une activation complète des cellules T naïves (Dustin, 2003).

La reconnaissance effective d'un antigène par les cellules T nécessite à la fois la reconnaissance du complexe CMH-peptide par le complexe TCR-CD3 mais également un signal de co-activation non spécifique généré par la reconnaissance des molécules de co-activation CD28 présentes à la surface des lymphocytes et un des membres de la famille B7 (B7-1 et B7-2) à la surface de la cellule présentatrice (Goldsby, 2000). La molécule CD28 est impliquée dans l'initiation et la stabilisation de la synapse immunologique, ainsi que dans la prolifération des cellules T suite à la reconnaissance antigénique. L'intervention de CD28 est très rapide (Andres, 2004). La formation de la synapse immunologique nécessite également l'implication précoce des tyrosines kinases des familles Src et Syk (Dustin, 2003). La formation de la synapse immunologique détermine la nature et le degré de la réponse immune produite (Creusot, 2001).

Le lymphocyte T activé (ou effecteur), quitte le ganglion par les mêmes voies qu'un lymphocyte T naïf. Mais il a acquis des propriétés migratoires différentes, qui le dirigent électivement vers les tissus périphériques non lymphoïdes, surtout s'ils sont inflammatoires. Le recrutement cellulaire à partir du sang débute par le passage des leucocytes à travers une barrière de cellules endothéliales. Cette migration trans-endothéliale se déroule en quatre étapes successives :

- le roulement : grâce à des molécules de la famille des sélectines et à leurs ligands, les leucocytes et les cellules endothéliales interagissent faiblement et de manière réversible. Ainsi, le leucocyte roule sur l'endothélium, poussé par le flux sanguin.

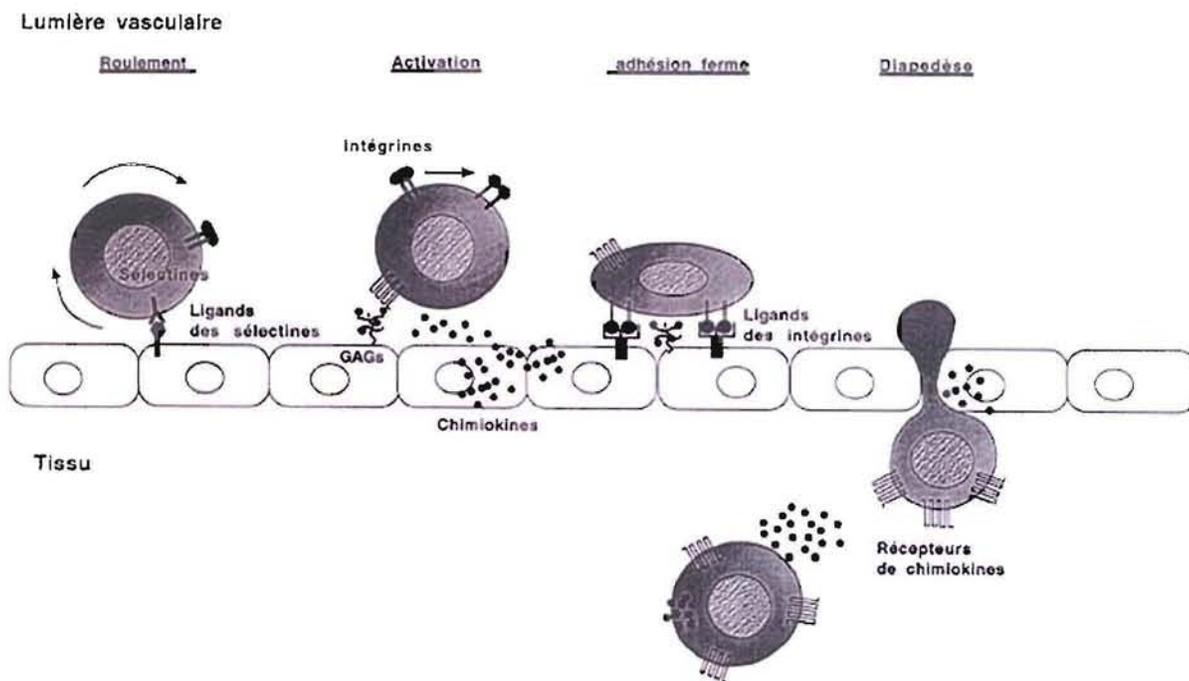
- l'activation dépendante des chimiokines: le leucocyte qui roule entre en contact avec les chimiokines produites par les cellules endothéliales activées.

- l'arrêt ferme: il dépend de l'interaction entre les intégrines leucocytaires activées et leur ligand endothélial.

- la diapédèse: le leucocyte passe à travers l'endothélium.

Les cellules entrent et sortent du réseau vasculaire par le même processus, c'est la diapédèse. Une fois parvenu dans l'espace sous-endothélial, le leucocyte poursuit sa migration à travers le tissu. Cette migration est guidée par l'existence d'un gradient de chimiokines interstitiel. A partir d'un site de production, qui correspond en général à une cellule immunitaire activée, les chimiokines diffusent dans le tissu interstitiel. Mais cette diffusion est vite limitée par la fixation des chimiokines sur la matrice extracellulaire. La concentration de chimiokines fixées à cette matrice est d'autant plus élevée que l'on se trouve à proximité du site de production. Le leucocyte est capable de reconnaître ce gradient, et de migrer par étapes successives jusqu'au site de production de la chimiokine (Faveeuw, 2000). Ceci définit le chimiotactisme (Figure 12).

Figure 12 Schématisation du processus de diapédèse.



<http://www.kb.u-psud.fr/kb/niveau2/enseignements/niveau3/etudmed/cours-immunologie/figures/chap09-fig04.jpg>

3.2.1. Apprêtement et présentation de l'antigène

Les antigènes, qui sont généralement volumineux et complexes, ne sont pas reconnus dans leur totalité par les lymphocytes. Seules certaines régions immunologiquement actives sont reconnues par les TCR, ce sont les déterminants antigéniques ou épitopes. L'antigène doit pour cela être dégradé en petits segments peptidiques qui vont se complexer avec des molécules de classe I ou de classe II du CMH (Goldsby, 2000). La densité des molécules de CMH à la surface des cellules présentatrices d'antigène est directement corrélée à la stabilité de la liaison TCR-ligand et au degré d'activation de ces cellules T (Sumen, 2004). La reconnaissance de l'antigène sur les molécules de CMH est antigène dépendant, cependant il n'existe pas de certitude quant à l'implication uniquement de complexes molécule de CMH-peptides spécifiques ou si des complexes molécule de CMH-peptides non spécifiques sont également impliqués. L'implication de complexes molécule de CMH-peptides spécifiques uniquement peut produire un effet de compétition qui augmenterait l'affinité des réponses spécifiques (Wetzel, 2005).

3.2.1.1. Apprêtement et présentation de l'antigène par les molécules de CMH classe I

Il existe six loci de molécules de classe I du CMH chez l'homme : A, B, C, E, F et G.

Les complexes de CMH classe I sont composés de trois éléments: une chaîne lourde α , la β 2-microglobuline et un court peptide de 8 à 10 acides aminés. La β 2-microglobuline ainsi que le peptide sont nécessaires à la stabilisation de la molécule et à sa migration vers la surface cellulaire. Les domaines α 1 et α 2 forment un plateau constitué par le rapprochement de 8 feuilletts β anti-parallèles surmontés de deux hélices α qui délimitent le sillon présentoir de 25 Å de long et 10 Å de large au niveau duquel se fixent les peptides qui seront présentés au système immunitaire (Lemonnier, 2001).

La dégradation des antigènes cytosoliques en peptides est réalisée par protéolyse. La protéolyse est assurée par un complexe multiprotéique, appelé protéasome, dont certaines sous-unités sont codées par des gènes inductibles par l'IFN γ , LMP2 et LMP7. Ce processus est dépendant de l'ATP et se déroule généralement après ubiquitination des protéines. En effet,

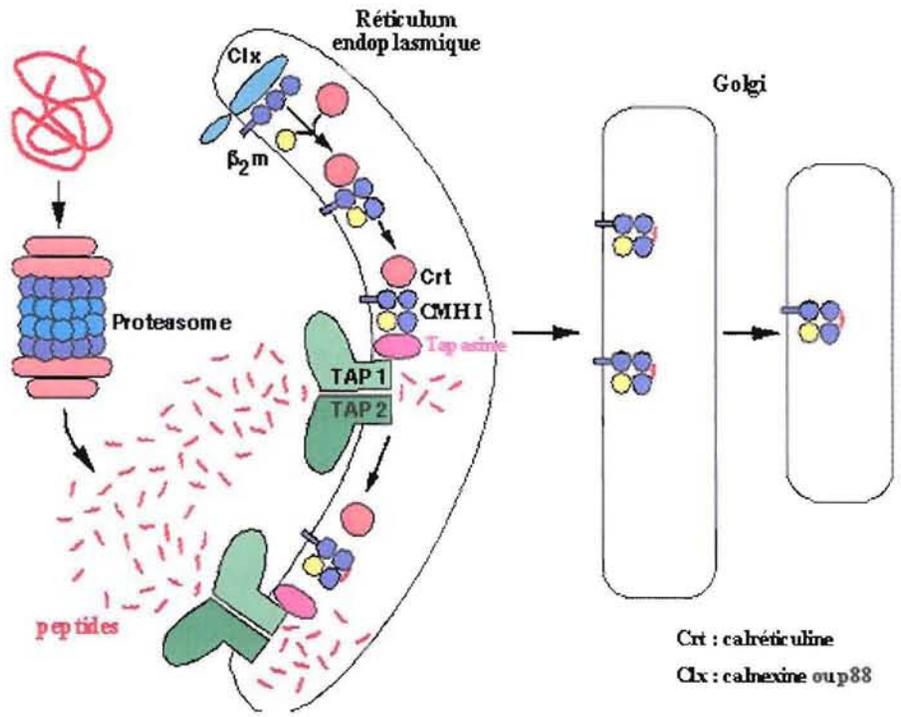
l'interféron- γ provoque le remplacement des sous-unités catalytiques X, Y et Z du protéasome par des sous-unités qui leur sont très proches, appelées respectivement LMP7, LMP2 et MECL1. La production d'IFN γ induit également l'expression d'une sous-unité constitutive de l'une des unités régulatrices du protéasome, PA700 (19S). Le complexe 19S joue un rôle prépondérant dans la dégradation des protéines ubiquitinylées. En se liant aux deux extrémités du protéasome 20S pour former le protéasome 26S, il active celui-ci et il apporte des sous-unités qui permettent la reconnaissance des chaînes d'ubiquitine, la dénaturation du substrat et le recyclage de l'ubiquitine. Ces deux modifications donnent naissance à un immunoprotéasome qui reconnaît sélectivement les molécules du soi et du soi modifié, et qui a des spécificités catalytiques différentes de celles du protéasome ordinaire. L'immunoprotéasome produit des peptides antigéniques d'environ 15 acides aminés qui se lient particulièrement bien avec le complexe CMH classe I et seront donc présentés en priorité à la surface des cellules infectées ou tumorales (Coux, 2000).

Les peptides ainsi produits dans le cytosol sont ensuite acheminés dans le réticulum endoplasmique par les pompes à peptides associées au CMH que sont les TAP (Transporters of antigen-processing). Les pompes TAP sélectionnent des peptides de 8 à 10 acides aminés. Elles transportent préférentiellement des peptides se terminant par un résidu hydrophobe (leucine, isoleucine) et par un résidu basique, ces résidus sont appelés des résidus d'ancrage (Lemonnier, 2001 ; Goldsby, 2000).

L'association des peptides aux molécules d'histocompatibilité de classe I est réalisée dans le réticulum endoplasmique. En effet, dans le réticulum, la chaîne lourde des molécules de classe I interagit avec d'autres molécules : p88 ou calnexine, calréticuline, tapasine. La calréticuline s'associe aux chaînes lourdes isolées. Après fixation de la b2-microglobuline, le complexe chaîne lourde b2-microglobuline, dépourvu de peptide, est pris en charge par la calréticuline, puis, après interaction avec la tapasine, ce complexe interagit avec la face luminale des pompes TAP, jusqu'à fixation d'un peptide. Cette interaction cesse après la fixation peptidique (Figure 13). L'association peptide-CMH est très stable dans les conditions physiologiques (Lemonnier, 2001 ; Goldsby, 2000).

Figure 13 Modèle d'association de peptides aux molécules du CMH I dans le réticulum endoplasmique.

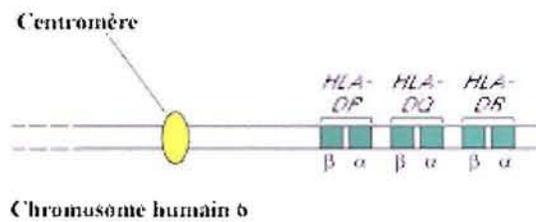
(Lemonnier, 2001)



3.2.1.2. Apprêtement et présentation de l'antigène par les molécules de CMH classe II

Il existe dix loci de classe II chez l'homme, dont les trois principaux sont HLA-DR, HLA-DP et HLA-DQ. Les molécules de CMH classe II sont des glycoprotéines hétérodimériques constituées d'une chaîne α et d'une chaîne β (Figure 14) (Goldsby, 2000).

Figure 14 Localisation chromosomique des loci des molécules de classe II du CMH



Lemonnier, 2001

Dans le cas d'un antigène exogène, celui-ci est produit hors de la cellule hôte et pénètre dans la cellule présentatrice d'antigène par endocytose ou phagocytose. Les cellules présentatrices d'antigène sont les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B (Goldsby, 2000). L'antigène ingéré est inclus dans un endosome puis dégradé en petits fragments dans un phagolysosome. Les protéines exogènes à dégrader intègrent successivement les différents compartiments de la voie endocytique où elles sont dégradées par diverses enzymes protéolytiques. L'efficacité et la qualité de l'apprêtement de l'antigène dépendent de la complexité de la protéine à dégrader, de ses sites de clivage pour les protéases et de la nécessité éventuelle de dénaturer la protéine avant sa protéolyse. L'activité optimale des protéases requiert un pH acide entre 3 et 6, par conséquent leur efficacité sera modulée en fonction du compartiment endocytique où elles agissent. Ainsi, des antigènes encapsulés dans des liposomes se dissociant au pH des lysosomes sont apprêtés plus efficacement que des antigènes transportés dans des liposomes libérant l'antigène au niveau des endosomes plus précoces. De nombreuses familles de protéases sont présentes dans les compartiments endocytiques, dont les cathepsines. Ces protéases sont colocalisées avec les molécules de classe II dans ces vésicules.

Chaque protéase est caractérisée par des sites préférentiels de clivage et l'action simultanée de plusieurs protéases a été mise en évidence pour certains antigènes (Lemonnier, 2001).

Les molécules de classe II sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique, où trois dimères $\alpha\beta$ s'associent avec un trimère de chaîne invariante CD74. Les nonamères ainsi formés sont exportés vers les endosomes via l'appareil de Golgi. La chaîne invariante est constituée d'une protéine chaperonne qui a plusieurs fonctions : elle contribue à l'assemblage des chaînes α et β des molécules de classe II nouvellement synthétisées et assure leur stabilisation dans le réticulum avec une conformation permettant leur transport par la voie endocytaire et elle empêche la fixation de peptides endogènes, présents dans le réticulum ou l'appareil de Golgi, aux molécules de classe II. Des signaux localisés dans la région cytoplasmique de la chaîne invariante sont responsables du transport des molécules de classe II du réticulum endoplasmique à la voie endocytaire (Lemonnier, 2001).

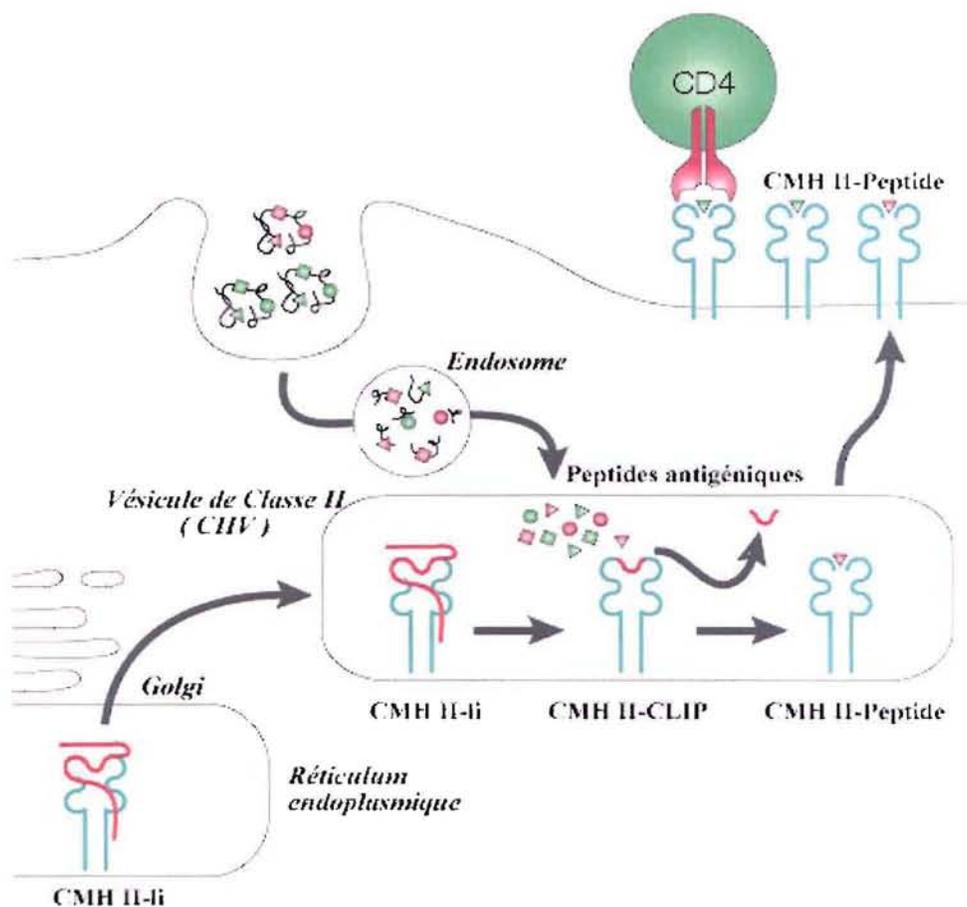
Au niveau des endosomes, la chaîne invariante est progressivement dégradée par des protéases auxquelles les molécules de classe II sont résistantes. Quelques fragments peptidiques restent temporairement associés aux dimères $\alpha\beta$ de molécules de classe II, en particulier différents peptides appelés peptides CLIP (Class II Like Invariant chain Peptides) sont associés au dimère $\alpha\beta$ et permettent d'empêcher la fixation de peptides endogènes. Ensuite, les protéines DM catalysent la dissociation de peptides déjà présents sur les molécules de classe II, dont CLIP, permettant l'échange de CLIP contre des peptides antigéniques (Lemonnier, 2001).

Dans l'endosome, les fragments antigéniques formés se lient au sillon présentoir des molécules de CMH classe II. Le sillon présentoir des molécules de classe II est constitué par les chaînes $\alpha 1$ et $\beta 1$ qui forme un plateau constitué de 8 brins β antiparallèles et d'hélices α antiparallèles. Le sillon présentoir des molécules de classe II accepte des peptides de 13 à 18 acides aminés. Les complexes CMH-peptides sont ensuite exportés vers la membrane cellulaire (Goldsby, 2000) (Figure 15).

Lorsque les différentes combinaisons peptidiques présentées par les molécules de classe I et de classe II du CMH sont analysées, il est observé que la diversité des peptides présentés est inférieure à celle prédite par les calculs théoriques. En effet, certaines combinaisons peptidiques sont présentées de façon plus fréquente, ce biais de présentation est appelé *l'immunodominance*. Elle résulte du fait que la conformation du sillon présentoir des molécules de classe I accepte

préférentiellement des peptides de 9 acides aminés ayant un résidu carboxy-terminal hydrophobe et un résidu amino-terminal basique. Seuls ces peptides formeront des liaisons totalement stabilisées avec le sillon présentoir des molécules de classe I. Le sillon présentoir des molécules de classe II est quand à lui « ouvert », permettant à des peptides de 13 à 18 acides aminés de dépasser de chaque côté. Les capacités de liaison des peptides aux molécules de classe II du CMH sont déterminées par les 13 acides aminés centraux, ayant souvent des motifs conservés, du peptide et par la distance constante entre le peptide et le fond de la cavité de liaison (Goldsby, 2000).

Figure 15 **Dégradation, transport et fixation aux molécules de classe II, de l'antigène**



Lemonnier, 2001

3.2.2. Reconnaissance de l'antigène sur les molécules de CMH

Les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ reconnaissent l'antigène sur les molécules de classe I et classe II respectivement avec une cinétique rapide mais une affinité faible (König, 2002).

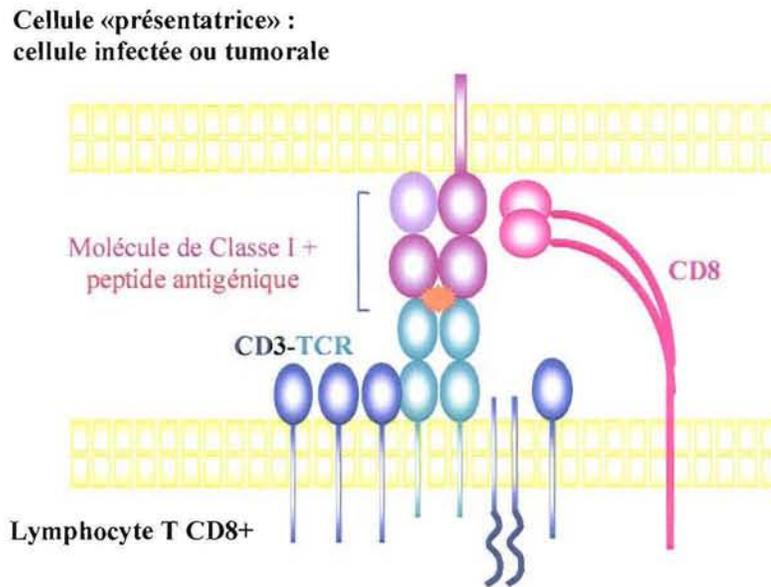
3.2.2.1. Reconnaissance de l'antigène sur les molécules de CMH classe I par les lymphocytes T CD8⁺

Les lymphocytes T cytotoxiques reconnaissent des peptides issus d'antigènes endogènes présentés par les molécules de classe I du CMH (Zamoyska, 1998). La molécule CD8 est un hétérodimère $\alpha\beta$ dans la majorité des cas ou un homodimère $\alpha\alpha$, dont les chaînes sont reliées par un pont disulfure. Chaque chaîne contient un domaine de la superfamille des immunoglobulines (Goldsby, 2000).

La molécule CD8 et les molécules du TCR interagissent simultanément avec le complexe CMH de classe I, respectivement au niveau d'une région constante du domaine $\alpha 3$ et au niveau du sillon présentoir constitué par les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$. La molécule CD8 entre également en contact avec la tyrosine kinase lck par sa queue cytoplasmique (Zamoyska, 1998) (Figure 16). L'affinité de CD8 pour les molécules de CMH de classe I varie en fonction de la structure de la molécule de CMH (König, 2002).

Dans la majorité des cas la prolifération des cellules T CD8⁺ suite à la reconnaissance de l'antigène nécessite l'apport conséquent d'IL-2 produit par les cellules T CD4⁺ en prolifération (Goldsby, 2000). Cette production d'IL-2 peut se faire après contact d'une cellule présentatrice d'antigène avec à la fois une cellule T CD4⁺ et une cellule T CD8⁺ mais ce mécanisme semble peu probable. Un mécanisme plus plausible d'aide des cellules CD4⁺ à l'activation des cellules CD8⁺ serait l'activation en premier lieu d'une cellule T CD4⁺ puis l'activation d'une cellule T CD8⁺ par la même cellule présentatrice d'antigène (Xiang, 2005).

Figure 16 **Reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T CD8+ sur les molécules de CMH classe I.**



Les lymphocytes T exprimant le co-récepteur CD8 à leur surface ont une activité cytotoxique vis à vis de cellules néoplasiques ou des cellules de l'hôte infectées par des virus (Zitvogel, 1999).

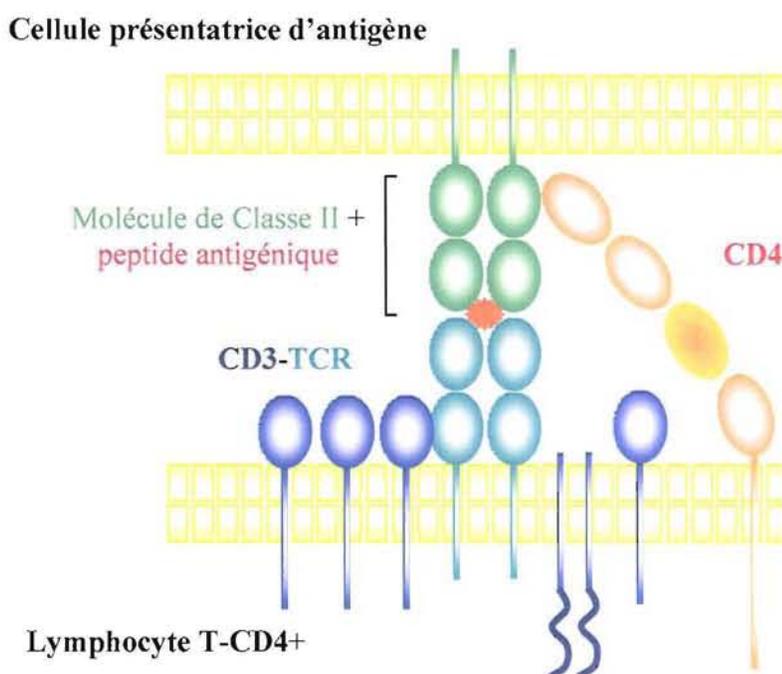
3.2.2.2. **Reconnaissance de l'antigène sur les molécules de CMH classe II par les lymphocytes T CD4+**

Les lymphocytes T helper reconnaissent des peptides issus d'antigènes exogènes présentés par des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (Zamoyska, 1998).

La protéine CD4 est une glycoprotéine monomérique contenant quatre domaines de la superfamille des immunoglobulines (Janeway, 2001). Son domaine cytoplasmique interagit également avec la tyrosine kinase lck participant ainsi à la transduction du signal (Foti, 2001).

Le TCR reconnaît le peptide antigénique dans le sillon présentoir localisé entre les domaines terminaux ($\alpha 1$ et $\beta 1$) des deux chaînes de la molécule de CMH de classe II alors que CD4 reconnaît spécifiquement une région constante du domaine $\beta 2$ (Kuby, 2000) (Figure 17). De plus, les cellules T CD4+ ayant été activées par la reconnaissance de l'antigène sur les molécules de CMH classe II portées par une cellule présentatrice d'antigène seraient capables d'activer par la suite d'autres cellules T CD4+ par des contacts cellule T-cellule T (Xiang, 2005).

Figure 17 : Reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T CD4+ sur les molécules de CMH classe II.



3.2.3. Génération des cellules T effectrices et des cellules T mémoires

Lorsqu'une cellule T naïve reconnaît un complexe CMH-peptide, à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène ou d'une cellule cible en présence des molécules de co-

stimulation B7 et CD28, diverses cytokines sont produites, dont l'interleukine 2 (IL-2) conduisant à l'activation et à la prolifération du lymphocyte T. La prolifération débute environ 48h après l'activation du lymphocyte T et les cellules T engagées dans cette voie se divisent 2 à 3 fois par jour pendant 4 à 5 jours. Le processus de prolifération des cellules T est clonal, c'est-à-dire que les cellules générées sont identiques à la cellule mère. Toutes les cellules T d'un même clone portent donc exactement le même TCR. Les cycles de prolifération conduisent à la formation d'un large clone de cellules T progénitrices qui se différencient en deux populations : les cellules T effectrices et les cellules T mémoires (Goldsby, 2000).

Les cellules T effectrices sont celles qui vont exercer les diverses fonctions spécialisées des lymphocytes T (cytotoxicité, production de cytokines, aide aux cellules B...). Les cellules effectrices sont dérivées de cellules naïves rencontrant leur antigène ou de cellules mémoires après réactivation par l'antigène. La durée de vie des cellules effectrices est courte, allant de quelques jours à quelques semaines. Les populations de cellules effectrices et naïves expriment des molécules membranaires différentes ce qui contribue aux différents profils de recirculation de ces cellules (Goldsby, 2000). Les lymphocytes T auxiliaires ou helper exprimant le marqueur de surface CD4 forment deux sous populations de cellules T caractérisées par des profils de production cytokinique différents. Les cellules Th1 sécrètent de l'IL-2, de l'IFN γ et du TGF β induisant les réponses immunes à médiation cellulaires telles que l'hypersensibilité retardée et l'activation des cellules T cytotoxiques. Les cellules Th2 sécrètent quant à elles de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6 et de l'IL-10 permettant à ces cellules T d'interagir avec les lymphocytes B entraînant leur prolifération et leur différenciation en plasmocytes producteurs d'anticorps (Kuby, 2000).

Les cellules T mémoires sont caractérisées par une durée de vie longue, elles permettent une réponse immune beaucoup plus rapide et forte en cas de deuxième rencontre du même antigène. Cette réponse initiée par les lymphocytes T mémoires qui sont activés par la rencontre de l'antigène et prolifèrent est appelée réponse immune secondaire. Les cellules mémoires fournissent une protection immune immédiate dans tous les tissus, y compris les tissus non-lymphoïdes. Les cellules T mémoires persistent longtemps après la diminution et la disparition des cellules T effectrices. Comme les cellules T naïves, les cellules T mémoires sont généralement des cellules au repos en phase G0 du cycle cellulaire mais le degré d'activation nécessaire pour l'engagement de la réponse immune est très inférieur pour les cellules mémoires. Par exemple, les cellules T CD4+ naïves ne sont activées que par les

cellules dendritiques alors que les cellules T CD4⁺ mémoires peuvent également être activées par des macrophages ou des cellules B. Ceci pourrait être dû aux taux élevés de molécules d'adhésion exprimés à la surface des cellules mémoires. Les cellules mémoires présentent des différences dans leurs profils de recirculation qui les distinguent des cellules T naïves et des cellules T effectrices (Goldsby, 2000 ; Cheroutre, 2005).

Les cellules T naïves expriment à leur surface cellulaire l'isotype CD45RA alors que les cellules T mémoire expriment l'isotype CD45RO. L'expression de la molécule CD27 permet de plus de distinguer les population de cellules T effectrices des populations de cellules T quiescentes. On distingue ainsi les cellules naïves quiescentes (CD45RA⁺, CD27⁻), des cellules T naïves effectrices (CD45RA⁺, CD27⁺), des cellules mémoires quiescentes (CD45RO⁺, CD27⁻) et des cellules mémoires effectrices (CD45RO⁺, CD27⁺) (Béné, 1998 ; Morimoto, 1993).

3.3. Production de cytokines

Les lymphocytes TCD4⁺ sont activés lorsqu'ils reconnaissent l'antigène sur les molécules de classe II du CMH. Lors de cette reconnaissance, la cellule présentatrice produit, entre autres cytokines, de l'IL-1 qui apporte un signal de co-activation des cellules T et promeut leur maturation et leur expansion clonale (Kuby, 2000). Ces cellules T activées sécrètent différentes sortes de cytokines qui jouent un rôle central dans l'activation des cellules B, des cellules T ainsi que d'autres cellules participant à la réaction immune. Les cytokines produites agissent de façon autocrine et paracrine. Des modifications dans le profil des cytokines produites par les cellules Th (T helper) peuvent changer le type de réponse immunitaire qui se développe parmi les autres leucocytes. La réponse Th1 produit un profil cytokinique pro-inflammatoire et active principalement de nombreuses fonctions à médiation cellulaire comme l'hypersensibilité retardée et l'activation des cellules T et des macrophages, ainsi que de la production d'IgG promotrices d'opsonisation. Cette sous-population est également responsable du déclenchement et de l'entretien de la réponse inflammatoire pouvant être excessive et mener à des lésions tissulaires (Goldsby, 2000). La réponse Th2 stimule l'activation et la différenciation des éosinophiles, elle fournit une aide aux cellules B et est à l'origine de la production d'IgM, d'IgE et d'isotypes d'IgG qui n'activent pas la voie du complément. La sous-population Th2 intervient dans les réactions allergiques (Goldsby, 2000).

Dans le cas d'un antigène endogène, la cellule présentatrice d'antigène libère de l'IL-12 qui permet la production des cytokines de type Th1 par les lymphocytes T helper (Th1). Les Th1 produisent principalement de l'IL-2, de l'interféron- γ (IFN γ), de l'IL-12 et du tumor necrosis factor- β (TNF β). Dans le cas d'un antigène exogène, la cellule présentatrice oriente les lymphocytes T helper vers une production cytokinique de type 2 (Th2). Les Th2 produisent des cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6 et l'IL-10 (Merlot, 2004 ; Goldsby, 2000).

L'IFN γ favorise l'activation des lymphocytes T CD8+ capables de lyser les cellules du soi infectées, favorise l'activation des macrophages et augmente l'expression des molécules de classe I et de classe II du CMH sur de nombreux types cellulaires (Goldsby, 2000). L'IFN γ active les neutrophiles et les cellules NK qui sont capables de cytotoxicité envers les cellules modifiées telles les cellules infectées par des virus ou des bactéries et les cellules tumorales (O'Connor, 2005). La production d'IFN γ induit également la commutation de classe de certaines IgG. Le TNF β a des effets cytotoxiques sur les cellules tumorales et promeut la phagocytose. Le TNF β et l'IFN γ sont les principaux responsables de l'inflammation et en particulier de l'hypersensibilité retardée. La combinaison de l'IL-2 et de l'IFN γ déclenche la différenciation terminale des cellules T cytotoxiques. L'IFN γ inhibe l'expansion de la sous-population cellulaire Th2. Le profil de production cytokinique des cellules Th1 rend cette sous-population particulièrement bien adaptée à la réponse aux infections virales et aux pathogènes intracellulaires (Goldsby, 2000 ; Kuby, 2000) (Figure 18).

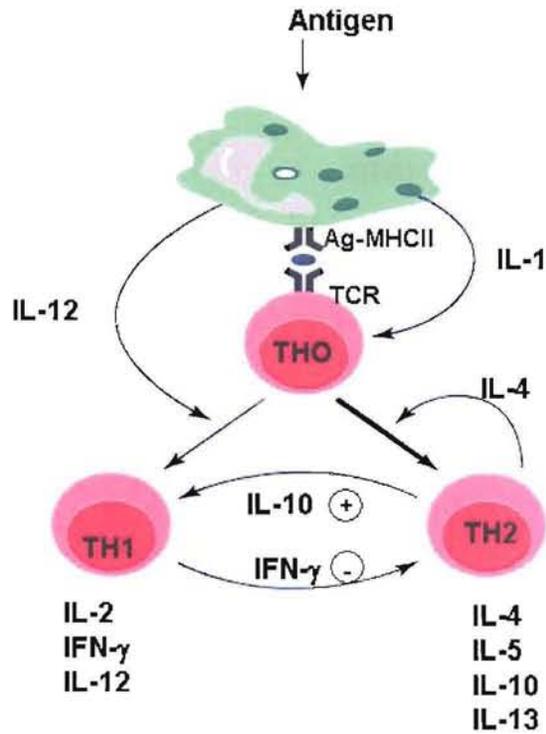
La production d'IL-4 a un effet autocrine sur les lymphocytes Th2 en favorisant leur prolifération. La sécrétion de l'IL-4 et de l'IL-5 par les cellules Th2 induit la production d'IgE. L'IL-4 favorise le switch des immunoglobulines en IgG et des IgM en IgE. Les IgE activent la réponse des mastocytes, basophiles et éosinophiles contre les infections par helminthes mais sont également responsables des phénomènes allergiques. En effet, les IgE se fixent avec une forte affinité aux récepteurs du Fc des mastocytes et des basophiles. Une exposition ultérieure au même allergène conduit à des liaisons croisées entre les IgE fixées à la surface des mastocytes et des basophiles, ce qui provoque la dégranulation de ces cellules. Les principaux effets sont la vasodilatation et la contraction des muscles lisses. L'interleukine 4 a également la particularité d'augmenter l'expression des molécules de classe II du CMH sur les cellules B et les macrophages. L'interleukine 5 stimule également le switch des immunoglobulines en IgA. La sécrétion d'IL-6 promeut la différenciation terminale des cellules B en plasmocytes

producteurs d'anticorps, stimule la sécrétion d'anticorps et induit la synthèse de protéines de la phase aiguë. L'IL-4 et l'IL-10 s'opposent à l'expansion des populations de cellules Th1 (Goldsby, 2000 ; Kuby, 2000) (Figure 18).

Le TGF β sécrété par les cellules T a un effet anti-inflammatoire global en inhibant la prolifération de diverses cellules hématopoïétiques et épithéliales. Il favorise aussi le switch des immunoglobulines en IgA et sa production est associée au profil Th3. L'IL-15 produite par les lymphocytes T a une action autocrine en favorisant leur prolifération. L'IL-13 produite par les cellules Th1 et Th2 a quant à elle un effet inhibiteur sur l'activation et la production cytokinique des macrophages et elle constitue un régulateur important de la réponse inflammatoire (Kuby, 2000).

Les lymphocytes T CD8+, lorsqu'ils sont activés, produisent également des cytokines cependant leur diversité est plus limitée que pour celles générées par les lymphocytes T CD4+ (Goldsby, 2000). L'IL-12 produite par les cellules Th1 agit de concert avec l'IL-2 pour promouvoir la différenciation terminale des lymphocytes T CD8+ en cellules T cytotoxiques. Les cellules T cytotoxiques produisent cependant de l'IL-16 qui a divers effets sur les cellules T CD4+. En effet, l'IL-16 induit l'expression de molécules de classe II du CMH et la production de cytokines par les cellules T CD4+ mais inhibe aussi la prolifération des cellules T CD4+ induite par la rencontre de l'antigène (Kuby, 2000).

Figure 18 Schématisation de l'orientation de la réponse immune primaire vers une réponse de type Th1 ou Th2.



<http://www.egms.de/figures/journals/cto/2004-3/cto000004.f2.png>

4. Immunologie du cancer bronchique non-à petites cellules (CBNPC)

4.1. La stroma réaction

Au delà d'une certaine taille (1-2mm³), les foyers tumoraux nécessitent une adaptation de leur micro-environnement cellulaire et extra-cellulaire afin d'assurer leur oxygénation et leur soutien (Ohtani, 1999 ; Fong, 2002). De plus, la présence d'un foyer tumoral suscite souvent une réaction de l'hôte. Ces modifications des structures préexistantes induites par les cellules tumorales aboutissent à la formation d'un tissu conjonctif et inflammatoire, associé aux cellules tumorales, appelé la stroma réaction.

Le stroma est un tissu conjonctif néo-formé, non tumoral, assurant le soutien et la nutrition des cellules tumorales. Il représente une modification du tissu conjonctif de soutien normal de l'organe, qui s'adapte à la croissance de la tumeur et à la destruction du tissu normal. Il est en remaniement constant puisqu'il doit suivre la croissance de la tumeur. Si celle-ci est rapide, la nutrition est insuffisante et le tissu cancéreux se nécrose.

La stroma réaction est constituée de cellules de soutien, de néo-vaisseaux et de cellules inflammatoires (Ohtani, 1999).

4.1.1. Angiogénèse

La néo-angiogénèse est nécessaire à la croissance tumorale afin d'assurer l'oxygénation et la nutrition des cellules tumorales. En effet, les cellules tumorales ont besoin à la fois d'un apport de nutriments et d'une évacuation des déchets. Tant que l'épaisseur de la tumeur est inférieure à quelques millimètres, la simple diffusion suffit généralement pour permettre ces échanges. Au-delà, pour survivre, les cellules cancéreuses doivent acquérir un pouvoir d'angiogénèse, afin d'élaborer tout un système sanguin nourricier (Ohtani, 1999 ; Baclesse, 2006).

Les vaisseaux tumoraux sont composés de vaisseaux nourriciers et de vaisseaux inflammatoires exprimant des molécules d'adhésion cellulaire facilitant la migration de cellules immunocompétentes dans le tissu. Ce sont des veinules à haut endothélium (HEV). Les mécanismes, complexes, de la prolifération des cellules endothéliales sont différents des mécanismes de prolifération des cellules tumorales (Ohtani, 1999).

Les cellules tumorales stimulent la prolifération des cellules endothéliales des capillaires voisins, qui forment des boucles vasculaires en direction de la tumeur, afin de l'irriguer et de permettre son développement. La production des facteurs angiogènes constitue soit une réaction normale à l'hypoxie (diminution du taux de l'oxygène du sang circulant) des cellules cancéreuses ou des cellules normales avoisinantes, soit le fait de mutations génétiques particulières (Ohtani, 1999 ; Baclesse, 2006).

La néovascularisation, grâce aux apports en oxygène et en nutriments, permet à la tumeur de se multiplier puis, dans un second temps elle peut permettre aux cellules tumorales d'envahir la paroi des capillaires et de diffuser dans la circulation générale dans un processus métastatique (Ohtani, 1999 ; Cours Baclesse angiogenèse, 2006).

4.1.1.1. Facteurs de croissance

4.1.1.1.1. Facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF)

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ou VEGF est sécrété par la tumeur lorsqu'elle est en état d'hypoxie (Fong, 2002). Il a une activité mitogène spécifique pour les cellules endothéliales in vitro et un fort pouvoir angiogénique in vivo. L'expression du VEGF et de son récepteur est corrélée avec le développement embryologique, le développement cyclique de l'endomètre, du placenta, des hémangiomes ou des tumeurs. Les cellules endothéliales sont les seules à posséder un récepteur spécifique pour ce facteur.

Il existe au moins deux types de récepteurs spécifiques pour le VEGF, à activité tyrosine kinase : le récepteur KDR (kinase domain containing receptor) et FLT1 (fms-like tyrosine kinase). L'interaction entre le VEGF et ses récepteurs nécessite la présence de protéoglycanes, notamment l'héparine (Baclesse, 2006).

Le VEGF stimule la prolifération des cellules endothéliales, la production d'enzymes protéolytiques extracellulaires et la formation de structures multicellulaires pourvues de lumière afin de former des capillaires sanguins. Le VEGF joue un rôle décisif dans les premières phases de l'angiogenèse, cependant il n'est pas suffisant à lui seul pour induire l'angiogenèse.

Le TGF β est un inhibiteur puissant de la mitose et de la migration des cellules endothéliales, il stimule la synthèse de cytokines et de composés de la MEC. Le TGF β participe donc à la seconde partie de l'angiogenèse. En effet, la migration et la prolifération de l'endothélium sont stimulées dans un premier temps par le VEGF et le TGF β permet dans un second temps de produire la membrane basale des vaisseaux nouvellement formés (Pepper, 2000).

4.1.1.1.2. Facteur de croissance fibroblastique basique (bFGF)

Le facteur de croissance fibroblastique basique (b-FGF) exerce un puissant effet mitogène et chimiotactique pour les cellules endothéliales et fibroblastiques ainsi que pour les cellules musculaires lisses des vaisseaux. Il se lie facilement avec les protéoglycanes de la membrane cellulaire, notamment le sulfate d'héparine. La production d'une grande quantité de b-FGF dans les tumeurs est favorisée par la présence d'héparinases et de collagénases tumorales, qui libèrent le b-FGF lié aux protéoglycanes péri-cellulaires. Il existe un effet synergique du bFGF et du VEGF (Baclessé, 2006).

L'héparine stabilise et protège les facteurs FGF de l'inactivation, et fonctionne comme un récepteur de faible affinité qui séquestre le facteur bFGF et facilite son interaction avec les récepteurs cellulaires de haute affinité. Du fait de leur séquestration, en grande abondance, dans l'espace péri-cellulaire, par l'héparine et d'autres protéoglycanes, les facteurs FGF et VEGF sont le plus souvent inactifs. Ils sont relargués puis activés, grâce à des héparinases, après un traumatisme local minime, une irradiation, une inflammation, un choc thermique ou une nécrose tumorale (Baclessé, 2006).

4.1.1.1.3. Facteur de croissance hépatocytaire (HGF)

Le facteur de croissance hépatocytaire (HGF) est une tyrosine kinase membranaire qui stimule la croissance, la mobilité et la différenciation des cellules épithéliales. Le niveau d'expression constitutif du HGF est bas, et augmente en réponse à des dommages pulmonaires. Le HGF est surexprimé chez les patients présentant un CBNPC et est associé à un mauvais pronostic (Fong, 2002).

4.1.2. **Protéines de la matrice extra-cellulaire (MEC)**

La prolifération des cellules de soutien aboutit à un processus de fibrose, induite par une activation des fibroblastes, qui produisent des protéines de la matrice, mais aussi des enzymes de dégradation de cette dernière (Ohtani, 1999). Ainsi les cellules tumorales induisent la formation d'une nouvelle matrice en activant les cellules stromales (Ohtani, 1998).

Le TGF β 1 stimule l'expression de nombreuses protéines de la MEC dont la laminine, l'élastine, la thrombospondine et les divers types de collagène. Le TGF β 1 inhibe également la production de protéines de dégradation de la matrice. De plus, le TGF β 1 stimule l'adhésivité des cellules en modulant l'expression des intégrines. Le TGF β 1 joue donc un rôle central dans le processus de fibrose (Vignaud, 1998).

Deux facteurs sont essentiels dans l'angiogenèse :

- ✓ les interactions cellules-matrice via les molécules d'adhésion et en particulier les intégrines
- ✓ la protéolyse de la MEC réalisée par les métalloprotéinases de la matrice (MMP) et les activateurs de plasminogène (PA). Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires capables de se lier aux molécules composant la matrice par leur domaine extracellulaire et au cytosquelette par leur domaine cytoplasmique. Les intégrines peuvent également activer des voies de signalisation intracellulaires (Pepper, 2000).

4.1.2.1. Fibroblastes

Les fibroblastes associés aux tumeurs synthétisent du collagène, des fibres élastiques ainsi que d'autres composés de la MEC. Ces fibroblastes sont distincts de ceux présents dans les tissus sains. Leur durée de vie est plus longue et ils expriment des antigènes de surface fœtaux. Ils synthétisent également des isoformes tumeur-spécifiques de composés de la matrice extra-cellulaire (EDB fibronectine) ainsi que des protéases (stromélysine-3, gélatinase) et des facteurs de croissance tels que l'IL-6. Les fibroblastes associés aux tumeurs expriment de façon systématique le récepteur du PDGF. De plus, les macrophages associés aux tumeurs bronchiques produisent de grandes quantités de PDGF qui stimule la croissance des fibroblastes. Le TGF β ainsi que d'autres facteurs de croissance stimulent les sécrétions fibroblastiques et la synthèse de collagène et de fibronectine (Vignaud, 1998).

4.1.2.2. Métalloprotéinases (MMPs)

Les MMPs constituent une famille d'endoprotéases zinc-dépendantes comprenant des collagénases, des gélatinases, des stromélysines, des Membrane Type MMPs, des matrilysines et une élastase des macrophages. Les MMPs jouent un rôle central dans l'invasion tumorale par dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire (Massin, 2004).

La plupart des MMPs sont sécrétées sous forme de pro enzymes latentes (pro-MMPs) qui sont activées dans le milieu extracellulaire par clivage protéolytique. L'activateur d'urokinase-plasminogène (u-PA) ainsi que les plasmines activent les MMP de la matrice. Les MMPs sont régulées par des inhibiteurs endogènes et des inhibiteurs de métalloprotéinases. Le turnover de la MEC est régulé par la balance entre les taux d'activateurs et d'inhibiteurs des MMPs. Les MMPs jouent un rôle important dans la progression tumorale et les processus métastatiques dans les cancers du poumon (Gouyer, 2005).

La thrombine induit une augmentation importante de l'expression de MMP-1 (ou collagénase interstitielle) et de MMP-3 (ou stromélysine-1) dans les cellules endothéliales. Le facteur plaquettaire 4 (FP4), qui est sécrété par les plaquettes lorsqu'elles s'agrègent sous l'effet de la thrombine, inhibe l'activation des MMPs par la thrombine (Gouyer, 2005).

Les fibroblastes péri-tumoraux constituent la source majeure de production de MMPs (Vignaud, 1998).

4.1.3. Composante inflammatoire

La composante inflammatoire de la stroma réaction est composée principalement de lymphocytes, de macrophages et de cellules NK. Dans le CBNPC les deux tiers des cellules inflammatoires de la stroma réaction sont des lymphocytes avec 80 % de lymphocytes T dont un tiers sont cytotoxiques (Vignaud, 1998).

4.1.3.1. Cellules NK

Les cellules NK détruisent de nombreuses lignées cellulaires exprimant peu de CMH I, comme les cellules tumorales. Ces cellules interviennent rapidement, sans nécessiter de contact préalable avec l'antigène.

Les cellules NK possèdent deux types de récepteurs, des récepteurs inhibiteurs de la lyse et des récepteurs activateurs de la lyse. Les cellules NK lysent les cellules tumorales qui n'expriment pas le CMH de classe I alors que les mêmes lignées qui l'expriment ne le sont pas. Les récepteurs impliqués dans l'inhibition de la lyse sont des récepteurs KIR-L (Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor), CD94/NKG2 et ILT (CD85) (immunoglobulin-like transcript) reconnaissant différentes molécules du CMH de classe I. La reconnaissance par ces récepteurs de molécules du CMH de classe I sur une cible cellulaire permet d'inhiber la cytotoxicité NK. Les mécanismes moléculaires impliqués passent par le recrutement de tyrosines phosphatases par des motifs ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif), présents dans la portion intracytoplasmique de ces récepteurs. L'engagement de ces récepteurs bloque la transduction du signal activateur.

Cependant, certaines cibles cellulaires (notamment les érythrocytes) n'expriment pas de molécules du CMH de classe I et ne sont pas pour autant lysées par les cellules NK. Cela suggère que l'action lytique des cellules NK nécessite à la fois la levée d'inhibition et un signal activateur. Plusieurs familles de récepteurs activateurs ont été identifiées : les NCR (Natural Cytotoxicity Receptors : NKp44, NKp46, NKp30 et NKG2D), les récepteurs de la famille des KIR-S (récepteurs ayant une très forte homologie dans leur portion extracellulaire avec les récepteurs KIR-L inhibiteurs mais dépourvus de motif d'inhibition ITIM) et le récepteur NKG2C. Les KIR-S et l'hétérodimère CD94/NKG2C reconnaissent des molécules de CMH

classe I alors que le récepteur NKG2D reconnaît des molécules induites par le stress cellulaire (infection virale ou transformation tumorale) : MICA/B (molécules de classe I non-classiques).

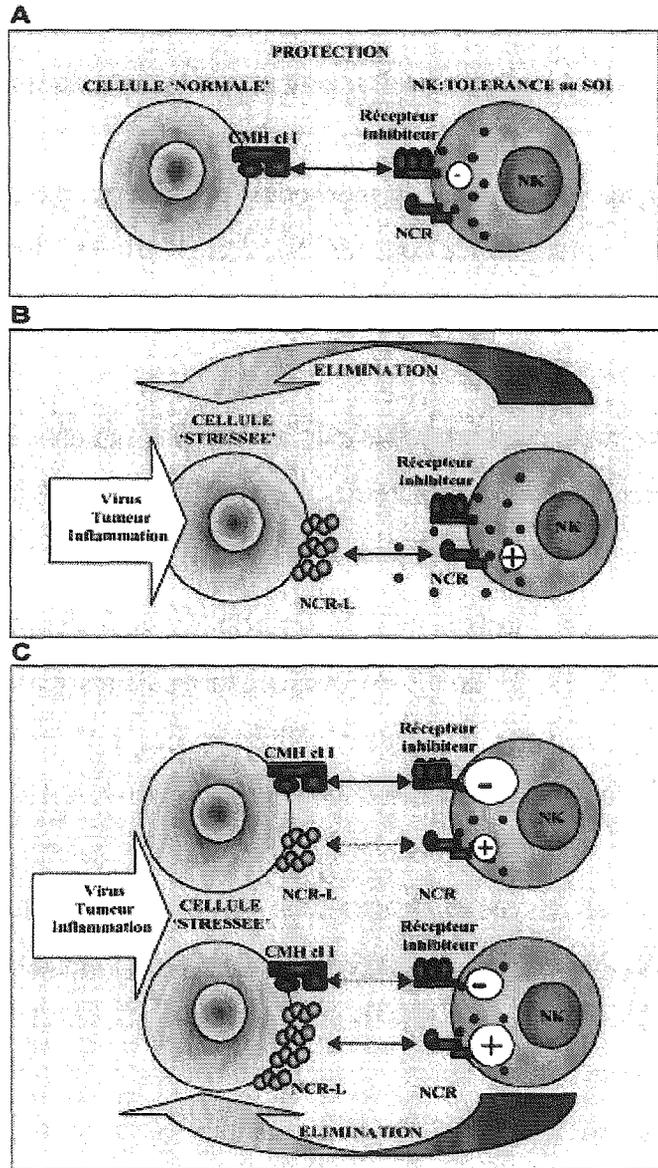
Le contrôle de l'activation des cellules NK est donc lié à la balance entre des signaux activateurs et inhibiteurs. On distingue schématiquement plusieurs situations (Figure 19) :

✓ Une cellule normale exprime à sa surface une molécule de CMH classe I reconnue par un récepteur inhibiteur NK, inhibant ainsi la cytotoxicité naturelle de la cellule NK (Figure 19 A).

✓ La cible, exprimant des ligands pour les NCR, n'exprime pas de molécule du CMH de classe I. Il n'y a donc pas d'inhibition du signal activateur et la cellule est lysée (Figure 19 B).

✓ La cible exprime de façon anormale des ligands reconnus par les NCR (cellule stressée) mais n'a pas perdu l'expression du CMH de classe I, le signal inhibiteur bloque l'activation et la cytotoxicité naturelle NK. Dans cette situation le signal inhibiteur peut être dépassé lorsque la densité en ligands activateurs ou leur affinité pour les récepteurs activateurs est importante (Figure 19 C).

Figure 19 Régulation de l'activation de la cytotoxicité NK.



Schleinitz, 2005

4.1.3.2. Macrophages

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM), présents dans la stroma réaction tumorale, présentent des fonctions contradictoires. En effet, ils ont la capacité d'affecter la production de protéines de la matrice et participent au remodelage de la matrice extra-cellulaire. Ils favorisent également l'angiogenèse. Cependant, l'activation des macrophages est nécessaire à la cytotoxicité cellulaire. Les TAM ne se multiplient pas, ils sont recrutés au site tumoral. Les principales chimiokines entrant en jeu sont MCP-1, 2 et 3, MIP et GRO α . Plusieurs cytokines anti-inflammatoires comme le TGF β et l'IL-10 contrebalancent les effets de ces chimiokines (Vignaud, 1998).

De nombreuses molécules produites par les cellules tumorales et stromales sont des activateurs des TAM comme diverses protéines de la famille des TNF dont le TNF α qui induit les cellules en apoptose et le TNF β (Vignaud, 1998).

Les TAM activés sont capables de lyser les cellules tumorales via différents médiateurs incluant des cytokines (IL-12, TNF α , IL-6) et des intermédiaires réactifs de l'oxygène et de l'azote. La cytotoxicité nécessite un contact cellulaire. Les TAM produisent également de grandes quantités de facteurs de croissance (EGF, GM-CSF, IL-1, 6, 12, PDGF, VEGF, TGF et TNF α). En particulier, le PDGF (platelet-derived growth factor), facteur de croissance chimiotactique pour les cellules mésenchymateuses (fibroblastes et cellules musculaires lisses), joue un rôle qui semble important dans l'édification du stroma (Vignaud, 1998).

4.1.3.3. Polynucléaires

Les polynucléaires ou granulocytes représentent 60 à 70 % des leucocytes du sang mais ils sont relativement peu abondants dans la stroma réaction. Les granulocytes sont des cellules douées de phagocytose caractérisées par un noyau plurilobé ainsi que des granulations spécifiques. Les polynucléaires sont constitués de trois classes cellulaires : les polynucléaires neutrophiles, les polynucléaires éosinophiles et les polynucléaires basophiles. Les plus nombreux sont les polynucléaires neutrophiles (60-70 %). Les autres polynucléaires sont beaucoup plus rares dans le sang périphérique: éosinophiles 2-5 % et basophiles <1 %

(Revillard, 2001). Par contre, les éosinophiles sont abondants dans les tissus, notamment muqueux, où ils cohabitent avec des mastocytes, cellules présentant beaucoup d'homologies avec les basophiles.

Les polynucléaires sont capables d'adhérer aux cellules endothéliales et de traverser les parois vasculaires par diapédèse. Lors de la diapédèse, les neutrophiles émettent des pseudopodes et vont circuler dans les tissus conjonctifs pour intervenir là où il y a des foyers infectieux ou tumoraux (Revillard, 2001).

4.2. Les lymphocytes T de la stroma réaction

Le poumon est un organe immunocompétent caractérisé par une grande compartimentalisation des sites immunitaires. On distingue les systèmes immunitaires muqueux des bronches, du poumon profond et des ganglions de drainage.

Le poumon humain possède parfois des formations lymphoépithéliales organisées qui saillent dans la lumière bronchique, présentant des caractéristiques communes avec les plaques de Peyer et constituant le tissu lymphoïde associé aux bronches (BALT). Ces structures sont surtout rencontrées chez les sujets polyinfectés ou ayant développé des manifestations inflammatoires importantes (Berman, 1990). Des lymphocytes intraépithéliaux sont présents entre les cellules bronchiques, et la lamina propria comporte un tissu lymphoïde diffus avec présence de plasmocytes à IgA et à IgM (Salvi, 1999).

Le poumon profond contient des agrégats de lymphocytes T et B situés à proximité des bronchioles, veinules et artérioles. Il contient également des lymphocytes et des plasmocytes épars. Les alvéoles pulmonaires sont riches en macrophages et contiennent une petite population lymphocytaire (Bingisser, 2001). De plus de nombreux ganglions drainent le poumon.

4.2.1. Les lymphocytes T de la stroma réaction des CBNPC

Les lymphocytes T infiltrant les cancers bronchiques constituent des populations hétérogènes composées principalement de cellules T CD3+. Les TIL sont majoritairement CD8+ avec un ratio CD4/CD8 bas. Par rapport aux lymphocytes du sang périphérique, les TIL

montrent une expression supérieure de nombreux marqueurs d'activation dont CD45RO, HLA-DR et CD25 indiquant que ces cellules sont activées, peut être en ayant reconnu un antigène spécifique de la tumeur. Les lymphocytes T CD8⁺ sont capables de lyser directement des cellules tumorales dans un contexte CMH de classe I. Les cellules T CD4⁺ participent à ce processus en sécrétant diverses cytokines qui régulent l'induction des cellules immunes. Les tumeurs exprimant les molécules de classe II du CMH peuvent activer directement certaines cellules T CD4⁺ tumeur-spécifiques (Vignaud, 1998).

L'infiltration lymphoïde des tissus cancéreux suggère une défense immunitaire locale contre la tumeur, mais peu de travaux se sont intéressés à ces cellules dans le CBNPC. Il a été démontré que les lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) sont enrichis en cellules T capables de reconnaître des antigènes associés aux tumeurs, exprimés à la surface des cellules cancéreuses autologues (Echchakir, 1999). Ces cellules T spécifiques ont été utilisées afin d'identifier des antigènes associés aux tumeurs codés par différentes familles de gènes, comme MAGE, BAGE et GAGE (Van Den Eynde, 1997). L'existence *in situ* d'une réponse immune cellulaire anti-tumorale a été suggérée par analyse en PCR. Cette étude a en effet montré une activation des TIL et des destructions et dommages des cellules tumorales voisines (Echchakir, 1999). De plus, le locus de la chaîne β du TCR des TIL activés montre des réarrangements dominants parmi les patients atteints de CBNPC, suggérant qu'une population oligoclonale de cellules T est présélectionnée *in vivo* au site tumoral (Melioli, 1994 ; Echchakir, 1999).

Les profils de réarrangements des gènes α , β , γ et δ peuvent être utilisés comme un marqueur permettant la détection et l'identification de populations de cellules T polyclonales, oligoclonales ou monoclonales (Flug, 1985).

Les TIL et les lymphocytes du sang périphérique d'un même patient ont très rarement été analysés simultanément. Deux études de la littérature suggèrent que les TIL contiennent une proportion significativement supérieure de lymphocytes T CD3⁺ et de lymphocytes T CD8⁺ que le sang périphérique. Les TIL contiendraient également une proportion de lymphocytes mémoires activés supérieure aux lymphocytes du sang périphérique, ceci à la fois pour les TIL CD4⁺ et les TIL CD8⁺ (Kuo, 1998 ; Viale, 1990). L'expression de CD20 (lymphocytes B), de CD25 (récepteur à l'IL-2) et de DR (CMH classe II) serait augmentée dans les TIL alors que l'expression de CD16 (cellules NK) serait diminuée (Yoshino, 1993 ; Woo, 2002). Les TIL du CBNPC contiennent une proportion supérieure de lymphocytes T CD8⁺ qui s'accumulent et ont une activité cytotoxique au site de la tumeur. Parmi les TIL CD4⁺, il existe beaucoup de

cellules T CD4⁺ CD25⁺ qui ont un haut niveau constitutif d'expression de CD152 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen ou CTLA-4). Ces cellules pourraient inhiber la prolifération des cellules T autologues. Les cellules T CD4⁺ CD25⁺ observées dans le CBNPC inhiberaient de façon sélective la réponse immunitaire de l'hôte ce qui pourrait contribuer à la progression du cancer bronchique (Woo, 2002).

4.2.2. Production de cytokines

Les cytokines exprimées dans le micro-environnement tumoral semblent être des médiateurs importants à la fois de la réponse de l'hôte et de la survie de la tumeur. La source de ces cytokines inclut les cellules tumorales, les leucocytes infiltrants, les fibroblastes et d'autres éléments de la stroma réaction.

Un travail de Ortegel et collaborateurs (2002) montre que les lymphocytes infiltrant les tumeurs du CBNPC produisent de façon prédominante des cytokines de type Th1 comme l'interféron γ (IFN- γ) et l'IL-2, qui induisent une réponse immunitaire cellulaire. Un profil d'expression cytokinique de type Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10) est associé à une réponse immune humorale. Lorsque ces cytokines sont ajoutées à une culture de TIL activés par l'IL-2, l'IL-4 et l'IL-10 entraînent l'activation des TIL cytotoxiques contre la tumeur alors que le TGF β la supprime. Par conséquent, les cellules tumorales du CBNPC expriment des cytokines qui ont la capacité de réguler la réponse antitumorale *in situ*. Cependant, les effets des cytokines dérivées de tumeurs varient qualitativement et quantitativement ce qui suggère que la balance cytokinique intratumorale pourrait influencer le pronostic de la réponse de la tumeur à une éventuelle immunothérapie. La capacité des cytokines à influencer la réponse immune antitumorale et la progression tumorale semble dépendre de facteurs tels que la concentration, la chronologie, la localisation et la cellule cible de ces cytokines. L'impact des cytokines sur les cellules tumorales dépendrait de la balance établie entre les cytokines produites par les cellules saines et celles produites par les cellules tumorales. Les cellules du CBNPC produiraient des cytokines qui influencent la prolifération des cellules tumorales et l'activation des TIL de façon positive ou négative (Ortegel, 2002 ; Zitvogel, 1999).

4.3. Echappement des cellules tumorales au système immunitaire dans le CBNPC

Le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale *in vivo*, naturelle ou induite à des fins thérapeutiques, repose sur le postulat qu'il existe des antigènes spécifiques des tumeurs, capables d'être présentés de manière efficace aux effecteurs du système immunitaire (Zitvogel, 1999). Ainsi, les cellules tumorales apparaîtraient fréquemment dans l'organisme, mais elles seraient la plupart du temps éliminées par le système immunitaire. Le développement clinique pathologique d'une tumeur serait alors dû, soit à l'échec du système immunitaire, soit à une stratégie élaborée par les cellules cancéreuses pour échapper à leur destruction par le système immunitaire (Goldsby, 2000).

La croissance et l'expansion des cellules tumorales s'accompagnent de l'apparition de néo-antigènes exprimés à leur surface. Le système immunitaire peut alors répondre à la présence de ces cellules cibles via une réponse spécifique cellulaire et/ou humorale qui peut aboutir à une lyse cellulaire par apoptose (Trojan, 2002). Ces réponses sont médiées par des lymphocytes T helper, des lymphocytes T cytotoxiques (CTL), des macrophages et des cellules natural killer (NK) (Goldsby, 2000).

Les antigènes tumoraux sont de plusieurs types, il peut s'agir d'antigènes viraux, de néo-antigènes produits par mutation génique ou par transcription illicite dans la cellule tumorale, d'antigènes de type oncofoetal qui ne s'expriment plus dans le tissu sain correspondant, d'antigènes spécifiques de tissu pour lesquels il pourrait exister une rupture de tolérance ou de peptides non mutés issus de protéines ubiquitaires surexprimées dans des cellules tumorales (Zitvogel, 1999).

La plupart des études ont montré que des TIL fraîchement isolés sont incapables de tuer les cellules tumorales, apparaissent inertes du point de vue immunologique ou sont réprimés. Ces TIL peuvent toutefois être stimulés *in vitro* afin de réexprimer une activité cytolytique contre la tumeur ce qui suggère que des facteurs intratumoraux seraient responsables de l'incompétence immunologique observée sur ces TIL. La présence de cytokines particulières, de facteurs de croissance et de protéases donne la capacité d'atténuer la réponse immune antitumorale et influence la progression tumorale (Ortegel, 2002).

De plus, des déficiences dans les mécanismes d'apprêtement et de transport des antigènes tumoraux, ainsi que des diminutions d'expression de l'antigène ou de l'allèle « présentateur » du CMH permettent aux cellules malignes de se camoufler en diminuant le nombre de complexes CMH-peptides membranaires. Des signaux de co-stimulation insuffisants peuvent de plus induire un état d'anergie des lymphocytes T spécifiques. Cette anergie peut également être induite par des cytokines produites dans l'environnement de la tumeur. Enfin, un mécanisme d'élimination active des lymphocytes par les cellules tumorales a été proposé via l'expression de FasL à la surface des cellules tumorales (Zitvogel, 1999).

Selon le travail de thèse de F Massin F (2004), diverses cytokines et chimiokines sont exprimées plus ou moins fréquemment dans les surnageants de lignées de cancers bronchiques. Ce sont l'IL-8 et le facteur d'angiogénèse Ang dans tous les surnageants, ainsi que l'IL-6, MCP1, GRO(α , β , ou γ), ENA-78 et RANTES qui sont exprimées dans un nombre décroissant de lignées. Ces molécules sont des facteurs angiogéniques importants qui permettent également le recrutement de cellules inflammatoires qui peuvent favoriser la croissance tumorale en produisant des cytokines angiogéniques, des facteurs de croissance et des protéases et peuvent également contribuer à génération d'anomalies génétiques dans les cellules épithéliales suite à la libération de radicaux libres.

4.3.1. Modulation d'expression du complexe CD3-TCR

La modulation d'expression du complexe CD3-TCR est très peu connue dans le cancer bronchique. Dans divers types de cancers, dont les mélanomes, les cancers du sein et des ovaires ainsi que les carcinomes oraux et rénaux, la diminution d'expression de la chaîne ζ de CD3 ainsi que des tyrosine kinases associées ($p56^{lck}$ et $P59^{fyn}$) a été mise en évidence au site tumoral ainsi que dans le sang périphérique (Whiteside, 2006). La chaîne CD3 ζ du TCR est essentielle à l'activation des cellules T en permettant la transduction du signal de reconnaissance de l'antigène. La diminution d'expression ou l'absence de la chaîne CD3 ζ aboutit à la transmission d'un signal de reconnaissance aberrant ou inefficace ce qui conduit à une perte partielle ou totale des fonctions immunes des lymphocytes T. Ceci se traduit par la réduction ou l'absence de flux calcique, une diminution de l'activité tyrosine kinase après reconnaissance du peptide par le complexe TCR-CD3, un profil cytokinique altéré et une augmentation de la sensibilité à l'apoptose de ces cellules T (Whiteside, 2004).

Une diminution d'expression de la chaîne ζ du TCR a également été mise en évidence dans les lymphocytes d'effusions pleurales malignes (Shikora, 2002) ainsi que dans les mésothéliomes (dans ce cas l'ensemble des chaînes du TCR sont diminuées) (Jarnicki, 1996).

4.3.2. Modulation d'expression des molécules du CMH

Les molécules de classe I du CMH sont réprimées dans les adénocarcinomes et les carcinomes épidermoïdes ainsi que dans les cancers bronchiques à petites cellules (Whiteside, 2006). De ce fait, la formation effective de complexes peptide antigénique tumoral/molécules de classe I du CMH est fortement inhibée, empêchant la reconnaissance des peptides tumoraux par les cellules T CD8+. La diminution de la reconnaissance antigénique induit une diminution d'expression de diverses cytokines d'activation et de prolifération des cellules immunes dont l'IL-2, l'IL-4, l'IL-6 et l'INF γ . De plus, les lymphocytes T infiltrant les tumeurs bronchiques montrent de faibles taux de réplication. Ces trois observations suggèrent que les TIL des cancers bronchiques sont déficients fonctionnellement dans leur capacité de médiation d'une réponse cytotoxique anti-tumorale efficace (Vignaud, 1998). Le défaut d'expression des molécules de classe I du CMH peut être dû à des dérégulations ou des mutations des enzymes TAP1 et TAP2 (Whiteside, 2006).

Les molécules de classe II (HLA-DR, DP et DQ) sont exprimées constitutivement sur les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B (Foukas, 2001). Les molécules de classe II sont également exprimées constitutivement à la surface des pneumocytes (Cunningham, 1995). L'expression de ces molécules peut aussi être induite à la surface de nombreux types cellulaires. Une étude de Foukas et collaborateurs (2001) montre que l'expression de HLA-DR de classe II est drastiquement diminuée dans les tissus tumoraux de patients présentant un cancer du poumon en comparaison à des tissus sains. L'expression de HLA-DR est diminuée aussi à la surface des cellules immunes de la stroma réaction (Foukas, 2001). et du sang périphérique des patients présentant un carcinome épidermoïde ou un cancer bronchique à petites cellules (Nakamura, 2002).

4.3.3. Expression de molécules du CMH non-classiques

Certaines molécules du CMH de classe I du CMH sont différentes des molécules HLA-A, B et C, ce sont les molécules de classe I dites non classiques. Il existe entre autre les molécules HLA-E, F et G. Ces molécules résultent d'un épissage alternatif, elles montrent un polymorphisme et une distribution tissulaire limitée. Les fonctions de ces molécules sont différentes de celles des molécules de classe I classiques, par exemple HLA-E inhibe les cellules NK alors que HLA-G est impliquée dans divers mécanismes immuns dont la tolérance immune. L'expression de HLA-G dans divers cancers est corrélée avec un mauvais pronostic (Garcia-Lora, 2003).

Il existe d'autres molécules du CMH non-classique, CD1d, MIC-A et MIC-B. La molécule CD1d se distingue des autres molécules présentatrices d'antigènes par sa capacité à présenter des antigènes glycolipidiques. CD1d est exprimée à la surface des cellules épithéliales gastrointestinales et des cellules hématopoïétiques. MIC-A et MIC-B sont des glycoprotéines exprimées principalement à la surface de l'épithélium gastrointestinal et thymique cortical. Elles présentent de faibles homologies avec les molécules de classe I du CMH. Ces molécules pourraient être impliquées dans la réponse autoimmune. L'expression de CD1d, MIC-A et MIC-B est induite sur certaines cellules épithéliales tumorales (Poccia, 2001).

5. Objectifs du travail

Les données de la littérature sont encore fragmentaires quant aux mécanismes mis en place par le système immunitaire pour contrôler la prolifération des cancers bronchiques et, réciproquement, par les cellules tumorales pour échapper à ce contrôle. A la lumière de travaux réalisés dans d'autres types de cancers, et sur la base d'un recrutement local de tumeurs fraîches, cette étude a abordé ces deux problématiques complémentaires en explorant les caractéristiques des lymphocytes intratumoraux et celles des cellules cancéreuses, et en se focalisant sur les partenaires de la synapse immunologique.

Dans ce travail, quatre approches complémentaires ont été utilisées afin d'analyser ces caractéristiques :

- ✓ La recherche de la présence de clones de cellules T, définis par les segments V β utilisés, a été réalisée à partir de lymphocytes T fraîchement isolés des tissus sains, tumoraux et ganglionnaires de chaque patient à l'aide d'une technique de cytométrie de flux. La cytométrie de flux a également été utilisée pour l'immunophénotypage des lymphocytes T dans ces trois types de tissus en utilisant un panel d'anticorps dirigés contre les molécules de surface CD3, CD4 et CD8.
- ✓ L'électrophorèse en gel de gradient dénaturant (DGGE) ainsi que l'électrophorèse en gradient de température (TTGE) ont permis de compléter l'étude de la clonalité des lymphocytes T de la stroma réaction en séparant les différents segments VJ du gène γ du TCR, amplifiés par PCR, à la paire de bases près.
- ✓ L'étude immunohistologique en immunofluorescence sur coupes à la congélation utilisant divers marqueurs lymphocytaires et pneumocytaires a été utilisée pour l'exploration phénotypique des tissus sains, tumoraux et ganglionnaires, permettant de déterminer les caractéristiques d'activation et d'interaction des différents compartiments pulmonaires. La modulation d'expression des molécules du TCR et des molécules associées au TCR telles CD3, CD4, CD8 et les molécules de classe I et de classe II du CMH a été étudiée par cette technique afin de déterminer la modulation de leur expression dans le tissu tumoral des différents types de cancers bronchiques non-à petites cellules.

✓ L'amplification par RT-PCR de l'ARN de diverses cytokines a permis de mettre en évidence la production ou non de ces cytokines en fonction du type de tissus analysé et de l'importance de la stroma réaction.

L'ensemble des résultats obtenus ont été analysés en fonction du type de tissu, du type de cancer bronchique non-à petites cellules, en particulier les adénocarcinomes et les carcinomes épidermoïdes, du stade de différenciation tumorale selon la classification TNM, de l'âge des patients et de la consommation tabagique.

Matériel et Méthodes

6. Patients et prélèvements

6.1. Patients

La population étudiée comprenait 62 patients : 55 hommes (moyenne d'âge : 62 ans \pm 10 ans) et 7 femmes (moyenne d'âge : 61 ans \pm 7 ans). Chez trente trois patients, un carcinome épidermoïde avait été diagnostiqué, 23 patients présentaient un adénocarcinome et 6 patients un carcinome à grandes cellules. Tous ces patients étaient éligibles pour une chirurgie curative de première intention.

Selon la classification TNM, 24 patients (39%) présentaient une extension aux ganglions lymphatiques proximaux et 2 patients (3%) présentaient une ou plusieurs métastases. Pour 6 patients (10%) le stade de différenciation a été évalué à T1, pour 49 (77%) à T2 et pour 7 (11%) à T3 ou T4. Des informations concernant la consommation tabagique ont pu être recueillies pour 36 patients. Elle était en moyenne de 44 \pm 16 paquets année pour les 34 patients fumeurs de ce sous groupe.

L'ensemble de cette population de patients a bénéficié d'une étude de l'utilisation du répertoire V β en cytométrie de flux et d'un immunophénotypage en quadruple marquage sur les lymphocytes élués des prélèvements tissulaires. Les échantillons sanguins de onze patients ont été analysés pour l'immunophénotypage en quadruple marquage.

La population de patients dont les tissus ont été étudiés en DGGE/TTGE comprenait 44 sujets dont 23 présentant un carcinome épidermoïde, 17 un adénocarcinome et 4 un carcinome à grandes cellules. Selon la classification TNM, 20 patients présentaient une extension aux ganglions lymphatiques proximaux et aucun patient ne présentait une/des métastase(s).

La population de patients dont les tissus ont été étudiés en immunofluorescence sur cryocoupes comprenait 51 sujet dont 28 avec un carcinome épidermoïde, 19 un adénocarcinome et 4 un carcinome à grandes cellules. Selon la classification TNM, 21 patients présentaient une extension aux ganglions lymphatiques proximaux et 4 patients présentaient une/des métastase(s).

Pour l'étude de la production tissulaire des cytokines IFN γ , TGF β , RANTES, GRO α , MCP-1, ANG, IL-6, IL-8 et ENA-78, la population étudiée comprenait 10 patients alors que l'expression du TNF α et de l'interleukine 10 (IL-10) a été étudiée chez 30 patients. La moyenne d'âge de cette population était de 62 ± 8 ans, 21 patients présentaient un carcinome épidermoïde et 9 un adénocarcinome. Cette population a été sélectionnée en fonction de l'importance de la stroma réaction du tissu tumoral, étudiée en immunofluorescence sur cryocoupes. L'ensemble de ces données sont résumées dans le Tableau 3 . Les caractéristiques cliniques des patients dont l'expression cytokinique a été étudiée en RT-PCR sont résumées dans le Tableau 4 .

Il est à noter que seules les analyses comparées entre les patients atteints d'un carcinome épidermoïde et ceux atteints d'un adénocarcinome pourront être statistiquement significatives car le nombre de patients atteints d'un carcinome à grandes cellules est trop faible (4 patients) comparé aux deux autres populations.

Tableau 3 Données cliniques des patients

	Cytométrie de flux	DGGE/TTGE	Immunohistologie	RT-PCR	
Nombre de patients	62	44	51	10	30
Hommes	55	38	45	59±8	62±8
Age	62±10	61±10	62±9		
Femmes	7	6	6		
Age	61±7	59±10	58±4		
Carcinomes épidermoïdes	33	23	28	7	21
Adénocarcinomes	23	17	19	3	9
Carciomes à grandes cellules	6	4	4	0	0
Extension ganglionnaire	24	20	21	4	12
Métastases	2	0	4	0	2
Stade T1	6	6	6	2	24
Stade T2	49	33	32	8	5
Stade T3-4	7	5	6	0	1
Consommation tabagique	34 44 ± 16	33 48 ± 17 PA	24 43±17	-	-

Tableau 4 Données cliniques des patients dont l'expression de diverses cytokines a été étudiée par RT-PCR.

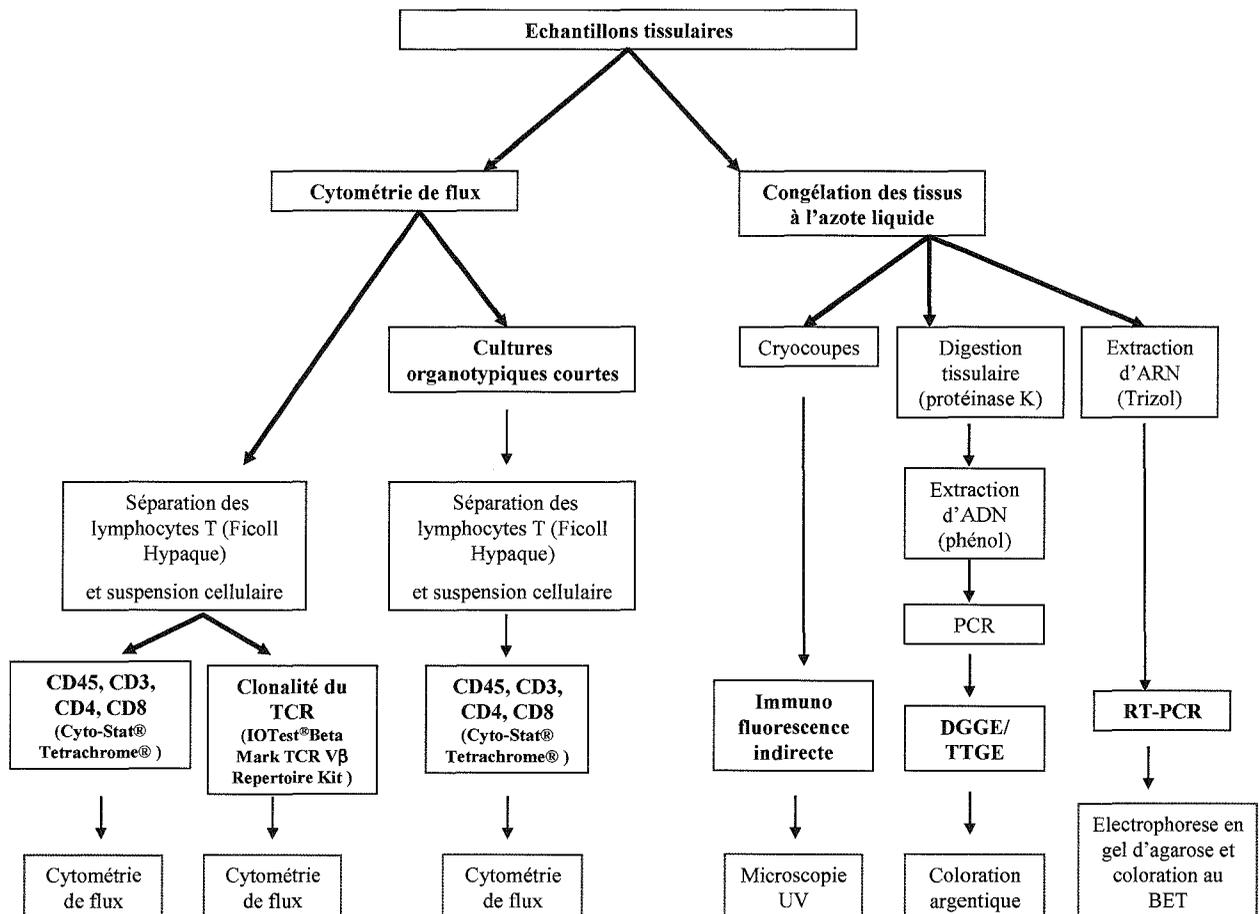
CE : carcinome épidermoïdes, AC : adénocarcinomes, SRI : stroma réaction importante, SRF : stroma réaction faible.

		Age		Type de cancer		Stade selon la classification TNM						
		Moyenne	Ecart type	CE	AC	T1	T2	T3	N0	Nx	M0	Mx
Ensemble des cytokines Population : 10 patients	10 patients	59	8	7	3	2	8	0	6	4	0	0
	SRI 5 patients	63	5	3	2	1	4	0	2	3	0	0
	SRF 5 patients	54	9	4	1	1	4	0	4	1	0	0
TNFα IL-10 Population : 30 patients	30 patients	62	8	21	9	5	24	1	18	12	28	2
	SRI 15 patients	65	6	11	4	2	12	1	8	7	13	2
	SRF 15 patients	59	9	10	5	3	12	0	10	5	15	0

6.2. Echantillons tissulaires

Les échantillons de tissu pulmonaire utilisés dans cette étude ont été obtenus immédiatement après chirurgie curative. Trois types de tissus ont été transmis par l'anatomo-pathologiste après examen macroscopique du matériel chirurgical, dans les six heures suivant l'intervention. Ces échantillons étaient respectivement (i) du tissu tumoral, (ii) du tissu pulmonaire apparemment sain prélevé aussi loin que possible de la tumeur et (iii) des ganglions intrapulmonaires. Tous les échantillons ont été transportés dans une solution saline à température ambiante. Une petite partie de chaque échantillon a été utilisée à l'état frais pour les techniques de cytométrie de flux. L'autre partie de chaque échantillon a été congelée en azote liquide et conservée à -80°C pour les autres techniques.

Figure 20 Schématisation des principales étapes des différents protocoles utilisés pour l'étude de la réponse immunitaire locale et de la modulation tumeur dépendante dans le cancer bronchique non-à petites cellules



7. Cytométrie de flux :

7.1. Principe

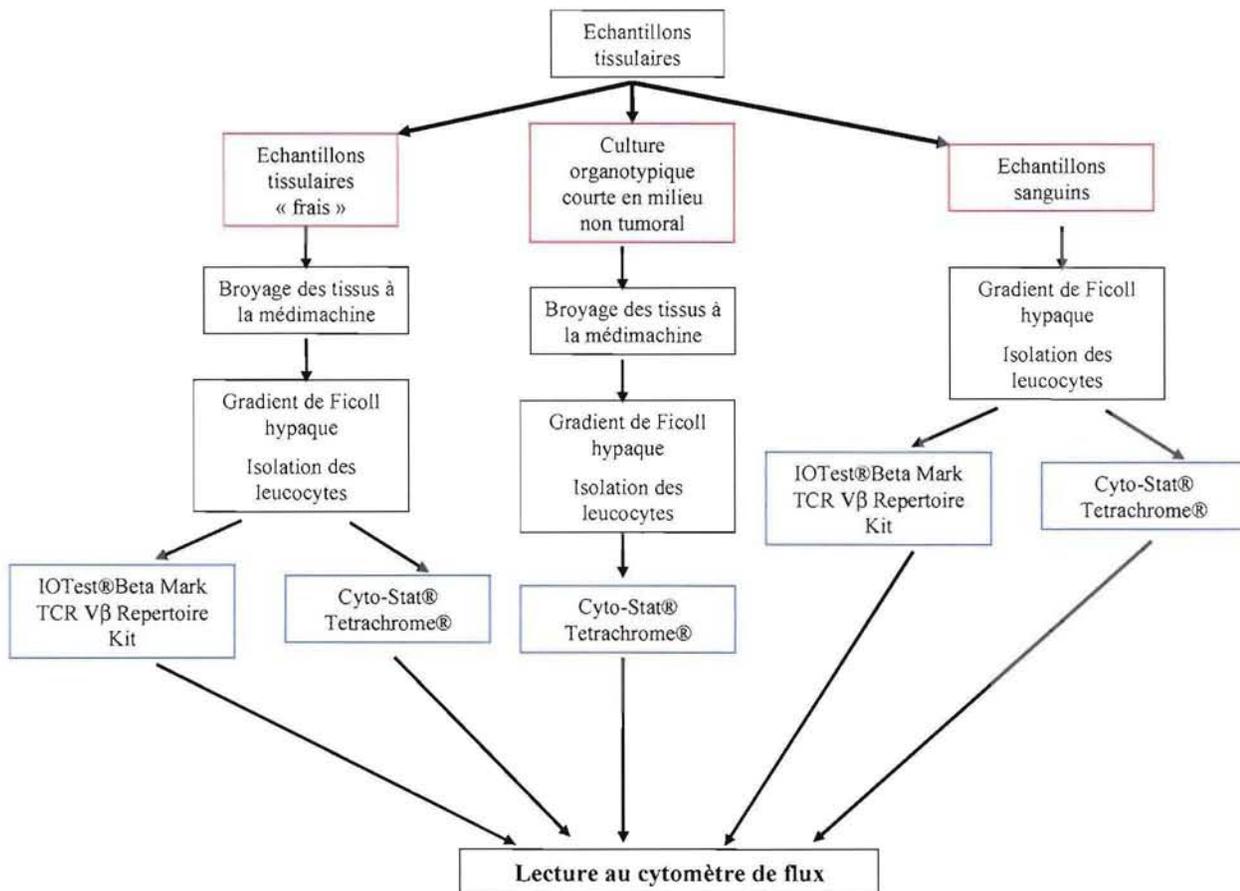
Les analyses réalisées en cytométrie de flux sont résumées dans la Figure 21 .

Différentes études ont été réalisées en cytométrie de flux :

- l'immunophénotypage des lymphocytes T par quadruple marquage (CD45, CD3, CD4 et CD8) à partir de quatre populations lymphocytaires : les lymphocytes fraîchement élués des tissus sains, tumoraux et ganglionnaires ; les lymphocytes élués de ces tissus après culture organotypique courte en milieu non-tumoral ; des lymphocytes de patients non cancéreux après culture courte en milieu tumoral ; les lymphocytes sanguins de patients présentant un cancer bronchique.

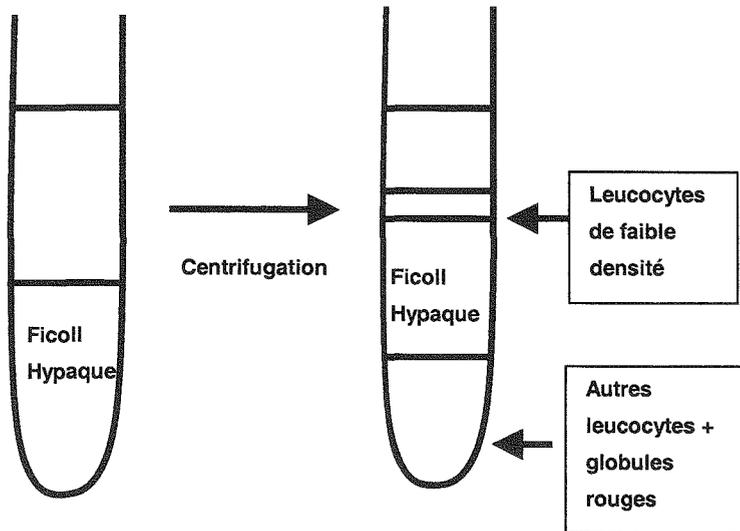
- l'immunophénotypage du répertoire V β du TCR à partir des lymphocytes T fraîchement élués des tissus sains, tumoraux et ganglionnaires ainsi qu'à partir de lymphocytes T sanguins provenant de 11 patients atteints d'un cancer bronchique non-à petites cellules.

Figure 21 **Schématisation des étapes des différents protocoles utilisés pour les techniques de cytométrie de flux**



La technique de cytométrie de flux permet une analyse qualitative et quantitative de cellules marquées, de façon directe ou indirecte, par un ou plusieurs fluorochrome(s) au sein d'une suspension cellulaire. La séparation des lymphocytes T a été réalisée par gradient de Ficoll-Hypaque. Les globules rouges, les polynucléaires, les cellules parenchymateuses et stromales et les monocytes peuvent être séparés des lymphocytes par ce gradient de densité de 1,077 correspondant à la densité des lymphocytes.

Figure 22 Séparation des lymphocytes d'une suspension cellulaire par gradient de densité de Ficoll-Hypaque



Le marquage fluorescent peut être porté par des molécules de surface, de l'ADN, de l'ARN, des organites intracellulaires, en fonction des techniques mises en œuvre et des réactifs utilisés. Ici, ce sont des molécules membranaires qui ont été identifiées à l'aide d'anticorps monoclonaux.

L'analyse en cytométrie de flux repose ensuite sur la mesure de l'interaction entre les fluorochromes fixés sur ou dans les cellules et un faisceau laser.

La suspension de cellules marquées est injectée dans une veine capillaire contenant un courant liquidien rapide entraînant la suspension dans une chambre dont le diamètre diminue progressivement pour permettre un bon alignement des cellules. L'ensemble de ces deux processus permet le passage de la suspension cellulaire cellule par cellule devant un faisceau laser excitateur. Le passage des cellules devant le faisceau du laser provoque une diffraction mesurable de ce dernier. De plus, les fluorochromes excités par le laser émettent une fluorescence de longueur d'onde spécifique.

Les signaux optiques émis par chaque cellule sont focalisés et séparés par des circuits de miroirs dichroïques puis acheminés vers les systèmes de détection qui sont des photomultiplicateurs permettant de convertir les signaux optiques en signaux électriques. Un système de filtres dichroïques permet également de séparer dans le rayonnement émis les différentes longueurs d'ondes émises par différents fluorochromes (fluorescence verte, orange, rouge...).

Les différents types de signaux lumineux recueillis fournissent des informations multiples. Ainsi, la lumière diffusée renseigne sur la taille et la morphologie de chaque cellule. La lumière mesurée dans un angle de 1 à 15° par rapport à l'axe du rayon incident reflète la taille de la cellule, c'est le Forward Scatter (FS). La lumière diffusée mesurée à 90°, qui dépend du rapport nucléocytoplasmique, des granulations cytoplasmiques et de la réfringence de la cellule, reflète la structure de la cellule, c'est le Side Scatter (SS). Chaque photomultiplicateur renseigne de plus sur la fluorescence éventuellement émise par la cellule.

Les résultats se présentent sous forme d'histogrammes mono- ou biparamétriques accompagnés pour chacun d'une liste des statistiques afférentes. Cette dernière peut contenir pour chaque sous population cellulaire sélectionnée le nombre de cellules, le pourcentage par rapport au total ou à un fenêtrage spécifique, la valeur moyenne de chacun des paramètres analysés, le pic de fluorescence, les coefficients de variation.

7.1.1. Immunophénotypage des lymphocytes T par quadruple marquage :

L'immunophénotypage des lymphocytes T a été réalisé par quadruple marquage avec le mélange suivant d'anticorps monoclonaux de souris : CD45/FITC (isothiocyanate de fluorescéine), CD3/PC5 (phycoérythrine-cyanine5), CD4/RD1 (rhodamine), CD8/ECD (phycoérythrine-texas red) (Cyto-Stat® Tetrachrome® Beckman-Coulter, Miami, Floride, USA). Lorsqu'ils sont excités par un laser argon émettant à 488 nm, le FITC émet entre 504 et 541 nm une fluorescence verte, la RD1 émet entre 568 et 590 nm une fluorescence orange, l'ECD émet entre 610 et 635 nm une fluorescence rouge et la PC5 émet entre 660 et 680 nm une fluorescence violette.

Les histogrammes suivants ont été générés pour chaque prélèvement étudié :

✓ un histogramme biparamétrique Structure/Taille qui donne accès à des informations sur la taille et la morphologie de la cellule. Sur cet histogramme chaque cellule est représentée par un point dont les coordonnées indiquent la granularité cellulaire en abscisse et la taille de la cellule en ordonnée. Ceci permet d'identifier les populations cellulaires analysées. La formation d'un nuage de points plus dense permet de placer une fenêtre d'intérêt (ou Bitmap) englobant la population cellulaire à étudier.

✓ un histogramme biparamétrique CD45/Taille qui exprime le Forward Scatter en fonction du logarithme de l'intensité de fluorescence FITC (FL1). Cet histogramme permet de repérer et d'analyser les lymphocytes qui sont les leucocytes exprimant le plus fortement cette molécule en définissant les contours d'une bitmap. Seules les cellules contenues dans cette bitmap seront étudiées dans la suite des analyses. Ce fenêtrage est nécessaire car malgré la séparation sur Ficoll, les échantillons de cellules tissulaires éluées contiennent beaucoup d'événements qui ne correspondent pas à des lymphocytes.

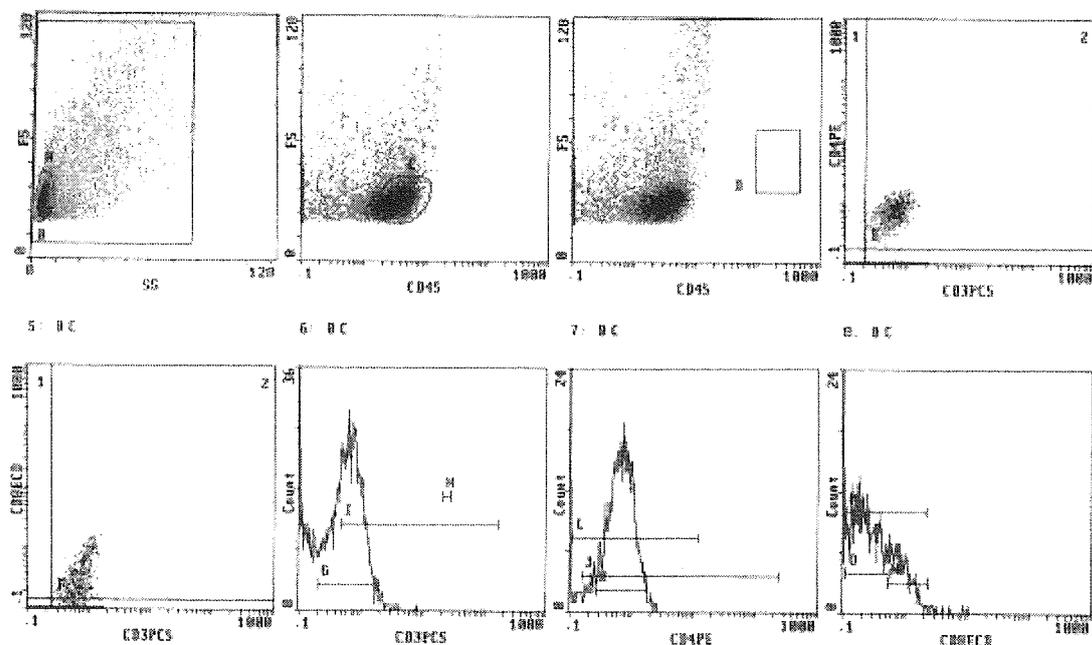
✓ des histogrammes monoparamétriques CD3, CD4 et CD8/count permettant de comptabiliser le nombre de cellules exprimant respectivement CD3, CD4 et CD8 au sein de la population lymphocytaire étudiée, définie par la bitmap.

✓ un histogramme biparamétrique CD3/CD4 permettant de déterminer le nombre de cellules exprimant à la fois les marqueurs CD3 et CD4 et celles n'exprimant que CD3 ou que CD4.

✓ un histogramme biparamétrique CD3/CD8 permettant de déterminer le nombre de cellules exprimant à la fois les marqueurs CD3 et CD8 et celles n'exprimant que CD3 ou que CD8.

Un exemple de l'ensemble de ces histogrammes est présenté dans la (Figure 23).

Figure 23 Exemple d'histogrammes monoparamétriques et biparamétriques utilisés pour l'immunophénotypage des lymphocytes T tissulaires par quadruple marquage



Stats: Not Normalized, Listgating: Disabled

Hist	Region ID	%	Count	PkPosX	PkPosY	PkCnt	Min X	Min Y	FPCVX	FPCVY
1	A A	28.4	10311	4.0	29.0	181	5.6	29.8	38.34	18.92
	B B	69.5	25182	4.0	29.0	181	22.0	44.3	90.39	53.36
	C C	92.5	8189	2.26	29.0	48	3.42	30.9	43.66	18.22
3	D CAL1034	0.00	0	----	----	..	----	----
4	E1 E	1.43	117	0.102	0.402	4	0.132	0.495	25.34	47.66
	E2 E	26.2	2144	0.499	0.576	14	0.626	0.662	63.62	51.99
	E3 E	51.9	4251	0.102	0.102	3584	0.106	0.103	14.00	2.04
	E4 E	20.5	1677	0.625	0.102	88	0.625	0.104	61.74	6.21
5	F1 F	0.61	50	0.102	0.166	3	0.155	0.236	31.67	37.55
	F2 F	22.2	1882	0.665	0.169	12	0.779	0.412	82.28	77.82
	F3 F	54.4	4454	0.102	0.102	3600	0.110	0.102	18.37	1.41
	F4 F	22.8	1863	0.499	0.102	96	0.547	0.105	50.05	7.17
6	G G	45.7	3744	0.625	0.710	2.57	0.210	1.96		
	H H	0.01	1	23.6	23.7	0.38	21.4	28.6		
	I I	31.4	2574	0.868	0.982	2.57	0.508	172.5		
	J J	27.9	2281	0.665	0.765	2.67	0.161	251.7		
7	K K	25.6	2097	0.700	0.770	2.67	0.271	1.82		
	L L	28.6	2340	0.638	0.749	2.67	0.119	12.7		
	M M	25.5	2085	0.350	0.469	0.60	0.114	2.25		
	N N	7.62	624	0.905	0.970	0.65	0.536	2.38		
8	O O	18.9	1541	0.234	0.261	0.60	0.110	0.566		

Les valeurs relevées étaient respectivement le pourcentage de lymphocytes marqués pour chaque molécule d'intérêt et la moyenne d'intensité de fluorescence de chaque pic (MFI : Mean Fluorescence Intensity), caractéristique de la densité antigénique de chaque marqueur sur les cellules.

7.1.2. Immunophénotypage du répertoire V β du TCR par triple marquage :

L'analyse du TCR $\alpha\beta$ des lymphocytes a été réalisée grâce à la trousse IOTest[®]Beta Mark TCR V β Répertoire Kit (Immunotech, Beckman-Coulter, Miami, Floride, USA) contenant 24 anticorps qui couvrent 70 % du répertoire TCR V β humain normal des lymphocytes T CD3⁺ du sang périphérique. Ce test repose sur la combinaison de 3 anticorps monoclonaux de souris spécifiques chacun d'un segment du répertoire V β , conjugués à deux fluorochromes, et regroupés dans un seul test. Un des anticorps est couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), un autre à la phycoérythrine (PE) et le troisième anticorps est couplé à la fois à la PE et au FITC (Tableau 5).

Tableau 5 Anticorps monoclonaux composant le IOTest®Beta Mark TCR Vβ Repertoire Kit utilisé pour l'immunophénotypage du répertoire V-beta du TCR.

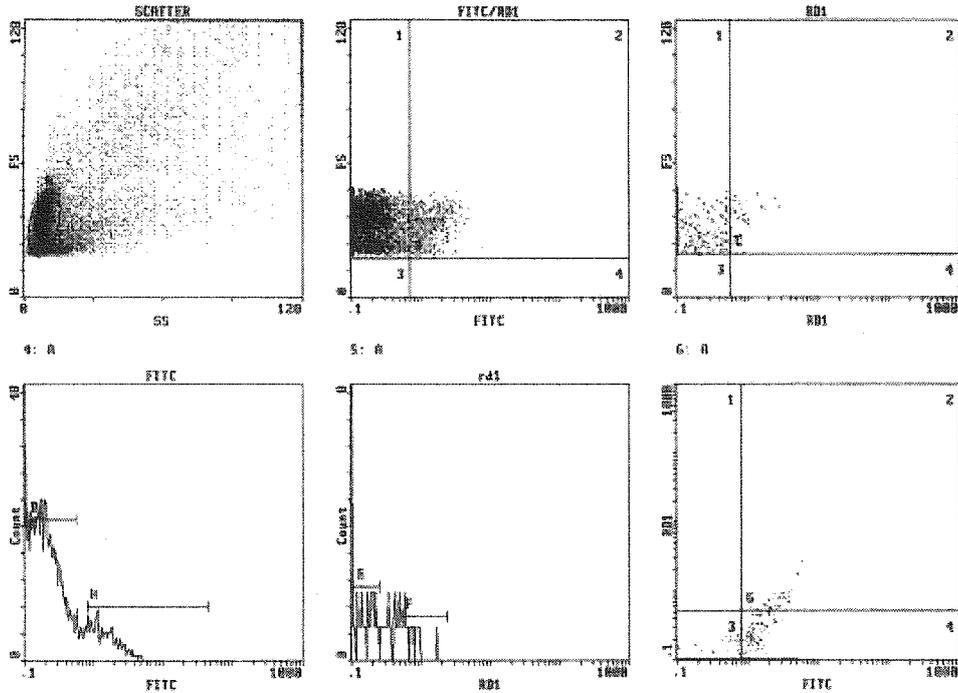
ube	Vβ/ Fluorochrome		Clone	Isotype (espèce)
A	Vb 5.3	PE	3D11	IgG1 (souris)
	Vb 7.1	PE+FITC	ZOE	IgG2a (souris)
	Vb 3	FITC	CH92	IgM (souris)
B	Vb 9	PE	FIN9	IgG2a (souris)
	Vb 17	PE+FITC	E17.5F3	IgG1 (souris)
	Vb 16	FITC	TAMAYA1.2	IgG1 (souris)
C	Vb 18	PE	BA62.6	IgG1 (souris)
	Vb 5.1	PE+FITC	Immu157	IgG2a (souris)
	Vb 20	FITC	ELL1.4	IgG (souris)
D	Vb 13.1	PE	Immu222	IgG2b (souris)
	Vb 13.6	PE+FITC	JU74.3	IgG1 (souris)
	Vb 8	FITC	56C5.2	IgG2a (souris)
E	Vb 5.2	PE	36213	IgG1 (souris)
	Vb 2	PE+FITC	MBP2D5	IgG1 (souris)
	Vb 12	FITC	VER2.32	IgG2a (souris)
F	Vb 23	PE	AF23	IgG1 (souris)
	Vb 1	PE+FITC	BL37.2	IgG1 (rat)
	Vb 21.3	FITC	IG125	IgG2a (souris)
G	Vb 11	PE	C21	IgG2a (souris)
	Vb 22	PE+FITC	Immu546	IgG1 (souris)
	Vb 14	FITC	CAS1.13	IgG1 (souris)
H	Vb 13.2	PE	H132	IgG1 (souris)
	Vb 4	PE+FITC	WJF24	IgM (rat)
	Vb 7.2	FITC	ZIZOU4	IgG2a (souris)

Les données ont été analysées à l'aide des histogrammes suivants :

- ✓ un histogramme biparamétrique Structure/Taille (SS/FS) permettant d'identifier les populations cellulaires analysées et de placer la fenêtre d'intérêt (ou Bit Map A) englobant la population lymphocytaire.
- ✓ un histogramme biparamétrique de l'intensité de fluorescence en isothiocyanate de fluorescéine (FITC) par rapport à la taille des cellules.
- ✓ un histogramme biparamétrique de l'intensité de fluorescence en phycoérythrine RD1 par rapport à la taille des cellules.
- ✓ un histogramme biparamétrique FITC/RD1 qui permet de différencier les trois populations cellulaires respectivement marquées en FITC (B4), en PE (B1) ou à la fois en FITC et PE (B2), c'est-à-dire les cellules exprimant chacun des V β de chaque combinaison d'anticorps.

Un exemple de l'ensemble de ces histogrammes est présenté dans la Figure 24 .

Figure 24 Exemple d'histogrammes monoparamétriques et biparamétriques utilisés pour l'immunophénotypage du répertoire V β du TCR par triple marquage



Stats: Not Normalized, Listgating: Disabled

Hist	Region ID	%	Count	Min X	Min Y
1	A A	31.7	9995	6.2	33.7
2	B1 B	91.6	9101	0.160	33.7
	B2 B	8.39	834	1.74	33.1
	B3 B	0.00	0	****	****
	B4 B	0.00	0	****	****
3	C1 C	99.6	9794	0.109	33.8
	C2 C	0.35	55	0.965	34.8
	C3 C	0.87	86	0.116	19.0
	C4 C	0.00	0	****	****
6	G1 G	0.01	1	0.132	2.91
	G2 G	0.60	60	3.18	0.911
	G3 G	92.4	9179	0.165	0.107
	G4 G	7.00	695	1.72	0.142
4	D D	34.7	3444	0.231	
	H H	7.51	746	1.85	
	E E	1.09	106	0.176	
	F F	0.95	55	0.874	

7.2. Méthodes

7.2.1. Cultures

7.2.1.1. Cultures organotypiques courtes

Pour chaque type de tissu, un petit fragment de tissu frais a été mis en culture extemporanée dans 1mL de milieu Quantum 007 (PAA Laboratories GmbH, Pasing, Austria) pendant une nuit dans une des chambres de plaques de culture Costar® 12 puits stériles (Corning incorporated, NY, USA). Le milieu Quantum 007 est un milieu de culture complet pour lymphocytes, contenant de la L-glutamine et contrôlé pour l'absence d'endotoxine. Après cette incubation, une suspension cellulaire a été ensuite réalisée pour chacun des prélèvements ayant pu en bénéficier (37 tissus sains et tumeurs, 6 ganglions)

7.2.1.2. Cultures courtes de lymphocytes T

Cinq cent microlitres d'une suspension cellulaire de lymphocytes T fraîchement séparés dans du Hank's (10^6 cellules/mL) provenant de sujets non cancéreux ont été également mis en culture extemporanée pendant une nuit dans 1mL de surnageant de la lignée cellulaire A549 (adénocarcinome épithélial pulmonaire). Les lymphocytes ont ensuite été lavés deux fois dans 7 mL de Hank's et remis en suspension pour étude en cytométrie de flux.

7.2.2. Suspensions de lymphocytes intratissulaires

Pour chaque échantillon, un fragment environ 1cm^3 de la partie tissulaire réservée à l'élution lymphocytaire a été découpé aux ciseaux dans une boîte de Petri dans du Hank's puis soumis à une dissociation mécanique à l'aide de la MediMachine. Les cellules éluées ont ensuite été prélevées du Medicon à l'aide d'une seringue à insuline de 1mL et mises en suspension dans 10mL de Hank's. Cette suspension cellulaire a ensuite été soumise à une centrifugation sur gradient de Ficoll-Hypaque afin d'isoler les lymphocytes. Ces derniers ont été recueillis en prélevant l'anneau cellulaire formé à l'interface Ficoll/Hank's après 30 minutes de centrifugation à 400g. Les lymphocytes ont été remis en suspension dans 20 mL de Hank's et

lavés par une centrifugation de 5 minutes à 600g. Les suspensions cellulaires ont été ajustées à 10^6 cellules/mL.

Les lymphocytes issus des suspensions cellulaires de tissus frais ont été additionnés de 20 mL de Hank's, centrifugés 5 minutes à 1800 rpm et le culot cellulaire a été remis en suspension dans du Hank's à raison d'un volume final de 500 μ L. Neufs aliquots de 50 μ L de suspension cellulaire ont été incubés avec 5 μ L de chaque combinaison d'anticorps :

- 8 tubes incubés chacun avec une des 8 combinaisons de trois anticorps (IOTest[®] Beta Mark TCR V β Repertoire Kit) pour la recherche de clonalité des lymphocytes T,
- 1 tube incubé avec le mélange de quatre anticorps (Cyto-Stat[®] Tetrachrome[®]) pour l'immunophénotypage des lymphocytes T.

Les lymphocytes issus des cultures tissulaires courtes ont été remis en suspension dans 20 mL de Hank's, centrifugés 5 minutes à 1800 rpm et le culot cellulaire a été remis en suspension dans du Hank's à raison d'un volume final de 50 μ L. Un aliquot de 50 μ L de suspension cellulaire a été incubé avec 5 μ L Cyto-Stat[®] Tetrachrome[®].

Les lymphocytes issus des échantillons sanguins ont été remis en suspension dans 20 mL de Hank's, centrifugés 5 minutes à 1800 rpm et le culot cellulaire a été remis en suspension dans du Hank's à raison d'un volume final de 500 μ L. Neufs aliquots de 50 μ L de suspension cellulaire ont été incubés avec 5 μ L de chaque combinaison d'anticorps :

- 8 tubes incubés chacun avec une des 8 combinaisons de trois anticorps pour la recherche de clonalité des lymphocytes T,
- 1 tube incubé avec le mélange de quatre anticorps pour l'immunophénotypage des lymphocytes T.

Les différents mélanges cellules-anticorps ont été vortexés, puis incubés 30 minutes à 4°C et lavés avec 1 mL de liquide de rinçage (PBS-BSA (2 %)-bicarbonate qsp pH 7,2). Trois cent μ L de paraformaldéhyde 0,1 % en PBS ont été ajoutés à chaque culot cellulaire avant analyse au cytomètre de flux.

7.3. Analyses statistiques

La normalité de la distribution des résultats a été testée par le test de Kolmogorov Smirnov. Les résultats ont été analysés par un t test de Student à l'aide du logiciel GraphPadPrism™ pour les analyses d'immunophénotypage en quadruple marquage dont les distributions étaient normales. En l'absence de distribution normale, les résultats de l'identification des clones de cellules T ont, quant à eux, été exprimés en médianes et analysés par un test de Wilcoxon apparié (logiciel GraphPadPrism™).

8. Electrophorèse en gradient de température (TTGE) et électrophorèse en gel de gradient dénaturant (DDGE)

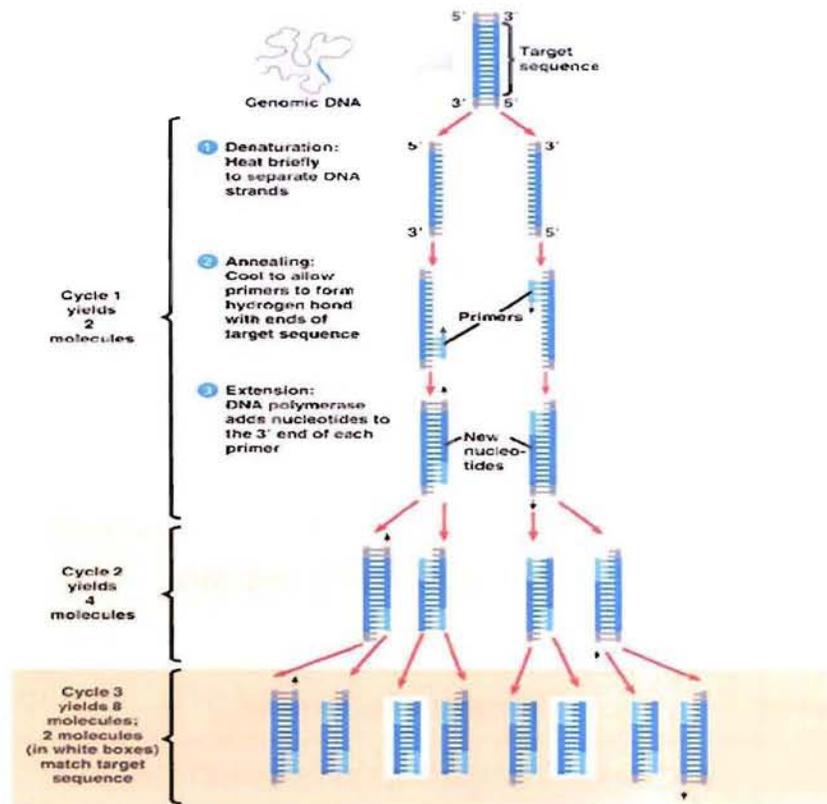
8.1. Principe

Les techniques de DGGE et de TTGE se réalisent après un certain nombre d'étapes de préparation et d'amplification des segments géniques d'intérêt. Les tissus sont tout d'abord digérés à la protéinase K puis une extraction phénolique de l'ADN est réalisée. La digestion des tissus à la protéinase K permet la libération de l'ADN dans le milieu par la dégradation des membranes nucléaires et plasmiques des cellules. L'extraction phénolique utilise la solubilité différentielle des composés cellulaires dans deux phases non miscibles. Seul l'ADN est soluble dans la phase aqueuse. La concentration en ADN est déterminée par mesure de la densité optique (DO) de la solution à 260 nm, une unité de DO correspondant à 50 µg d'ADN. La pureté de la préparation est simultanément testée en mesurant la DO à 280 nm afin de quantifier la contamination protéique. Les ADN sont ensuite amplifiés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

8.1.1. PCR :

La technique de polymérisation en chaîne est utilisée pour l'amplification de séquences nucléotidiques précises d'ADN double-brin. La Taq polymérase permet de synthétiser un brin complémentaire d'ADN entre deux amorces nucléotidiques qui vont s'hybrider avec la séquence complémentaire sur chacun des brins d'ADN. La Taq polymérase permet donc d'amplifier la séquence contenue entre les amorces à partir de l'extrémité 3'OH de l'amorce hybridée et des quatre dNTPs qui servent de substrat. La température varie au cours de chaque étape des cycles de réplication, et dépend par ailleurs de la séquence choisie. Par réplications successives au cours de n cycles, on obtient 2^n copies de la séquence d'ADN d'intérêt (Figure 25).

Figure 25 Principe d'amplification d'une séquence génique par réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN.



Source : <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/c7.20.7.pcr.jpg>

Dans le cadre de l'étude de la clonalité des lymphocytes T dans la stroma réaction des cancers bronchiques non-à petites cellules, les séquences géniques codant pour les gènes du domaine variable V de la chaîne γ du TCR ont été étudiées. Pour cela, les séquences nucléotidiques de 8 amorces couvrant les répertoires V et J de la chaîne γ ont été choisies selon les données publiées par Théodorou et al. (1995) (Figure 26).

Figure 26 Localisation des différentes amorces utilisées pour l'amplification en chaîne de l'ADN dans le locus γ du TCR (d'après Greiner, 1995).

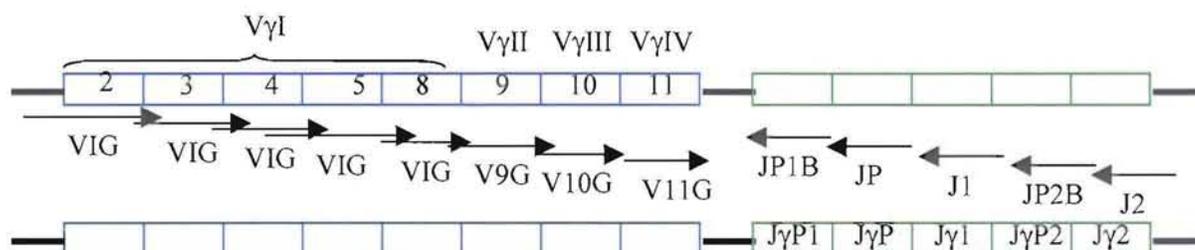


Tableau 6

Séquence des amorces utilisées pour l'amplification en chaîne de l'ADN par une technique de PCR multiplex.

Gènes	Amorces	Séquence des amorces	Positions
V γ I	VIG	(GC clamp) CCAGGAGGGGAAGGCCCCACAG	366-387
V γ II	V9G	(GC clamp) ATCTGGCATTCCGTCAGGCAA	360-381
V γ III	V10G	(GC clamp) ACAAAGTGGAGGCAAGAAAGAA	366-387
V γ IV	V11G	(GC clamp) GCTCAGGTGGGAAGACTAAGAA	336-357
J1	J1	CCGATACTTACCTGTGACAAC	217-197
JP	JP	TTGTTCCGGGACCAAATACCTT	75-54
JP1	JP1B	AGCTTAGTCCCTTCAGCAAATA	71-50
JP2	JP2B	AGCCTAGTCCCTTTTGCAAACG	60-39

Les quatre amorces 5' sont précédées d'un *GC clamp* (séquence riche en GC) qui servira pour la DGGE (électrophorèse en gel de gradient dénaturant) et les huit amorces (Genset Oligos, Paris, France) sont utilisées simultanément en une PCR multiplex. La T_m utilisée ici était de 56°C.

Pour chaque PCR, trois contrôles ont été réalisés : un contrôle sans ADN pour détecter une contamination éventuelle des produits de PCR par de l'ADN non recherché, un témoin d'ADN de lymphome T (syndrome de Sezary : lymphome T cutané présentant une clonalité des lymphocytes T CD4+, CD7- malins) comme témoin positif dont le profil électrophorétique ne doit comporter qu'une seule bande et un témoin d'ADN de lymphome B comme témoin négatif car les réarrangements du BCR ne sont pas détectés par les amorces spécifiques du TCR gamma (Figure 27).

8.1.2. Electrophorèse en gradient de température (TTGE) et électrophorèse en gel de gradient dénaturant (DDGE)

L'électrophorèse en gradient de température (TTGE) et l'électrophorèse en gel de gradient dénaturant (DGGE) sont deux méthodes électrophorétiques similaires permettant d'identifier des variations d'une seule base entre deux segments d'ADN de taille identique. Ces techniques sont basées sur la séparation de fragments d'ADN double brin en fonction de leur composition et de leur séquence nucléotidique.

Pour la DGGE, un fragment d'ADN double brin est soumis à une électrophorèse dans un gel de polyacrylamide contenant un gradient d'agents dénaturants (urée et formamide) linéaire et parallèle à la migration. Ces agents dénaturants augmentent la solubilité des bases dans l'eau, engendrant des interactions hydrophobes qui abaissent la température de demi-dénaturation (T_m). La T_m est caractéristique de chaque séquence nucléotidique et un changement d'une seule base engendre une variation de celle-ci (Figure 27).

Le principe de la TTGE est identique mis à part le fait que cette technique utilise un gradient de température pour dénaturer les ADN au lieu d'un gradient d'agents dénaturants. De ce fait, la réalisation de la TTGE est plus aisée que celle de la DGGE.

La dénaturation de l'ADN se fait par domaines suivant leur stabilité : un domaine riche en A-T (2 liaisons hydrogènes) s'ouvrira plus rapidement qu'un domaine riche en G-T (3

liaisons hydrogènes) car sa T_m est inférieure. Deux molécules d'ADN de même longueur dont les séquences ne diffèrent que d'une paire de bases ne s'ouvriront pas en même temps et migreront différemment à travers un gradient donné, qu'il soit de température ou d'agent dénaturants (selon le manuel d'utilisation du DCode™ Universal Mutation System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)).

Cependant, pour qu'un fragment soit analysable par DGGE ou par TTGE, il faut qu'il contienne au moins deux domaines de stabilité différente, le domaine le plus stable retardant l'ouverture totale de la molécule, alors que le moins stable sera dénaturé. C'est pourquoi il est créé artificiellement un domaine de haute stabilité, adjacent au domaine à explorer, en fixant, à l'extrémité 5' de l'une des deux amorces oligonucléotidiques de PCR, la séquence riche en G/C (G/C clamp) suivante :

5'CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCC3'.

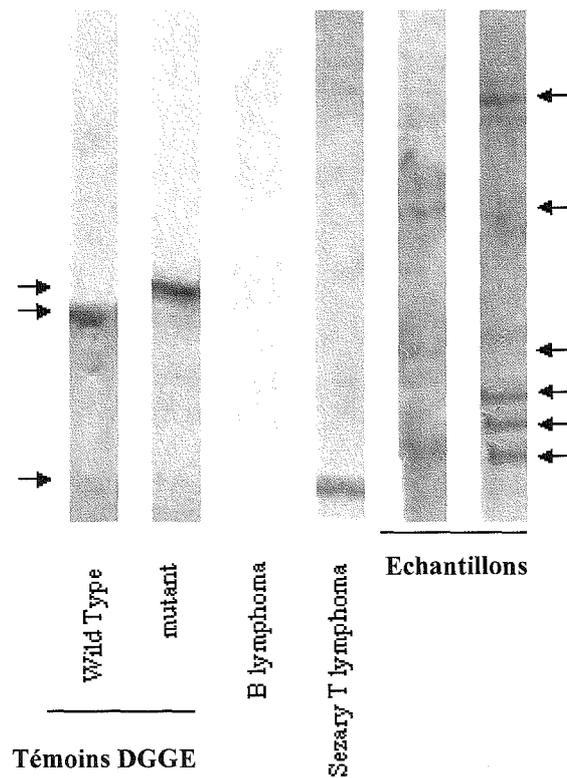
Lorsque le fragment d'ADN contenant ces deux domaines atteint dans le gel la position de demi-dénaturation de son domaine de fusion le moins stable, les deux brins de ce domaine se dissocient, créant une conformation partiellement simple brin. Ceci provoque une diminution de la mobilité électrophorétique, et la position finale du fragment dépend ainsi de la position de demi-dénaturation du domaine le moins stable et donc de sa séquence (selon le manuel d'utilisation du DCode™ Universal Mutation System (Bio-Rad)).

Deux contrôles de DGGE (Bio-Rad) ont été utilisés. Ils consistent en une PCR pour l'amplification d'un fragment d'ADN génomique humain sauvage et d'un fragment d'ADN génomique humain mutant. Le fragment d'ADN mutant est identique à l'ADN sauvage à l'exception d'une mutation unique d'un G en A en position 138 de l'exon 8 du gène p53 (Ras) humain selon la notice du kit DCode™ control reagent kit for DGGE, CDGE, TTGE (Figure 27).

L'identification de la position de migration des amplicons dans les gels de DGGE/TTGE a été réalisée par une coloration argentique. Cette méthode repose sur la réduction différentielle des ions argent fixés à l'ADN par l'intermédiaire du glutaraldéhyde. En effet, l'une des fonctions aldéhydiques du glutaraldéhyde se fixe à l'ADN et l'autre aux ions argent (selon le manuel d'utilisation du Phast system, Pharmacia Biotech, Saint Quentin Yvelines, France) (Figure 27).

Figure 27 Exemples de bandes indiquant la présence de petits clones lymphocytaires T après amplification du répertoire V-J γ et DGGE/TTGE.

→ : bande



8.2. Méthode

8.2.1. Digestion tissulaire et extraction phénolique de l'ADN

Un échantillon (3mm³) de chaque prélèvement tissulaire congelé à l'azote liquide a été décongelé à température ambiante puis broyé en Eppendorf à l'aide d'un broyeur adapté (Piston Pellet) dans du tampon STE. Les broyats ont ensuite été incubés 12 heures à 56°C afin d'assurer l'activité de l'enzyme, puis conservés à 4°C.

Les échantillons digérés par la protéinase K ont été soumis à deux lavages v/v successifs (au minimum) en tampon phénol (aquaphénol et Ready Red v/v) sous hotte à extraction des toxiques, puis centrifugés 5 minutes à 3000 rpm à 4°C avant recueil de la phase aqueuse. L'ADN a ensuite été précipité par addition de 0,1 volume d'acétate de sodium 3M et 2 volumes d'éthanol absolu, puis incubé 12h à -20°C. Les tubes ont été centrifugés 15 minutes à 12000 rpm à 4°C et les surnageants éliminés. Puis les culots ont été additionnés de 500 µL d'éthanol à 70% et centrifugés 15 minutes à 12000 rpm à 4°C avant élimination des surnageants. Les culots d'ADN ont été séchés et conservés à -20°C dans 10 µL d'Eau Déminéralisée Filtrée Autoclavée (EDFA).

La concentration en ADN a été déterminée et ajustée avec de l'EDFA à 100 ng/mL.

8.2.2. Amplification en chaîne de l'ADN (PCR) des lymphocytes T tissulaires

Pour chaque échantillon à amplifier, un mélange réactionnel a été réalisé comme suit :

- 5 µL de tampon de réaction
- 2,5 mM de chlorure de magnésium
- 4 mM de dNTPs
- 2,6 nM d'ADN
- 2µL d'amorce au 20ème
- EDFA q.s.p. 50 µL.

Les cycles suivants sont effectués au Thermocycler Gene Amp® PCR system 9700 :

-pré-dénaturation : 10 minutes à 94°C. Cette étape permet de préparer les cycles d'amplification en dénaturant l'ADN. Puis la température varie selon trois étapes pour chaque cycle :

-dénaturation : 1 minute à 94°C où l'ADN double brin matrice est dénaturé en ADN simple brin par la chaleur, afin de permettre l'appariement des amorces complémentaires.

-appariement des amorces : 1 minute à 56°C permettant la fixation des amorces au niveau des régions complémentaires sur les ADN simples brins matrices.

- élongation : 2 minutes à 72°C, température à laquelle la Taq polymérase a une activité optimale d'élongation des amorces au niveau de leur extrémité 3', en incorporant les dNTPs présents dans le milieu réactionnel. Ce cycle de trois étapes est répété 40 fois.

-extension finale des amplicons : 10 minutes à 72°C afin d'achever la polymérisation.

La Taq polymérase (30 U/mL) est déposée au cycle 1 au moment du passage de la première étape à la seconde car l'étape de 10 minutes à 94°C risquerait de dénaturer l'enzyme.

Les produits de PCR ont été conservés à 4°C.

8.2.3. TTGE/DDGE

8.2.3.1. DGGE :

Le gradient dénaturant a été réalisé à partir du mélange de deux solutions mères :

-une solution mère 80 % dénaturante contenant 16 M d'acrylamide/bis solution, du TAE (2,5X), 340 g/L d'urée ultrapure et 32 % de formamide désionisé.

-une solution mère non dénaturante contenant 16 M d'acrylamide/bis solution et du TAE (2,5X).

Ces deux solutions mères sont utilisées pour obtenir les solutions dénaturantes 10 % et 60 %.

Extemporément, 0,065 % de temed et 0,525 % de persulfate d'ammonium ont été ajoutés aux solutions. Les gels ont été coulés grâce au Gradient Delivery System Model 475 puis polymérisés pendant 12 h à 4°C en présence d'un peigne en position apicale permettant de définir 16 puits-échantillons.

Les dépôts consistaient en 20 µL de produit d'amplification de PCR et 3,2 µL de solution de tampon de charge. Des marqueurs de masse moléculaire Marcel™ ont également été déposés.

Le DCode™ Universal Mutation System a été utilisé pour une migration à 56°C durant 5h30 à 110mV, selon les recommandations du fabricant et selon le protocole du Dr Lenormand (Rouen).

8.2.3.2. TTGE :

Les gels de polyacrylamide simple à 6,5% ont été préparés avec du TAE 1,25% supplémenté avec 0,065 % de temed et 0,525 % de persulfate d'ammonium. Les étapes de polymérisation, de dépôt des échantillons, de migration et de coloration étaient les mêmes que pour la DGGE, et les mêmes témoins et marqueurs de taille ont été utilisés. Le gradient a été constitué par une diminution progressive de la température de migration de 61°C à 51°C pendant 4 heures (2.5 °C/h), ce gradient de température étant effectué par le DCode™ Universal Mutation System (Bio-Rad).

8.2.4. Coloration argentique

Chaque gel a ensuite été retiré des plaques d'électrophorèse et délicatement placé dans un cuve pour les différents bains de la coloration argentique.

Les fragments d'ADN présents dans le gel ont été fixés dans 100 mL d'une solution à 200 g/L d'acide trichloroacétique durant 3 minutes. Les gels ont ensuite été lavés 3 minutes dans une solution contenant 50 % d'éthanol et 10 % d'acide acétique, puis deux fois 5 minutes dans une solution contenant 10% d'éthanol et 5% d'acide acétique (solution 1).

Les gels ont alors été sensibilisés par incubation dans une solution contenant 25 % de glutaraldéhyde pendant 10 minutes et lavés deux fois 5 minutes dans la solution 1, puis deux fois 5 minutes dans de l'eau distillée.

Les colorations proprement dites ont été réalisées par incubation 10 minutes dans 100 mL d'une solution à 5 g/L de nitrate d'argent. Après deux rinçages d'une minute à l'eau distillée, la révélation consistait en une incubation d'un temps variable (jugé à l'œil) dans 100 mL d'une solution de carbonate de sodium 0,016% et de formaldéhyde 750 µL/L. La révélation était arrêtée par incubation 5 minutes dans 100 mL d'une solution d'acide acétique à

5%. Les gels ont ensuite été préservés dans une solution de glycérol 5 % et d'acide acétique 50 %, puis séchés à chaud sous vide par le Drygel jr. pendant 3 heures.

8.2.5. Analyses statistiques

La normalité de la distribution des résultats a été testée par le test de Kolmogorov Smirnov. En l'absence de distribution normale, les résultats ont été exprimés en médianes et analysés par un test de Wilcoxon apparié pour les comparaisons touchant l'identification des clones de cellules T, à l'aide du logiciel GraphPadPrism™.

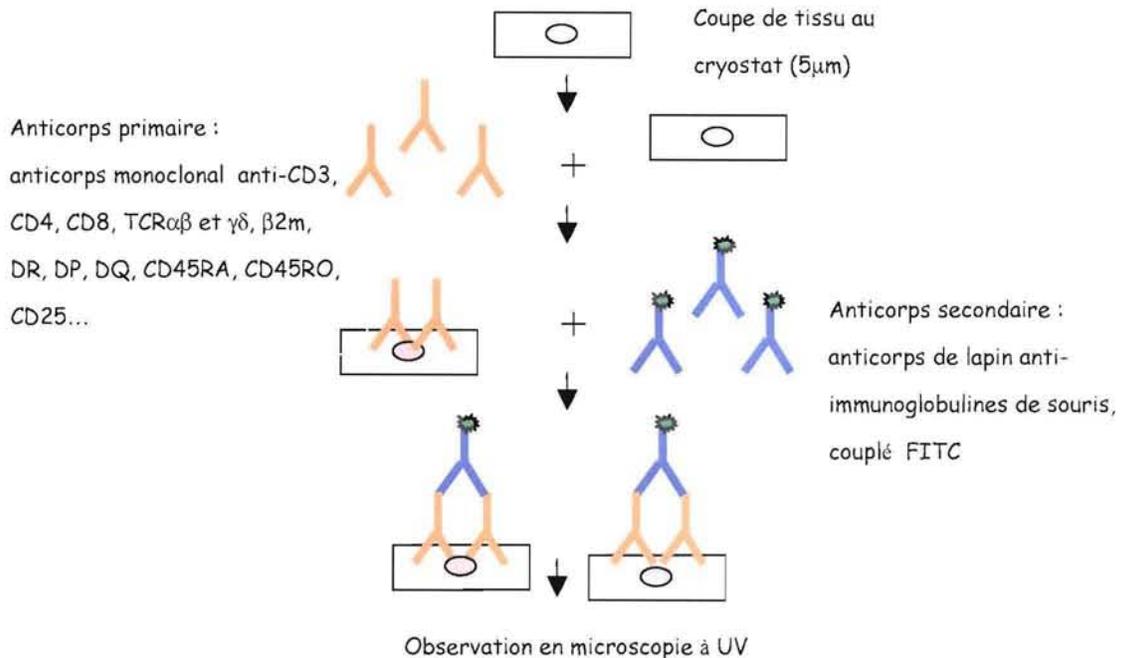
9. Immunofluorescence indirecte sur cryocoupes

9.1. Principe

Les techniques d'immunofluorescence sur coupes de tissu sont des techniques sensibles et spécifiques qui permettent une analyse qualitative et semi-quantitative d'antigènes cellulaires ou tissulaires marqués par un ou plusieurs anticorps couplés à un fluorochrome. Ces techniques présentent l'avantage de renseigner sur la localisation histologique et l'intensité du marquage.

Les anticorps monoclonaux de souris, suivants, dirigés contre des molécules humaines, ont été utilisés : anti-CD3 (UCHT1), anti-CD4 (12T4D11), anti-CD8 (21THY2D3), anti-HLA-DR (B8.12.2) et HLA-DQ (SPVL3), anti-CD45RA (2H4) et anti-CD45RO (UCHL1), anti-TCR α/β (BMA031) et γ/δ (IMMU510), anti-CD25 (ACT-1), RAM (F0261) (Dako), anti- β 2 microglobuline (TÜ99).

Figure 28 **Schématisation des étapes du protocole utilisé pour la technique d'immunofluorescence indirecte sur cryocoupes**



9.2. Méthode

L'immunodétection a été réalisée sur des coupes sériées de tissu congelé de 5µm d'épaisseur préparées à l'aide d'un microtome réfrigéré, ou cryostat, thermostaté à -30°C. Les coupes ont été recueillies sur une lame de verre dégraissée, séchées à l'air et fixées pendant 45 secondes dans un four à micro-ondes. Une coupe a été colorée au bleu de toluidine pendant quelques secondes, puis rincée et examinée pour déterminer la qualité du tissu. Elle a ensuite été réservée à l'étude des caractéristiques morphologiques de chaque prélèvement. Les coupes sériées suivantes ont été marquées par une technique d'immunofluorescence indirecte. Chaque coupe a été délimitée par un anneau hydrophobe de Rhodorsil® et incubée 1h en chambre humide, à température ambiante, dans 50µL de Hank's contenant 5µL d'anticorps monoclonal dilué au tiers.

Les lames ont ensuite été lavées 3 fois 5 minutes dans du PBS et incubées 30 minutes en chambre humide avec 50 µL de solution d'anticorps secondaire de lapin anti-immunoglobulines de souris conjugué au FITC (RAM-FITC).

Les lames ont alors été lavées 3 fois 5 minutes dans du PBS et montées dans une goutte de PBS/Glycérol (7/3) avant examen à l'aide d'un microscope à fluorescence équipé d'une caméra et du logiciel d'analyse d'image Olympus DP70 (Olympus BX60, Tokyo, Japon).

Toutes les lames ont été examinées "en aveugle" c'est à dire sans connaissance au préalable de la nature saine ou tumorale du tissu, ni de l'anticorps monoclonal utilisé, ni des caractéristiques cliniques de chaque patient.

Tous les échantillons ont été documentés numériquement. Pour chaque molécule testée, l'intensité de fluorescence ainsi que le nombre de cellules marquées a été évalué par un score de 0, pour l'absence totale d'expression ou de cellules marquées, à 4 lorsque l'intensité était maximale ou que les cellules marquées étaient particulièrement nombreuses dans l'ensemble du tissu.

9.3. Analyses statistiques

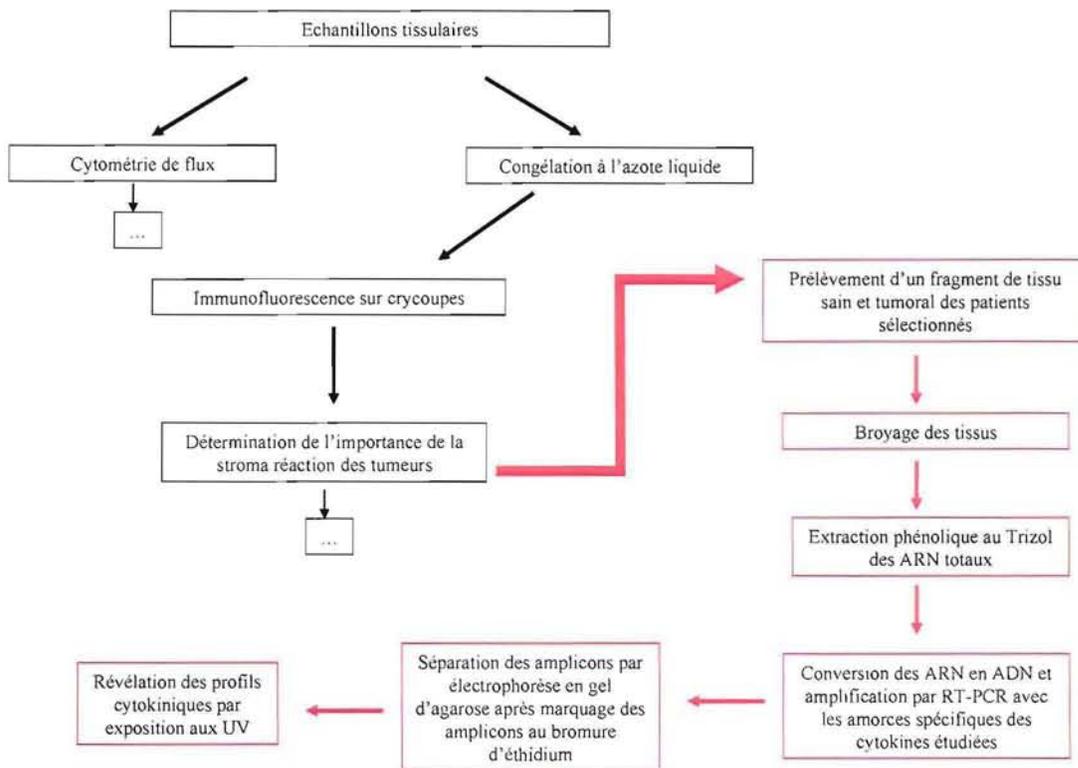
Les résultats ont été testés pour la normalité de leur distribution par le test de Kolmogorov Smirnov. En l'absence de distribution normale, les résultats ont été exprimés en médianes et analysés par un test de Wilcoxon apparié pour les comparaisons touchant les différents tissus ($p \leq 0,05$). Les comparaisons entre différents diagnostics, stades TNM, entre homme et femmes ou en fonction de la consommation tabagique ont été réalisées par le test de Mann-Whitney non apparié ($p \leq 0,05$).

10. Transcription inverse d'ARN et amplification en chaîne de l'ADNc (RT-PCR)

10.1. Principe

Les analyses réalisées en RT-PCR sont résumées dans la Figure 29 .

Figure 29 Schématisation des étapes du protocole d'extraction d'ARN total et d'amplification par RT-PCR de gène de diverses cytokines.



La RT-PCR est une des techniques les plus sensibles permettant la détection et éventuellement la quantification d'ARNm. Il n'est cependant pas nécessaire d'isoler les ARNm des cellules, et la technique se réalise sur ARN total après extraction phénolique. Le dosage des ARN s'effectue au spectrophotomètre (260nm) et la contamination protéique est déterminée en fonction du rapport des DO à 260 et 280 nm. Le rapport pour un ARN "pur" doit être compris entre 1,7 et 2. Il est important de noter que le milieu d'extraction des ARN ainsi que celui de préparation de la RT-PCR doivent être totalement dépourvus de RNases (RNase free) afin d'éviter la dégradation des ARN. Les Eppendorfs ainsi que l'eau utilisés sont donc stériles et préalablement traités avec un inhibiteur de RNases (RNase out™ Ribonuclease inhibitor).

La RT-PCR consiste en la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) de l'ARNm étudié par transcription inverse (RT) suivie d'une amplification de cet ADNc par PCR. Le kit utilisé pour cette technique a été le SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), qui réunit en un seul tube les composants nécessaires à la fois à la synthèse d'ADNc et à la réaction de PCR, qui suit immédiatement la rétroconversion de l'ARN et ne nécessitant pas de manipulation supplémentaire.

La réaction de transcription inverse s'effectue grâce à une ADN polymérase ARN dépendante (version modifiée du rétrovirus de la leucémie murine Moloney dans le kit utilisé) capable d'utiliser un brin d'ARN comme matrice pour catalyser la synthèse du brin d'ADN complémentaire, à partir d'une amorce spécifique de l'ARN d'intérêt. L'enzyme responsable de l'amplification de l'ADNc est l'ADN polymérase Platinum® Taq. Les cytokines étudiées ont été choisies d'après les résultats de la thèse du Docteur Frédéric Massin : « Expression de tétraspanines et d'intégrines $\beta 1$, et immunomodulation dans le cancer du poumon, 2004 ».

Il s'agit des 10 cytokines suivantes: TNF α (Möller, 2001), INF γ (Pravica, 1999), IL-10 (Tripathy, 2004), TGF β (Zhou, 2004), RANTES (Schwabe, 2003), GRO α (Rudack, 2004), MCP-1 (Lee, 2004), ANG (Pavlov, 2003), IL-6 (Franciosi, 2005) et ENA-78 (Rudack, 2004). Les séquences des amorces sont présentées dans le Tableau 7 .

Tableau 7 Séquences des amorces des cytokines utilisées pour la technique de RT-PCR. S : sens, AS : anti-sens.

Cytokine	Sens	Séquence (5'-3')	Tm (°C)
TNF α	S	ACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTA	67
	AS	ATTGATCTCAGCGCTGAGTCGGTCA	
INF γ	S	GCTGTCATAATAATATTCAGAC	53
	AS	CGAGCTTTAAAAGATAGTTCC	
IL-10	S	ACAGCTCACCCTGCTCTGT	56
	AS	AGTTCACATGCGCCTTGATG	
TGF β	S	CATCCAGACTCAGCCAAGA	57
	AS	GAGTTTCCAGGGTCTGTCCA	
RANTES	S	CTACTCGGGAGGCTAAGGCAGGAA	70
	AS	GAGGGGTTGAGACGGCGGAAGC	
GRO α	S	CCCCACTGCGCCCAA	52
	AS	CAAGCTTCCGCCATTCTT	
MCP-1	S	CAGCCAGATGCAATCAATGC	55
	AS	GTGGTCCATGGAATCCTGAA	
ANG	S	CATCATGAGGAGACGGGG	55
	AS	TCCAAGTGGACAGGTAAGCC	
IL-6	S	GTGTGAAAGCAGCAAAGAGGC	58
	AS	CTGGAGGTACTCTAGGTATAC	
IL-8	S	ATGACTTCCAAGCTGGCCGTG	62
	AS	TATGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAA	
ENA-78	S	CCCACAGTGCTCCAAGGT	59
	AS	TCAAGACAAATTCCTTCCCGTTCT	
Contrôle GAPDH	S	ACCACAGTCCATGCCATCAC	54
	AS	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	

Les amplicons obtenus ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 2%, coloré au bromure d'éthidium. Un gel à 2 % permet une séparation efficace de fragments d'ADN entre 100 et 3000 paires de bases. L'ADN est chargé négativement car il contient des groupements PO_4^{3-} , il migre en fonction de sa masse moléculaire, de la borne négative vers la borne positive, sous l'action d'un courant électrique (Figure 30).

Les résultats ont été visualisés grâce à un transilluminateur surmonté d'une caméra (Gel Doc XR system, Bio-Rad,) le tout étant relié à un ordinateur contenant le logiciel d'analyse de gels Quantity One (Bio-Rad).

Un témoin négatif et un témoin positif de RT-PCR ont été systématiquement réalisés. Le témoin négatif consistait en un mélange réactionnel normal de RT-PCR mais dépourvu d'ARN. Le gène de la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été choisi comme contrôle positif car c'est un « gène de ménage » (housekeeping) exprimé dans la plupart des cellules. La GAPDH est une protéine homotétramérique qui catalyse la cinquième étape de la glycolyse en oxydant le groupement aldéhyde du glycéraldéhyde-3-phosphate au niveau d'oxydation d'un groupement carboxyle et réduit le NAD^+ en $NADH, H^+$ (Sambrook, 1989) (Figure 30)

Figure 30 Exemple de résultats obtenus en RT-PCR en utilisant des amorces spécifiques de l'IL-10.

Chaque puits contient les produits d'amplification d'un échantillon tissulaire . Les puits des extrémités droite et gauche contiennent les marqueurs de taille.



10.2. Méthode

10.2.1. Extraction phénolique des ARN

Les Eppendorfs stériles ont été traités 10 minutes avec 1µL de RNase out™ et 1mL d'eau DEPC pendant 10 minutes. Un échantillon tissulaire d'environ 3mm³ a été prélevé sur les échantillons tissulaires conservés à -80°C. Chaque échantillon a été décongelé à température ambiante puis broyé dans un Eppendorf stérile dans 500µL de Trizol. Les échantillons ont été homogénéisés pendant 5 minutes à température ambiante puis 200µL de chloroforme ont été ajoutés. Après agitation des échantillons, ils ont été centrifugés 15 minutes à 1200 tours/minute à 4°C.

Les surnageants ont été prélevés et additionnés de 500µL de propanol, homogénéisés 10 minutes à température ambiante puis les tubes ont été centrifugés 10 minutes à 1200 tours/minute à 4°C.

Après élimination des surnageants, les culots ont été rincés deux fois, additionnés de 200µL d'éthanol 75%, homogénéisés et centrifugés 5 minutes à 7500 tours/minute à 4°C. Après élimination de l'éthanol les échantillons ont été séchés à l'air libre durant 15 minutes.

Les ARN extraits ont ensuite été dissous dans 10µL d'eau DEPC. La concentration des ARN et leur contamination (rapport DO260/DO280) ont été déterminés au spectrophotomètre SmartSpec™ Plus spectrophotometer (Bio-Rad) en diluant pour chaque échantillon 1µL d'ARN avec 49µL d'eau DEPC. La concentration des ARN a ensuite été ajustée à 1µM avec de l'eau DEPC.

10.2.2. RT-PCR de cytokines présentes dans les tissus

Le mix de RT-PCR a été réalisé selon les données du kit SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq :

- 25µL de mix de réaction
- 2µL d'amorce au 20^{ème}
- 1µL d'enzyme

- 2 μ L d'ARN 1 μ M
- 3 μ L de sulfate de magnésium 5mM
- 17 μ L d'eau DEPC

La réaction de RT-PCR a été réalisée selon les étapes suivantes :

30 minutes à 50°C : rétroconversion de l'ARN en ADNc, température à laquelle l'enzyme Moloney a une activité de transcription inverse de l'ARN optimale.

2 minutes à 94°C : pré-dénaturation de l'ADNc.

15 secondes à 94°C : dénaturation de l'ADNc afin de permettre l'appariement des amorces complémentaires.

30 secondes à la T_m des amorces utilisées : appariement des amorces permettant la fixation des amorces au niveau des régions complémentaires sur les ADNc.

1 minute à 72°C : élongation, température à laquelle la Taq polymérase a une activité optimale d'élongation des amorces au niveau de leur extrémité 3', en incorporant les dNTPs présents dans le milieu réactionnel.

Ces trois étapes d'amplification de l'ADN ont été réalisées 35 fois. Afin d'achever la polymérisation, une dernière étape a été réalisée :

7 minutes à 72°C : extension finale des amplicons .

Les amplicons ont été conservés à 4°C.

10.2.3. Electrophorèse en gel d'agarose

Les produits de RT-PCR ont ensuite été soumis à une électrophorèse en gel d'agarose à 2% (90mL de tampon TAE 1X et 1.8g d'agarose). Chaque solution d'agarose a été chauffée 3 minutes au micro-ondes 750W puis 5 μ L de BET ont été incorporés. Après refroidissement à environ 50-60°C les gels ont été coulés dans la cuve d'électrophorèse et laissés à polymériser à température ambiante pendant 20 minutes. Les gels ont ensuite été placés dans la cuve d'électrophorèse et recouverts de TAE 1X. Pour chaque échantillon, 6 μ L de produit de PCR ont

été ajoutés à 6 μ L de tampon de charge et déposés dans un puits du gel d'agarose. Cinq microlitres de marqueurs de taille ont également été déposés dans un des puits. La migration des échantillons a été effectuée pendant une heure à 75V.

10.2.4. Analyses statistiques

Les résultats ont été analysés pour la comparaison d'expression des diverses cytokines entre elles par un test de Khi2 à l'aide du logiciel GraphPadPrism™.

11. Fiches techniques

Fiche technique n°1 :

Préparation de suspensions cellulaires à partir de tissus frais

- ✓ Réactifs
 - Hank's balanced solution (Sigma, St Louis, MO, USA)
 - Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norvège)

- ✓ Matériel
 - Boîte de Petri
 - Ciseaux
 - MediMachine (Dako, Glostrup, Danemark)
 - Medicon (Dako)
 - Seringue à insuline
 - Tubes coniques 30 mL
 - Tubes à fond rond 30 mL
 - Pipettes de 10 mL
 - Pipet Aid
 - Pipettes Pasteur à embout souple
 - Centrifugeuse
 - Compteur de cellules ou cellule de Malassez

- ✓ Technique
 - Découper les tissus en petits fragments dans environ 5 mL de Hank's dans la boîte de Petri, sans laisser le tissu se dessécher
 - Placer les fragments et le milieu dans le Medicon positionné dans la Medimachine
 - Actionner la Medimachine pendant 5 minutes
 - Aspirer la suspension cellulaire avec la seringue à insuline
 - Placer la suspension cellulaire dans un tube à fond conique
 - Complémenter avec le reste du milieu de dissection et du Hank's frais pour obtenir environ 12mL
 - Déposer 10 mL de Ficoll dans un tube à fond rond
 - Déposer délicatement la suspension cellulaire à la surface du Ficoll à la pipette à l'aide du Pipet Aid
 - Centrifuger 20 minutes à température ambiante à 400 g
 - Recueillir immédiatement l'anneau de lymphocytes avec une pipette Pasteur à embout souple et le placer dans un tube à fond conique
 - Additionner 20 mL de Hank's
 - Centrifuger 5 minutes à 600 g
 - Eliminer le surnageant

- Reprendre le culot dans 1 mL de Hank's
- Faire une numération cellulaire et ajuster la suspension en Hank's à 10^6 cellules/mL

Fiche technique N°2

Marquages membranaires en cytométrie de flux

✓ Réactifs

- Cyto-Stat® Tetrachrome® (Beckman-Coulter, Miami, Floride, USA)
- IOTest®Beta Mark TCR Vβ Répertoire Kit (Immunotech, Beckman-Coulter)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) : NaCl 140mM (NORMAPUR®, Prolabo, Paris, France), KCl 2,5mM (Prolabo), KH₂PO₄ 1,8mM (Acros Organics, New-Jersey, USA), Na₂HPO₄·2H₂O 10mM (Merck Eurolab Polylabo, Créteil, France)
- Sérum albumine bovine (BSA) (PAA laboratory GmbH, Pasching, Autriche)
- Bicarbonate (Gibco, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France)
- Paraformaldéhyde (Sigma)

✓ Matériel

- Tubes à hémolyse de 5mL
- Micropipettes
- Centrifugeuse
- Cytomètre de flux (EPICS-XL, Coultronics, Beckman Coulter)

✓ Technique

- Déposer 5 µL de chaque anticorps du IOTest Vβ répertoire kit dans 8 tubes à hémolyse
- Déposer 5 µL de quad dans un tube à hémolyse
- Ajouter 50 µL de suspension cellulaire dans chaque tube contenant 5 µL d'anticorps
- Vortexer chaque tube quelques instants
- Laisser incuber 30 minutes au frigo
- Déposer 1 mL de liquide de rinçage (PBS-BSA (2 %)-bicarbonate qsp pH 7,2) dans chaque tube
- Centrifuger 5 minutes à 600 g
- Eliminer le surnageant
- Additionner 50 µL de PAF par tube
- Lecture au cytomètre de flux

Fiche technique n°3 :
Digestion à la protéinase K

- ✓ Réactifs
 - Protéinase K (Merck Eurolab Polylabo, Créteil, France)
 - Tampon STE (Saline-TRIS-EDTA ; NaCl 0,2 mM ; (NORMAPUR®, Prolabo, Paris, France), Tris-HCl pH 8,0 10 µM (Merck), EDTA 0,2 µM (TITRIPLEX ® III, Merck))
 - SDS (RECTAPUR®, Prolabo)

- ✓ Matériel
 - Broyeur de tissus : Piston Pellet (Merck)
 - Tubes Eppendorfs de 1,5mL
 - Micropipettes
 - Incubateur

- ✓ Technique
 - Prélever un fragment de tissu congelé pour chaque échantillon dans des Eppendorfs
 - Ajouter 300 µL de tampon STE
 - Broyer les échantillons à l'aide de broyeurs Piston Pellet
 - Additionner 600 µL de tampon STE
 - Ajouter 5 µL de protéinase K à 20mg/mL
 - Ainsi que 50 µL de SDS 10%
 - Placer les Eppendorfs fermés dans l'incubateur thermostaté à 56°C pendant 12h
 - Refroidir doucement les Eppendorfs jusque 4°C

Fiche technique n°4 : Extraction phénolique de l'ADN

- ✓ Réactifs
 - Aquaphénol (APPLIGENE[®], Prolabo)
 - Ready Red (APPLIGENE[®], Prolabo)
 - Acétate de sodium 3M (Merck)
 - Ethanol absolu (Merck)
 - Eau Déminéralisée, Filtrée (Nalgene Sybron, Rochester, NY, USA)

- ✓ Matériel
 - Autoclave (Mediclav Osi, Maurepas, France)
 - Tubes Eppendorfs de 1,5mL
 - Micropipettes
 - Centrifugeuse
 - Spectrophotomètre : Beckman DU[®]640 (Beckman Instruments[®], Gagny, France)

- ✓ Technique
 - Autoclaver un nombre suffisant d'Eppendorfs
 - Déposer 1 volume de produit de digestion
 - Ajouter 1 volume de tampon phénol (aquaphénol et Ready Red v/v)
 - Homogénéiser doucement par retournements successifs
 - Centrifuger 5 minutes à 3000 tours/min à 4°C
 - Aspirer délicatement le surnageant aqueux à l'aide d'une micropipette
 - Eliminer le phénol dans un bidon spécifique prévu à cet effet
 - Répéter ces étapes d'extraction une fois au minimum
 - Ajouter à chaque extrait 0.1 volume d'acétate d'ammonium 3M
 - Additionner 2 volumes d'éthanol absolu
 - Homogénéiser à l'aide d'une micropipette
 - Laisser incuber 12h à -20°C
 - Centrifuger 15 minutes à 12000 tours/min à 4°C
 - Eliminer doucement le surnageant à l'aide d'une micropipette en laissant l'ADN adhérer aux parois
 - Reprendre le culot dans 500 µL d'éthanol à 70%
 - Centrifuger 15 minutes à 12000 tours/min à 4°C
 - Eliminer doucement le surnageant à l'aide d'une micropipette en laissant l'ADN adhérer aux parois
 - Laisser sécher à l'air libre
 - Reprendre le culot dans 10 µL d'eau déminéralisée, filtrée, autoclavée (EDFA)
 - Prélever 1µL d'extrait d'ADN à l'aide d'une micropipette dans une cuve du spectrophotomètre
 - Diluer dans 49 µL d'EDFA
 - Déterminer la concentration et la pureté de l'ADN par la lecture de la DO 260nm et 280nm au spectrophotomètre

Fiche technique n°5 :
PCR

✓ Réactifs

- Eau Déminéralisée, Filtrée (Nalgene Sybron, Rochester, NY, USA)
- 8 amorces supplémentées d'un GC clamp (Genset Oligos, Paris, France)
- dNTPs (Master Mix, Eurogentec, Liège, Belgique)
- Kit PCR Goldstar Red™ (Eurogentec)
- Contrôles de DGGE : DCode™ control reagent kit for DGGE, CDGE, TTGE (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

✓ Matériel

- Autoclave (Mediclav Osi, Maurepas, France)
- Tubes Eppendorfs de 0,2mL
- Micropipettes
- Centrifugeuse
- Thermocycler Gene Amp® PCR system 9700 (Perkin Elmer Biosystems, Courtaboeuf, France)

✓ Technique

- Autoclaver un nombre suffisant d'Eppendorfs
- Réaliser pour chaque extrait d'ADN le mélange réactionnel suivant :
 - 5 µL de tampon de réaction
 - 2,5 mM de chlorure de magnésium
 - 4 mM de dNTPs
 - 2,6 nM d'ADN
 - 2µL d'amorce au 20^{ème}
 - 0,5 µL de Taq polymerase (30 U/mL)
 - EDFA q.s.p. 50 µL.
- Réaliser les cycles suivants au thermocycler
 - 10 minutes à 94°C
 - 1 minutes à 94°C
 - 1 minute à 56°C 40 cycles
 - 2 minutes à 72°C
 - 10 minutes à 72°C
- Conserver les produits de PCR à 4°C

Fiche technique n° : 6 :
DGGE

✓ Réactifs

- Ethanol
- Acrylamide/bis solution (Bio-Rad)
- Tampon TAE 10X (Tris acide acétique EDTA) (Bio-Rad)
- Urée ultrapure (Normapur®, Prolabo)
- Formamide désionisé (Normapur®, Prolabo)
- Eau distillée
- Temed (Bio-Rad)
- Persulfate d'ammonium (Merck)
- Marqueurs de taille : Marcel™ (APPLIGENE®, Prolabo)
- Tampon de charge : 0,25 % de bleu de bromophénol (RAL Kulhmann, Paris France), 0,25 % de xylène cyanol (Sigma, Saint Louis, MO, USA) et 40 % de saccharose (Sigma)

✓ Matériel

- Bêchers de 50 mL
- Éprouvettes
- Micropipettes
- Seringues de 20 mL
- Plaques d'électrophorèse Glass Plate, Outer et Glass Plate, Inner ; 16 cm² (Bio-Rad)
- Gradient Delivery System Model 475 (Bio-Rad)
- DCode™ Universal Mutation System (Bio-Rad)

✓ Technique

- Nettoyer soigneusement les plaques d'électrophorèse à l'éthanol
- Assembler les plaques
- Préparer 250 mL de solution mère à 80% d'agents dénaturants :
 - 40 ml d'acrylamide
 - 80 ml de formamide désionisé
 - 85 g d'urée ultrapure
 - 12.5 ml TAE 1X
 - qsp 250 ml d'eau distillée
- Préparer 250 mL de solution mère à 0% d'agents dénaturants :
 - 40 ml d'acrylamide
 - 12.5 ml de TAE 1X
 - qsp 250 ml d'eau distillée
- Préparer 200 mL de solution dénaturante à 60%
 - 150 ml de solution mère à 80 %
 - 50 ml de solution mère à 0 %
- Préparer 200 mL de solution dénaturante à 10%

- 25 ml de solution mère à 80 %
- 175 ml de solution mère à 0 %
- Ajouter 13 μL de temed et 105 μL de persulfate d'ammonium (1g/10mL) à 20 mL de solution à 60%
- Ajouter 13 μL de temed et 105 μL de persulfate d'ammonium (1g/10mL) à 20 mL de solution à 10%
- Prélever avec une seringue 20 mL de solution à 60% et dans une autre 20 mL de solution à 10%
- Couler le gel à l'aide de ces deux seringues et du Gradient Delivery System
- Laisser polymériser 12h à 4°C
- Remplir la cuve d'électrophorèse avec 7.5 litres de TAE 1X et y placer les gels
- Chauffer la cuve à 56°C
- Arrêter la pompe
- Retirer les peignes
- Dans des Eppendorfs mélanger 20 μL de produits de PCR et 3.2 μL de tampon de charge
- Vortexer
- Déposer 20 μL de chaque échantillon dans les puits du gel
- Déposer 1 μL de marqueur de taille dans un des puits
- Remettre la pompe en marche
- Faire migrer pendant 5h30 à 110V à 56°C avec le DCode™ Universal Mutation System

Fiche technique n°7 :
TTGE

✓ Réactifs

- Ethanol
- Acrylamide/bis solution (Bio-Rad)
- Tampon TAE 10X (Tris acide acétique EDTA) (Bio-Rad)
- Urée ultrapure (Normapur®, Prolabo)
- Formamide désionisé (Normapur®, Prolabo)
- Eau distillée
- Temed (Bio-Rad)
- Persulfate d'ammonium (Merck)
- Marqueurs de taille : Marcel™ (APPLIGENE®, Prolabo)
- Tampon de charge : 0,25 % de bleu de bromophénol (RAL Kulhmann, Paris France), 0,25 % de xylène cyanol (Sigma, Saint Louis, MO, USA) et 40 % de saccharose (Sigma)

✓ Matériel

- Bêchers de 50 mL
- Éprouvettes
- Micropipettes
- Seringues de 20 mL
- Plaques d'électrophorèse Glass Plate, Outer et Glass Plate, Inner ; 16 cm² (Bio-Rad)
- Gradient Delivery System Model 475 (Bio-Rad)
- Eppendorfs 0,2 mL
- DCode™ Universal Mutation System (Bio-Rad)

✓ Technique

- Nettoyer soigneusement les plaques d'électrophorèse à l'éthanol
- Assembler les plaques
- Préparer 500 mL de solution d'acrylamide à l'abri de la lumière à 4°C
- 75 ml acrylamide 40 %
- 180 g d'urée ultrapure
- 12.5 ml TAE 50X
- qsp 500 ml d'eau
- Ajouter 26 µL de temed et 210µL de persulfate d'ammonium (1g/10mL) à 40 mL de solution
- Couler le gel à l'aide des seringues et du Gradient Delivery System
- Laisser polymériser 12h à 4°C
- Remplir la cuve d'électrophorèse avec 7.5 litres de TAE 1X et placer les gels
- Chauffer à 61°C
- Arrêter la pompe

- Retirer les peignes
- Dans des Eppendorfs mélanger 20 μL de produits de PCR et 3.2 μL de tampon de charge
- 1 μL Marcel™
- Déposer 20 μL de chaque échantillon dans les puits du gel
- Déposer 1 μL de marqueur de taille dans un des puits
- Remettre la pompe en marche
- Programmer le gradient de température à 2,5°C par heure
- Faire migrer pendant 4h à 110V avec le DCode™ Universal Mutation System

Fiche technique n°8 :
Coloration argentique

✓ Réactifs

- Acide trichloroacétique (Prolabo)
- Acide acétique (Merck)
- Glutaraldéhyde (Sigma)
- Nitrate d'argent (Prolabo)
- Carbonate de sodium (Normapur®, Prolabo)
- Formaldéhyde (Sigma)
- Glycérol (Prolabo)

✓ Matériel

- Grandes cuves en verre
- Eprouvettes
- Micropipettes
- Drygel jr. (Hoefer Scientific Instrument, Pharmacia, Uppsala, Suède)

✓ Technique

- Baigner le gel de DGGE/TTGE dans 100 mL d'une solution à 200 g/L d'acide trichloroacétique pendant 3 minutes
- Laver le gel 3 minutes dans une solution contenant 50 % d'éthanol et 10 % d'acide acétique
- Laver deux fois 5 minutes dans une solution contenant 10% d'éthanol et 5% d'acide acétique (solution 1)
- Incuber 10 minutes les gels dans une solution de glutaraldéhyde à 25 %
- Lavés deux fois 5 minutes dans la solution 1
- Laver deux fois 5 minutes à l'eau distillée
- Incuber les gels 10 minutes dans 100 mL d'une solution de nitrate d'argent à 5 g/L
- Laver deux fois une minute à l'eau distillée
- Incuber dans 100 mL d'une solution de carbonate de sodium 0,016% et de formaldéhyde 750 µL/L durant un temps jugé à l'œil
- Arrêter la révélation par incubation 5 minutes dans 100 mL d'une solution d'acide acétique à 5%
- Sécher 3 heures le gel à chaud sous vide à l'aide du Drygel jr

Fiche technique n°9 :
Immunofluorescence indirecte sur cryocoupes

✓ Réactifs

- Bleu de toluidine (Sigma, Saint Louis, MO, USA)
- Rhodorsil® (Rhodia Chem, Caronno Pertusella, Italie)
- Hank's balanced solution (Sigma)
- Anticorps monoclonaux (description dans le chapitre 8.1)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) : NaCl 140mM (NORMAPUR®, Prolabo, Paris, France), KCl 2,5mM (Prolabo), KH₂PO₄ 1,8mM (Acros Organics, New-Jersey, USA), Na₂HPO₄·2H₂O 10mM (Merck Eurolab Polylabo, Créteil, France)
- Anticorps secondaire : anticorps polyclonal de lapin anti-immunoglobulines de souris conjugué au FITC (RAM-FITC) (Dako, Glostrup, Danemark)
- Glycérol (Prolabo)

✓ Matériel

- Cryostat (Jung CM 1800, Leica, Nussloch, Allemagne)
- Four à micro-ondes
- Coton-tige
- Chambre humide
- Microscope à fluorescence (Olympus BX60, Tokyo, Japon)
- Logiciel d'analyse d'image Olympus (DP70 Manager)

✓ Technique

- Réaliser des coupes sériées de tissu congelé de 5µm d'épaisseur au cryostat
- Recueillir chaque coupe sur une lame de verre dégraissée
- Séchage à l'air
- Fixer 45 secondes dans un four à micro-ondes
- Coloration d'une coupe au bleu de toluidine
- La rincer à l'eau et la réserver pour analyse en microscopie optique
- Délimiter au coton-tige les coupes sériées suivantes par un anneau de Rhodorsil®
- Déposer 50µL de Hank's sur chaque coupe
- Y insérer 5µL d'anticorps monoclonal dilué au tiers
- Incuber 1h en chambre humide à température ambiante
- Laver 3 fois 5 minutes dans du PBS
- Déposer 50 µL de RAM-FITC sur chaque coupe
- Incuber 30 minutes en chambre humide
- Laver 3 fois 5 minutes dans du PBS
- Ajouter une goutte de PBS/Glycérol (7/3)
- Examen au microscope à fluorescence équipé d'une caméra et du logiciel d'analyse d'image Olympus DP70

Fiche technique n°10 :
Extraction phénolique d'ARN

✓ Réactifs

- Inhibiteur de RNase : RNase out™ Ribonuclease inhibitor (Invitrogen, Cergy Pontoise, France)
- Eau DEPC (Invitrogen)
- Trizol® (Invitrogen)
- Chloroforme (R.P. Normapur®, Prolabo, Paris, France)
- Propanol (Rectapur®, Prolabo)
- Ethanol 96° (Sigma, Saint Louis, MO, USA)

✓ Matériel

- Eppendorfs 1,5 mL
- Autoclave (Mediclav Osi, Maurepas, France)
- Micropipettes
- Broyeur de tissus : Piston Pellet (Merck)
- Centrifugeuse
- Spectrophotomètre : SmartSpec™ Plus spectrophotometer (Bio-Rad)

✓ Technique

- Autoclaver les Eppendorfs
- Incuber les Eppendorfs 10 minutes avec 1µL de RNase out™ et 1mL d'eau DEPC
- Décongeler les échantillons à température ambiante
- Broyer les tissus en Eppendorf stérile dans 500µL de Trizol
- Homogénéiser à température ambiante
- Ajouter 200µL de chloroforme
- Agiter et centrifuger 15 minutes à 1200 tours/minute à 4°C
- Prélever les surnageants
- Ajouter 500µL de propanol
- Homogénéiser 10 minutes à température ambiante
- Centrifuger 10 minutes à 1200 tours/minute à 4°C
- Eliminer les surnageants
- Rincer les culots 2 fois par ajout de 200µL d'éthanol à 75%
- Homogénéiser et centrifuger 5 minutes à 7500 tours/minute à 4°C
- Eliminer l'éthanol à l'aide d'une micropipette
- Sécher à l'air libre 15 minutes
- Homogénéiser dans 10µL d'eau DEPC
- Déterminer le rapport DO260/DO280 au spectrophotomètre SmartSpec™ Plus (1µL d'ARN, 49µL d'eau DEPC)
- Ajuster la concentration à 1µM avec de l'eau DEPC

Fiche technique n°11 :
RT-PCR

✓ Réactifs

- Inhibiteur de RNase : RNase out™ Ribonuclease inhibitor (Invitrogen, Cergy Pontoise, France)
- Eau DEPC (Invitrogen)
- SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen)
- Amorces : easy oligos (Proligo, Boulder, CO, USA)

✓ Matériel

- Autoclave (Mediclav Osi, Maurepas, France)
- Eppendorfs 0,2 mL
- Micropipettes
- Thermocycler Gene Amp® PCR system 9700 (Perkin Elmer Biosystems, Courtaboeuf, France)

✓ Technique

- Autoclaver les Eppendorfs
- Incuber les Eppendorfs 10 minutes avec 1µL de RNase out™ et 1mL d'eau DEPC
- Réaliser pour chaque extrait d'ARN le mix de RT-PCR suivant
 - 25µL de mix de réaction
 - 2µL d'amorce au 20ème
 - 1µL d'enzyme
 - 2µL d'ARN 1µM
 - 3µL de sulfate de magnésium 5mM
 - 17µL d'eau DEPC
- Réaliser les cycles suivants au thermocycler
 - 30 min à 50°C
 - 2 min à 94°C
 - 15 sec à 94°C
 - 30 sec à la T_m 35 cycles
 - 1 min à 72°C
 - 7 min à 72°C.
- Conserver les produits de RT-PCR à 4°C

Fiche technique n°12 :
Électrophorèse en gel d'agarose

✓ Réactifs

- Agarose electrophoresis grade (Invitrogen)
- Bromure d'éthidium (Bio-Rad, Hercules, CA)
- Tampon TAE 10X (Tris acide acétique EDTA) (Bio-Rad)
- Tampon de charge : 10X BlueJuice™ gel loading buffer (Invitrogen)
- Marqueurs de taille : Jules™ Ready-to-use (Qbiogen, Irvine, CA, USA)

✓ Matériel

- Eppendorfs 0,2 mL
- Epprouvettes
- Erleinmeyer
- Four à micro-ondes
- Micropipettes
- Générateur : power pac 3000 (Bio Rad)
- Cuve d'électrophorèse : Sub-cell® GT agarose gel electrophoresis systems (Bio-Rad)
- Gel Doc XR system (Bio-Rad)
- Logiciel Quantity One (Bio-Rad)

✓ Technique

- Peser 1.8g d'agarose
- Dissoudre dans 90mL de tampon TAE 1X, dans un erlenmeyer
- Chauffer 3 minutes au four à micro-ondes 750W
- Incorporer 5µL de BET
- Laisser refroidir à 50-60°C
- Couler le gel dans la cuve d'électrophorèse
- Laisser polymériser 20 minutes à température ambiante
- Recouvrir les gels par du TAE 1X
- Dans des Eppendorfs de 0,2 mL mélanger 6µL de produit de RT-PCR et 6µL de tampon de charge
- Déposer les échantillons dans les puits
- Déposer 5µL de marqueurs de taille dans un puit
- Faire migrer une heure à 75V
- Révéler à l'aide du Gel Doc XR system équipé du Logiciel Quantity One

Résultats

12. Sous populations T et répertoire V-beta

Les tissus sains et tumoraux de 62 patients ont été analysés, mais seuls 27 tissus ganglionnaires étaient suffisamment volumineux pour permettre une analyse en cytométrie de flux.

Les échantillons sanguins de onze patients ont été analysés en cytométrie de flux.

12.1. Caractérisation des lymphocytes T

12.1.1. Immunophénotypage des lymphocytes T des différents tissus en quadruple marquage

L'immunophénotypage en quadruple marquage montrait un nombre de cellules portant CD3 inférieur dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains et ganglionnaires (moyenne : 58% \pm 19 sain, 48% \pm 21 tumeur, 60% \pm 17 ganglion). De plus, la moyenne des MFI de CD3, CD4 et CD8 était significativement supérieure dans les tissus sains par rapport aux tumeurs ($p < 0,0001$). La moyenne du MFI de CD3 était également significativement supérieure dans les ganglions par rapport aux tumeurs ($p = 0,016$) (Tableau 8).

Dans les ganglions, comme l'on pouvait s'y attendre, les cellules T CD4+ (moyenne : 26,5% \pm 16) étaient les plus abondantes avec un ratio moyen CD4/CD8 de 4 \pm 1,6. Cet index d'immunorégulation était significativement inversé dans les tissus pulmonaires. En effet, les cellules T CD8+ constituaient la population cellulaire la plus représentée à la fois dans les tissus sains (moyenne : 22% \pm 18) avec un ratio moyen CD4/CD8 de 0,88 \pm 0,17, ($p < 0,001$ par rapport aux ganglions) et dans les tumeurs (moyenne : 22% \pm 15) avec un ratio moyen CD4/CD8 de 0,58 \pm 0,07, ($p < 0,001$ par rapport aux ganglions).

Tableau 8 Moyennes des pics d'intensité de fluorescence des molécules CD3, CD4 et CD8 dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires.

★ : significativement différent

	MFI CD3	MFI CD4	MFI CD8
Tissus sains	0.59 ± 0.21 ★	0.47 ± 0.14 ★	0.48 ± 0.18 ★
Tumeurs	0.47 ± 0.18 ★	0.36 ± 0.10	0.43 ± 0.15
Ganglions	0.58 ± 0.22	0.39 ± 0.15	0.37 ± 0.12

12.1.2. Immunophénotypage des lymphocytes T des différents tissus après culture organotypique courte en milieu non tumoral

L'immunophénotypage en quadruple marquage après culture organotypique en milieu non tumoral ne montrait pas de variation significative du nombre de cellules T CD3+. En revanche l'expression de CD4 était significativement augmentée sur les lymphocytes extraits des ganglions après culture passant de 26,5% à 41,5% de cellules marquées (p=0,004). De même, l'expression de CD8 étaient significativement supérieure parmi les lymphocytes extraits des tumeurs après culture en milieu non tumoral passant de 22% à 28% de cellules marquées (p=0,04 tumeur). En revanche, parmi les lymphocytes des ganglions, CD8 était initialement présent sur 21,5% des cellules et cette population était significativement diminuée après culture en milieu non tumoral (15,6%, p=0,02) (Figure 31).

L'étude comparée de l'immunophénotypage des lymphocytes T avant et après culture en milieu non tumoral, patient par patient, a révélé une augmentation significative du nombre de cellules extraites des tumeurs et exprimant CD8+ après culture (p=0,04). L'analyse de la moyenne des MFI comparée patient par patient montrait une augmentation significative pour les cellules CD3 (p=0,047), CD4 (p=0,014) et CD8 (p=0,005) éluées des tissus sains après culture organotypique courte en milieu non tumoral. Pour les lymphocytes élués des tumeurs, la moyenne des MFI de CD4 était significativement augmentée après culture organotypique en milieu non tumoral (p=0,04). Enfin, la moyenne des MFI de CD3 et de CD4 était

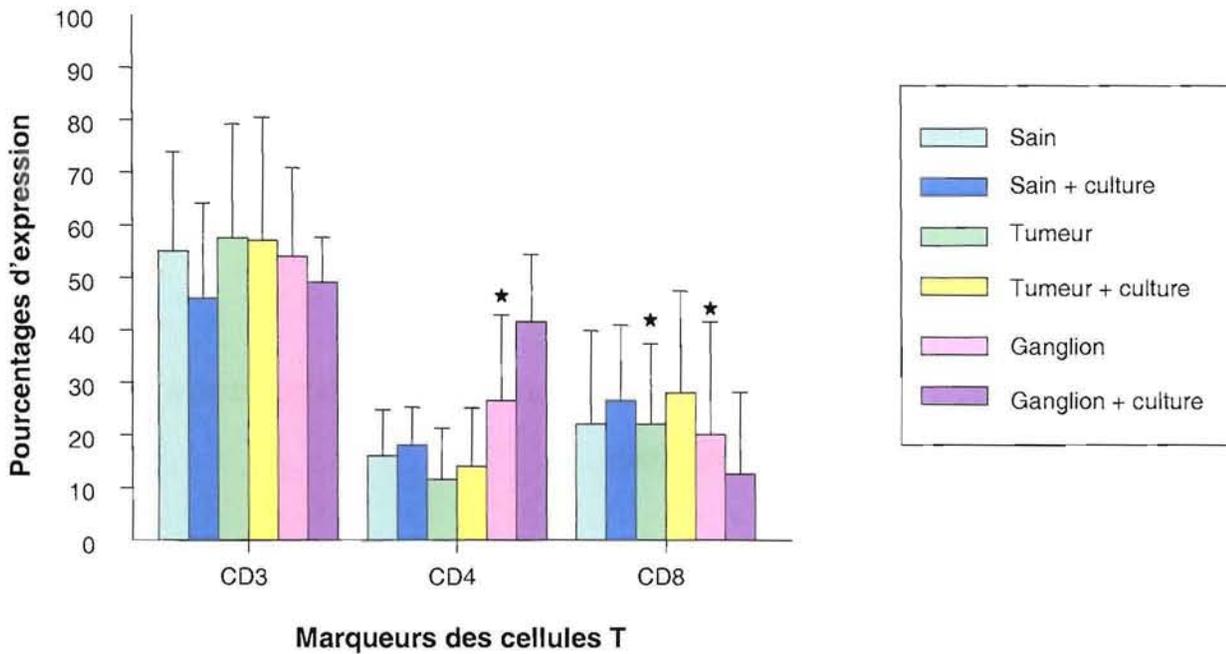
significativement augmentée pour les lymphocytes élués des ganglions après culture ($p=0,01$; $p=0,03$) (Tableau 9).

Tableau 9 Moyennes comparées des MFI des molécules CD3, CD4 et CD8 dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires avant et après culture organotypique courte en milieu non tumoral.

		MFI CD3	MFI CD4	MFI CD8
Tissus sains	Avant	0.59 ± 0.21	0.47 ± 0.14	0.48 ± 0.18
	Après	0.76 ± 0.13 ★	0.54 ± 0.09 ★	0.64 ± 0.21 ★
Tumeurs	Avant	0.47 ± 0.18	0.36 ± 0.10	0.43 ± 0.15
	Après	0.54 ± 0.21	0.44 ± 0.15 ★	0.44 ± 0.19
Ganglions	Avant	0.58 ± 0.22	0.39 ± 0.15	0.37 ± 0.12
	Après	0.84 ± 0.06 ★	0.61 ± 0.07 ★	0.53 ± 0.09

Figure 31 **Comparaison des pourcentages de cellules T et des sous populations CD4 et CD8 avant et après culture organotypique courte en milieu non tumoral.**

★ : différence significative de la proportion de cellules marquées.



12.1.3. Immunophénotypage de lymphocytes T des échantillons sanguins

L'immunophénotypage en quadruple marquage des lymphocytes T sanguins montrait des pourcentages moyens de lymphocytes T CD3+ abaissés par rapport aux valeurs normales : $64\% \pm 17$ chez les patients pour $75\% \pm 5$ dans le laboratoire. Il existait également une diminution des taux de cellules CD4+ qui ne représentaient que $28\% \pm 7$ des lymphocytes (contre $50\% \pm 5$) et des cellules CD8+ dont le pourcentage moyen est de $18 \pm 11\%$ des

lymphocytes (contre $25\% \pm 5$) du sang périphérique. Le ratio moyen de cellules T CD4/CD8 était de $2,2 \pm 1,25$.

La moyenne des MFI de CD3 était de $1,67 \pm 1,11$, celle de CD4 de $1,29 \pm 0,74$ et celle de CD8 de $1,09 \pm 0,77$. Les moyennes des MFI de CD3 ($p < 0,0001$), CD4 ($p < 0,0001$) et CD8 ($p = 0,006$ pour les tissus sains et $p = 0,0002$ pour les tumeurs) des échantillons sanguins étaient significativement supérieures à celle des tissus sains et tumoraux.

12.2. Caractérisation du répertoire V β du TCR

Les proportions de cellules T exprimant chacune des chaînes V β du TCR sont faibles, c'est pourquoi il a été considéré qu'un pourcentage supérieur à cinq représentait un petit clone dans le tissu testé.

12.2.1. Caractérisation de l'utilisation du répertoire V β du TCR dans les différents tissus

12.2.1.1. Caractérisation du répertoire V β du TCR dans les tissus sains

La moyenne de la taille des clones mis en évidence était de $11,9\% \pm 8,7$ des lymphocytes tissulaires (range : de 5% à 54%). Le segment V de la chaîne β du TCR le plus fréquemment exprimé dans les tissus sains était le V β 14 avec la mise en évidence de clones dans 24 des 44 tissus sains étudiés (55%).

Des clones de lymphocytes T portant les segments du TCR V β 3 (22 patients), V β 8 (20 patients), V β 20 (21 patients) et V β 21.3 (21 patients) étaient également très fréquents dans les tissus sains.

Les clones V β 7.2 (16 patients), V β 12 (19 patients) et V β 16 (18 patients) étaient également bien représentés.

Les autres segments V des chaînes β du TCR étaient peu exprimés par les lymphocytes des tissus sains (Figure 32).

12.2.1.2. Caractérisation du répertoire V β du TCR dans les tumeurs

Le segment V de la chaîne β du TCR le plus fréquemment exprimé dans les tissus tumoraux était le V β 14 avec la mise en évidence de 37 clones parmi les 44 tumeurs étudiées (84%).

Les clones de lymphocytes T portant les chaînes β du TCR V β 3 (28 patients), V β 20 (32 patients) et V β 21.3 (patients) étaient très fréquents dans les tumeurs.

Les clones V β 7.2 (19 patients), V β 8 (26 patients), V β 12 (26 patients) et V β 16 (25 patients) étaient également bien représentés.

Les autres segments V des chaînes β du TCR étaient peu exprimées dans les tissus tumoraux (Figure 32).

12.2.1.3. Caractérisation du répertoire V β du TCR dans les ganglions

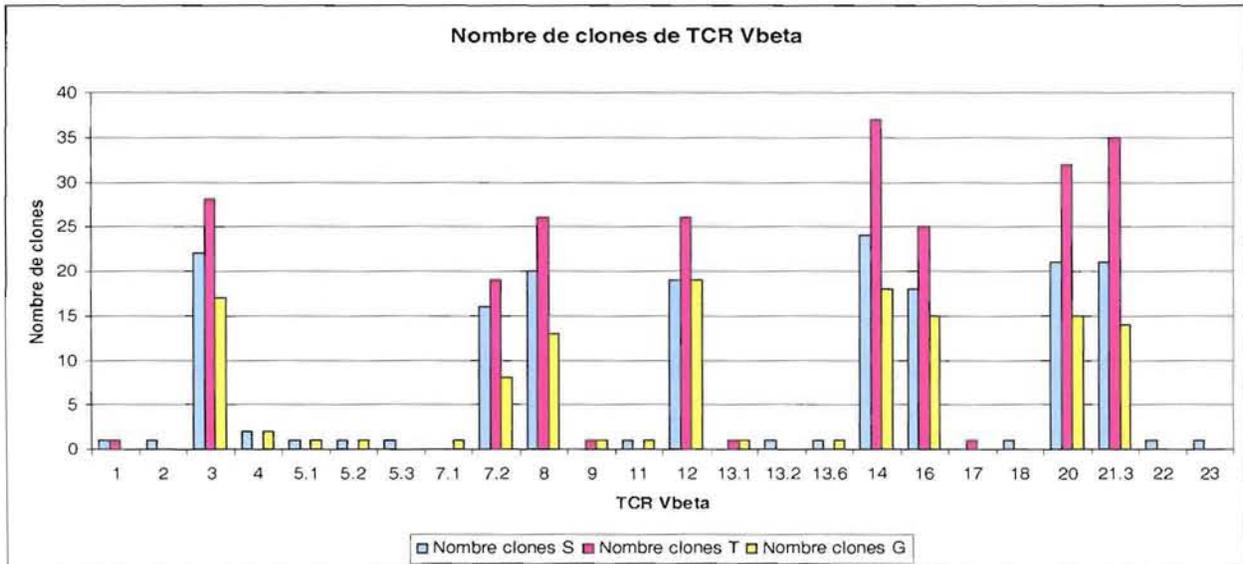
Le segment V de la chaîne β du TCR le plus fréquemment exprimé dans les tissus ganglionnaires était le V β 14 avec la mise en évidence de 18 clones parmi les 27 ganglions étudiés (41%).

Les clones de lymphocytes T portant les chaînes β du TCR V β 3 (17 patients), V β 12 (19 patients), V β 16 (15 patients) et V β 20 (15 patients) étaient fréquents dans les ganglions intrapulmonaires.

Les clones V β 7.2 (8 patients), V β 8 (13 patients) et V β 21.3 (35 patients) étaient également représentés.

Les autres segments V des chaînes β du TCR étaient peu exprimés dans l'ensemble des ganglions (Figure 32).

Figure 32 **Nombre de patients présentant des clones utilisant chaque V β du TCR dans les tissus sains tumoraux et ganglionnaires.**



12.2.2. Comparaison de l'utilisation du répertoire V β du TCR dans les différents compartiments étudiés

12.2.2.1. Utilisation comparée du répertoire V β du TCR en fonction du type de tissu

La chaîne V β 14 était la plus représentée avec 55 % de clones tous types de tissus confondus. Les clones V β 3(47,8 %), V β 12 (47,7 %), V β 21.3 (47,3 %), V β 20 (46,9 %), V β 16 (41,6 %), V β 8 (40,7 %), V β 7.2 (28,6 %) étaient également bien représentés. Pour l'ensemble de ces sept chaînes, le nombre de clones présents était supérieur dans les tumeurs par rapport aux autres tissus. De même le nombre de clones exprimant ces chaînes était supérieur dans les tissus sains par rapport aux ganglions.

Lorsque l'on s'est intéressé aux pourcentages d'expression globale de chaque chaîne V β du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires, il est apparu des différences d'expression en fonction du tissu. Ainsi :

✓ dans les tissus sains, aucune chaîne V β du TCR n'était plus exprimée, en médiane de pourcentage d'expression, que dans les tumeurs ou les ganglions.

✓ dans les tumeurs, la chaîne V β 21.3 (p=0,08) était plus exprimée (6% d'expression) que dans les ganglions (5% d'expression). En revanche, plusieurs chaînes V β du TCR étaient significativement plus exprimées dans la tumeur que dans le tissu sain, ce sont les chaînes V β 3 (p=0,04), V β 12 (p=0,008), V β 14 (p=0,03), V β 16 (p=0,01), V β 20 (p=0,006) et V β 21.3 (p=0,002).

✓ dans les ganglions, les chaînes V β 8 (p=0,009 avec la tumeur), V β 12 (p=0,05), V β 14 (p=0,009), V β 16 (p=0,08) et V β 21.3 (p=0,08) étaient significativement plus fréquemment exprimées que dans les tissus sains et les tumeurs (Tableau 10).

Tableau 10 Médiannes des pourcentages d'expression des segments V des chaînes V β du TCR les plus fréquents, dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires.

V β Tissu	Sain	Tumeur	Ganglion
3	2	4	5
7.2	1,5	2	2
8	2	2	4
12	2	4	6
14	3	5	8
16	2	3	5
20	2,5	5	5
21.3	2,5	6	5

Lorsqu'un clone était présent dans le tissu tumoral, il était souvent également présent dans le tissu ganglionnaire du même patient. En effet, pour le TCR V β 14, sur 18 patients présentant un clone ganglionnaire exprimant cette chaîne, 16 en avaient également un dans le tissu tumoral. Pour les chaînes utilisant V β 7.2, V β 8, V β 16 et V β 20 tous les patients présentaient des clones à la fois dans le ganglion et dans la tumeur. Les clones les moins retrouvés à la fois dans le ganglion et la tumeur d'un même patient étaient ceux utilisant les segments V β 3 et V β 12 avec tout de même respectivement 68% et 76% de co-expression (Tableau 11).

Les clones présents dans la tumeur d'un patient donné étaient beaucoup moins fréquemment également présents dans le tissu sain du même patient. Les clones les plus fréquemment exprimés dans ces deux tissus pour un même patient étaient ceux utilisant les chaînes du TCR V β 7.2, V β 8 et V β 16 avec respectivement 82%, 81% et 72% de co-expression. En revanche, il est intéressant de noter que le segment V β 14, qui était le plus fréquemment utilisé tous types de tissus confondus et pour chaque type de tissu, présent dans 24 tissus sains et 37 tumeurs, était la chaîne V β du TCR la moins souvent présente dans le tissu sain et la tumeur d'un même patient avec 51% de co-expression (Tableau 7).

Les clones les plus représentés dans l'ensemble des tumeurs et absents dans le tissu sain du même patient étaient V β 13.1 et V β 13.2.

Si l'on compare l'expression des chaînes V β du TCR dans les trois types de tissus patient par patient, pour les 27 patients dont le tissu ganglionnaire a été analysé en cytométrie de flux, il est apparu que les segments V β les plus fréquemment concomitants étaient V β 7.2 (63%), V β 8 (64%) et V β 14 (67%) suivis de V β 20 (56%) et V β 21.3 (53%). Les chaînes du TCR les moins fréquemment présentes dans les trois types tissulaires d'un même patient étaient les chaînes utilisant V β 3 (41%), V β 12 (42%) et V β 16 (47%) (Tableau 11).

Tableau 11 **Expression concomitante de clones V β chez un même patient.**

Les résultats sont exprimés en pourcentage de cas où la même spécificité V β était observée comme un clone dans plus d'un des trois tissus testés.

	Ganglions et Tumeurs (n=27)	Ganglions et Tissus sains (n=27)	Tumeurs et Tissus sains (n=62)
V β 3	76	41	61
V β 7.2	100	63	82
V β 8	100	64	81
V β 12	68	42	65
V β 14	89	72	51
V β 16	100	47	72
V β 20	100	56	66
V β 21.3	87	53	63

12.2.2.2. Utilisation comparée du répertoire V β en fonction du type de tumeur

Lorsque l'on s'est intéressé aux pourcentages d'expression globale de chaque chaîne V β du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires, il est apparu des différences d'expression en fonction du type de cancer. Ainsi :

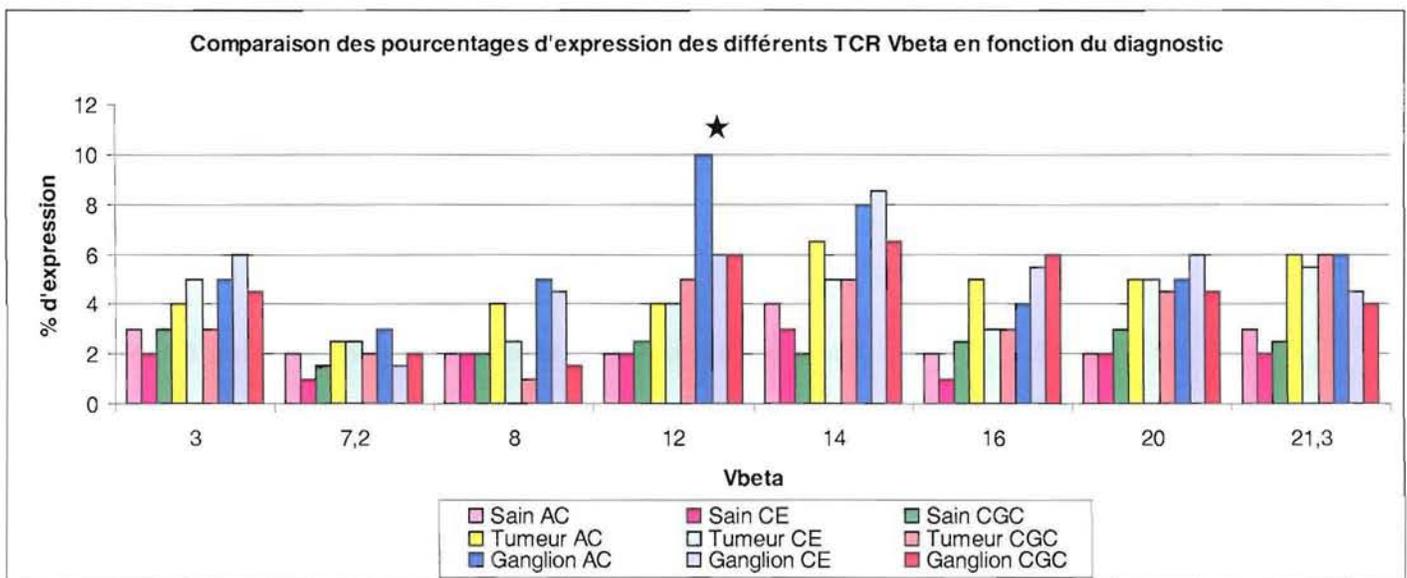
✓ Dans les tissus sains, les segments V β 3, 14, 16 et 21.3 étaient plus souvent utilisés chez les patients présentant un adéocarcinome que chez les patients présentant un carcinome épidermoïde. Aucune chaîne V β n'était plus exprimée dans les carcinomes épidermoïdes pour les tissus sains (Figure 33).

✓ Dans les tumeurs, les chaînes utilisant Vβ8, 14 et 16 étaient plus présentes chez les patients présentant un adénocarcinome alors que les chaînes utilisant Vβ3 et 13.1 étaient plus fréquentes chez les patients présentant un carcinome épidermoïde (Figure 33).

✓ Dans les ganglions, le segment Vβ12 du TCR était significativement plus exprimé chez les patients présentant un adénocarcinome par comparaison aux patients présentant un carcinome épidermoïde (p=0,009). De plus, les chaînes utilisant Vβ1, Vβ7.2 et Vβ21.3 étaient également plus présentes dans les adénocarcinomes. En revanche, les chaînes utilisant Vβ 3, Vβ16 et Vβ20 étaient plus fréquentes dans les carcinomes épidermoïdes comparés aux adénocarcinomes (Figure 33).

Figure 33 **Médianes des pourcentages d'expression de chaque chaîne Vβ du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires en fonction du type de cancer.**

★ : différence significative d'expression d'une chaîne Vβ du TCR entre adénocarcinome et carcinome épidermoïde pour un type de tissu donné.



Il existait un clone plus spécifiquement exprimé dans les tumeurs que dans les tissus sains, dans les carcinomes épidermoïdes : le V β 13.1 Dans les adénocarcinomes, il n'a pas été observé de cellules exprimant des spécificités absentes du tissu sain des mêmes patients.

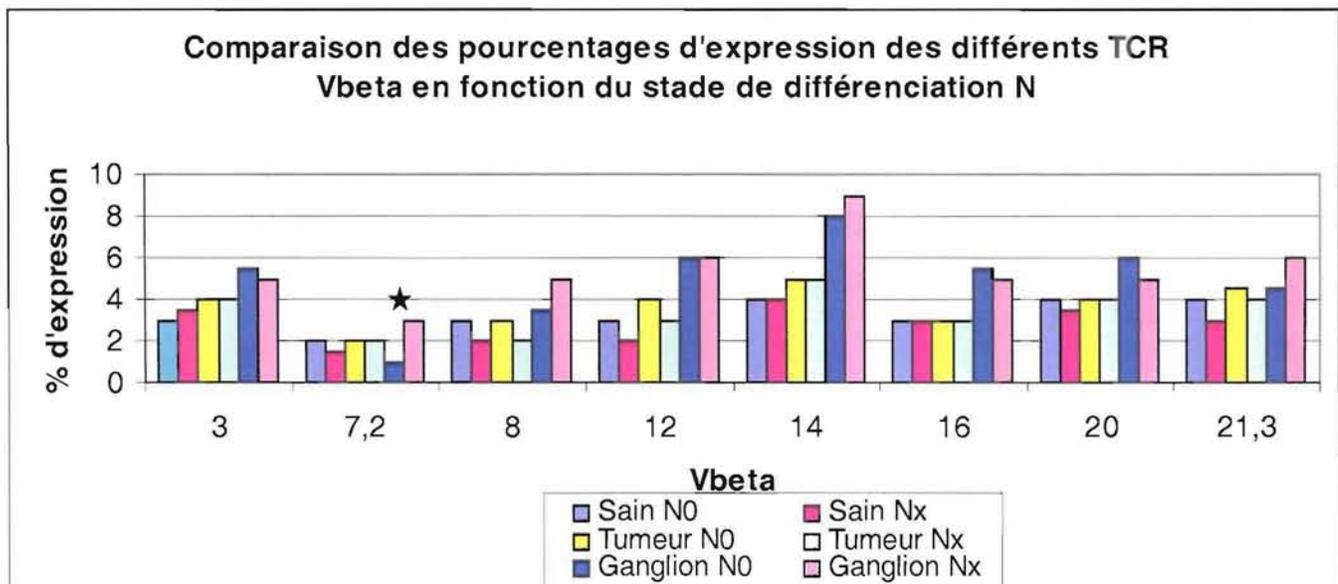
12.2.2.3. Utilisation comparée du répertoire V β en fonction du stade tumoral

Le nombre de patients présentant des métastases (2) était trop faible pour permettre l'analyse comparée du répertoire V β du TCR.

Lorsque l'on s'est intéressé aux pourcentages d'expression globale de chaque segment V β du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires, il est apparu une différence d'expression en fonction de l'extension ou non de la tumeur aux ganglions lymphatiques. En effet, la spécificité V β 7.2 était significativement plus exprimée chez les patients présentant une extension ganglionnaire ($p=0,007$) (Figure 34).

Figure 34 **Médianes des pourcentages d'expression de chaque chaîne V β du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires en fonction de l'extension de la tumeur aux ganglions lymphatiques.**

* : différence significative d'expression d'une chaîne V β du TCR entre les patients sans extension ganglionnaire (N0) et les patients présentant une extension ganglionnaire de la tumeur (Nx).



Lorsque l'on s'est intéressé aux pourcentages d'expression globale de chaque segment V β du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires, il est apparu des différences d'expression en fonction du stade de différenciation T des tumeurs. Ainsi :

✓ Dans les tissus sains, les chaînes utilisant V β 3 (p=0,02), V β 16 (p=0,03) et V β 20 (p=0,02) étaient significativement plus exprimées chez les patients présentant un stade de différenciation T1 comparé aux patients présentant un stade T2.

Les chaînes utilisant V β 3 (p=0,007), V β 7.2 (p=0,01), V β 8 (p=0,01), V β 12 (p=0,03), V β 14 (p=0,01), V β 16 (p=0,0015), V β 20 (p=0,005) et V β 21.3 (p=0,006) étaient, quant à elles,

significativement plus fréquentes chez les patients présentant les stades de différenciation tumorale T3 et T4 comparé aux patients présentant un stade T2 (Figure 35).

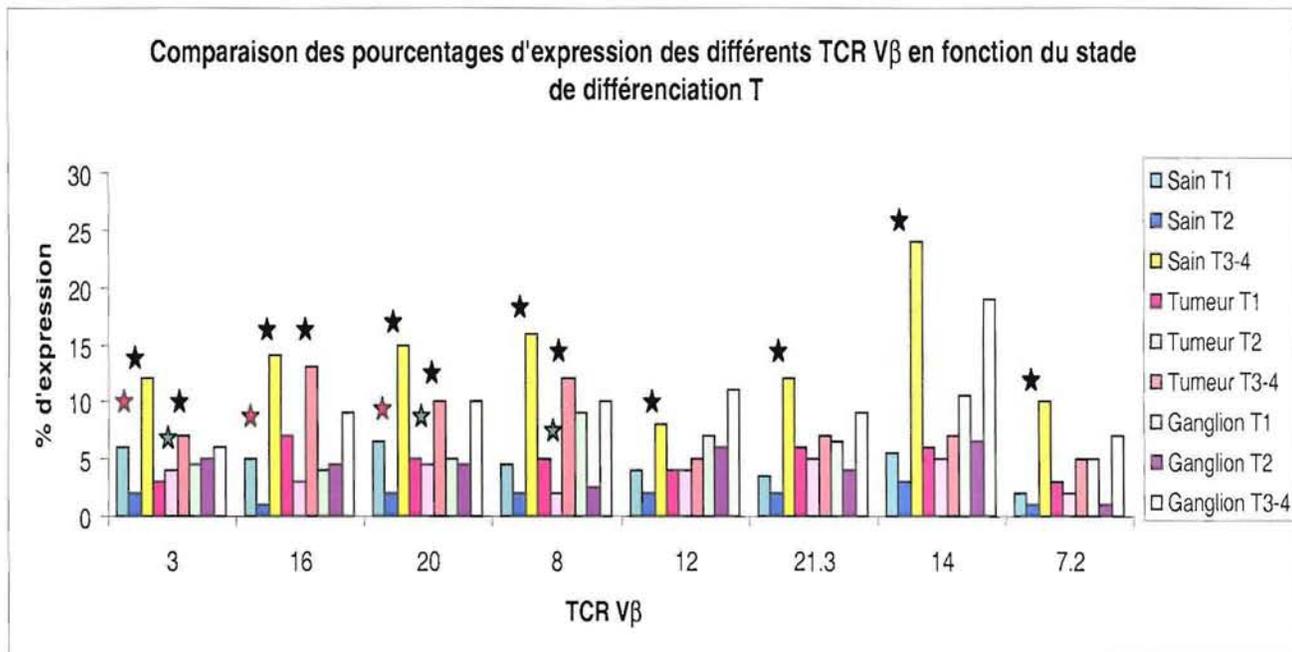
✓ Dans les tumeurs, les chaînes utilisant Vβ3 (p=0,03), Vβ8 (p=0,003) et Vβ20 (p=0,02) étaient significativement plus exprimées chez les patients présentant un stade de différenciation T3 ou T4 comparés aux patients présentant un stade T1.

Les chaînes utilisant Vβ3 (p=0,04), Vβ8 (p=0,002), Vβ16 (p=0,005) et Vβ20 (p=0,01) étaient, quant à elles, significativement plus fréquentes chez les patients présentant les stades de différenciation tumorale T3 et T4 comparés aux patients présentant un stade T2 (Figure 35).

✓ Dans les ganglions, les analyses comparées en fonction du stade T n'ont pas pu être réalisées en fonction de leur trop faible contingent (2 ganglions).

Figure 35 **Médianes des pourcentages d'expression de chaque chaîne Vβ du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires en fonction du stade de différenciation tumorale T.**

- * : différence significative d'expression d'une chaîne Vβ du TCR entre les stades T1 et T2
- ★ : différence significative d'expression d'une chaîne Vβ du TCR entre les stades T2 et T3-4
- ☆ : différence significative d'expression d'une chaîne Vβ du TCR entre les stades T1 et T3-4.



12.2.2.4. Autres utilisations comparées du répertoire V β du TCR

Les analyses comparées de l'utilisation du répertoire V β du TCR en fonction de l'âge des patients et en fonction de la consommation tabagique ne montraient pas de différence significative d'expression des chaînes V β du TCR.

12.2.3. Caractérisation de l'utilisation du répertoire V β du TCR dans les échantillons de sang périphérique

L'analyse de l'utilisation du répertoire V β du TCR dans les échantillons de sang périphérique de patients présentant un cancer bronchique non-à petites cellules n'a pas révélé de biais d'utilisation de ce répertoire. En effet, la présence d'aucun clone n'a été détectée parmi les 11 échantillons sanguins analysés.

13. Etude de la clonalité des lymphocytes T par TTGE/DGGE

Tous les lymphocytes qui expriment un $TCR\alpha\beta$ ont précédemment réarrangé leur $TCR\gamma\delta$ au cours de leur maturation intrathymique (Kuby, 2000). La majorité de ces réarrangements sont non productifs mais restent détectables car toujours présents au niveau de l'ADN. Tous les lymphocytes $T\alpha\beta$ provenant d'un même clone cellulaire présenteront donc exactement les mêmes réarrangements de leur séquence de $TCR\gamma$. La mise en évidence d'un répertoire de $TCR\gamma$ restreint dans une population lymphocytaire suggère que un ou plusieurs clone(s) ont proliféré localement à partir de une ou plusieurs cellule T ancestrale commune.

L'exploration des réarrangements du $TCR\gamma$ est souvent utilisée pour l'étude d'une oligoclonalité possible des cellules T car le répertoire $TCR\gamma$ contient un nombre limité de gènes variables (V) et de jonction (J) permettant des amplifications de l'ADN en PCR multiplex (Porcelli S, 1991).

Les techniques de DGGE/TTGE permettent de discriminer deux segments d'ADN de même taille à la base près. Les lymphocytes T polyclonaux présentant différents réarrangements du $TCR\gamma$ apparaîtront sous forme de smears après coloration argentique des gels de DGGE/TTGE. Les clones de lymphocytes T vont engendrer quant à eux l'amplification de fragments d'ADN exactement identiques migrant à la même position dans le gel et résultant en la formation d'une bande. Une population lymphocytaire monoclonale sera donc caractérisée par une bande unique tandis qu'une population lymphocytaire oligoclonale présentera plusieurs bandes.

13.1. Etude de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR dans les différents tissus

Les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires des 44 patients étudiés par PCR et DGGE/TTGE ont permis d'observer une restriction du répertoire V γ et une oligoclonalité caractérisée par 19 bandes de taille différente numérotées de 1 à 19 dans l'ordre décroissant de leur taille relative.

Tous les contrôles étaient satisfaisants présentant une bande unique pour l'échantillon de lymphome T de Sézary et aucune bande pour l'échantillon de lymphome B.

Parmi les 132 échantillons étudiés, 7 ne présentaient ni bande ni smear, suggérant l'absence de cellules T dans l'échantillon. Dix-huit échantillons présentaient un smear témoignant d'une population lymphocytaire T polyclonale. Parmi ces 25 échantillons, 7 échantillons étaient des tumeurs. Le Tableau 12 présente le nombre de cas présentant une ou plusieurs bandes dans les différents tissus. Aucune bande n'était jamais exprimée uniquement dans un type donné de tissu.

Tableau 12 Nombre de cas présentant une ou plusieurs bandes caractérisant la présence de un ou plusieurs clones lymphocytaires T dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires.

Bandes	Tissus sains (n=44)	Tumeurs (n=44)	Ganglions (n=44)
1	9	12	8
2	14	16	9
3	13	13	11
4	10	12	13
5	8	10	11
6	10	9	8
7	10	13	9
8	11	13	13
9	2	7	5
10	12	15	13
11	7	13	9
12	9	13	13
13	6	16	16
14	11	10	11
15	10	12	13
16	9	8	8
17	4	5	8
18	9	8	7
19	18	15	19

13.1.1. Etude de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR dans les tissus sains

La présence d'une ou plusieurs bandes a été observée dans 32 tissus sains sur les 44 testés (73%), 4 échantillons ne présentaient ni bande ni smear, et 8 échantillons présentaient un smear. La bande 19 était la plus fréquemment présente dans les tissus sains, suivie par les bandes 2, 3 et 10. Les autres bandes étaient moins représentées (Tableau 12).

Trois échantillons présentaient une monoclonalité lymphocytaire T caractérisée par la présence d'une bande unique alors que 29 (66%) tissus sains présentaient une oligoclonalité caractérisée par la présence de plusieurs bandes.

13.1.2. Etude de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR dans les tumeurs

La présence d'une ou plusieurs bandes a été observée dans 37 tumeurs sur les 44 testées (84%), 3 échantillons ne présentaient ni bande ni smear, et 4 échantillons présentaient un smear.

Dans les tissus tumoraux, les bandes 2, 13, 10 et 19 étaient les plus représentées, suivies par les bandes 3, 7, 8, 11 et 12 (Tableau 12).

Seuls 2 échantillons présentaient un seul clone lymphocytaire T plus exprimé caractérisé par la présence d'une bande unique dans un smear alors que 35 tumeurs (80%) présentaient une oligoclonalité caractérisée par la présence de plusieurs bandes.

13.1.3. Etude de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR dans les dans les ganglions

La présence d'une ou plusieurs bandes a été observée dans 25 des 44 ganglions testés, aucun échantillon ne présentait ni bande ni smear, et 19 échantillons présentaient un smear.

Dans les tissus ganglionnaires, la bande 19 était la plus représentée. Les bandes 13, 4, 8, 10, 12 et 15 étaient également bien représentées avec une fréquence d'expression légèrement supérieure à celle des bandes 3, 5 et 14 ainsi que les bandes 2, 7 et 11 (Tableau 12).

Deux échantillons présentaient une monoclonalité lymphocytaire T caractérisée par la présence d'une bande unique alors que 19 ganglions (43%) présentaient une oligoclonalité caractérisée par la présence de plusieurs bandes.

13.2. Etude comparée de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR

13.2.1. Etude comparée de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR en fonction du type de tissu

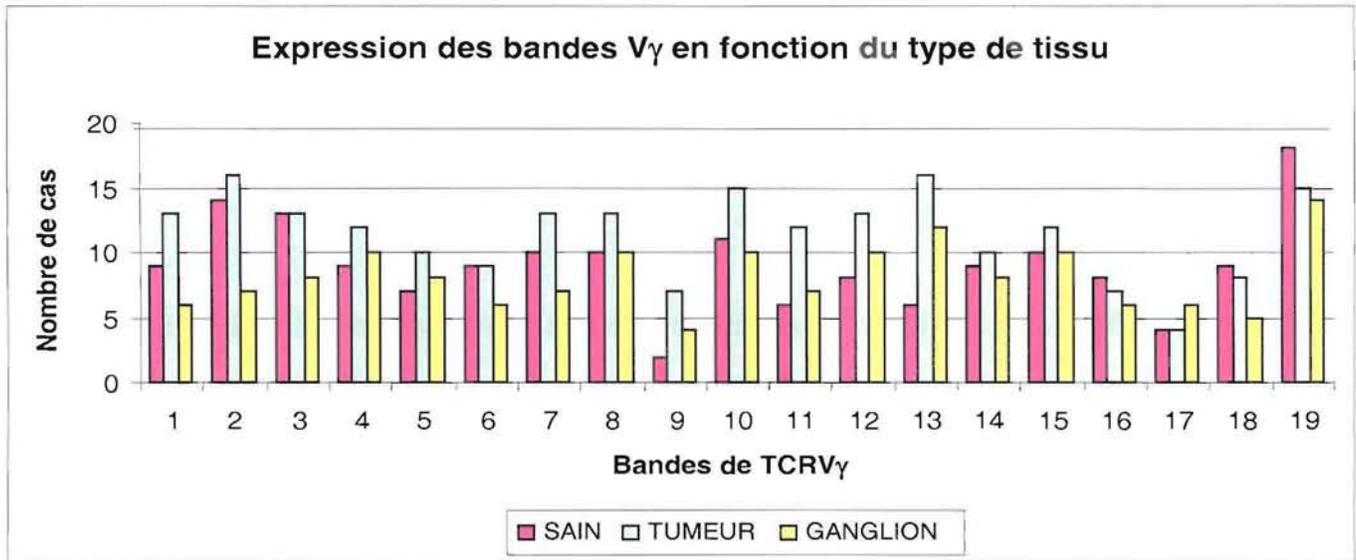
Les tissus tumoraux présentaient la plus grande fréquence de bandes clonales, suivis par les tissus ganglionnaires puis les tissus sains. La majorité des bandes (13/19) étaient plus présentes dans les tumeurs que dans les ganglions et les tissus sains. La bande 19 était la plus fréquente, en particulier dans les tissus sains et les ganglions, suivie par la bande 13 qui, quant à elle, était plus présente dans les ganglions et les tumeurs que dans les tissus sains. Les bandes 4, 5, 10, 11, 12 et 15 étaient également fréquentes et plus exprimées dans les ganglions et les tumeurs que dans les tissus sains. Les bandes 6, 14 et 16 ne présentaient pas de différence d'expression entre les différents types de tissus (Figure 36).

De façon intéressante, des bandes tumeur-spécifiques ont été identifiées, dans le sens où ces bandes étaient présentes uniquement dans le tissu tumoral d'un patient donné. Ce sont les bandes 13 (16 cas) et 11 (13 cas).

Si l'on compare uniquement les tissus tumoraux et les tissus ganglionnaires, certaines bandes étaient plus exprimées dans les ganglions que dans les tumeurs : les bandes 17 et 19. En revanche les bandes 1, 2, 3, 6, 7, 9, 10, 11, 13 et 18 étaient plus exprimées dans les tissus

tumoraux que dans les ganglions. Les autres bandes sont exprimées de façon similaire dans les tumeurs et les ganglions (Figure 36).

Figure 36 **Restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires.**



13.2.2. Etude comparée de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR en fonction du type de tumeur

Les carcinomes épidermoïdes présentaient la plus grande fréquence de bandes V γ .

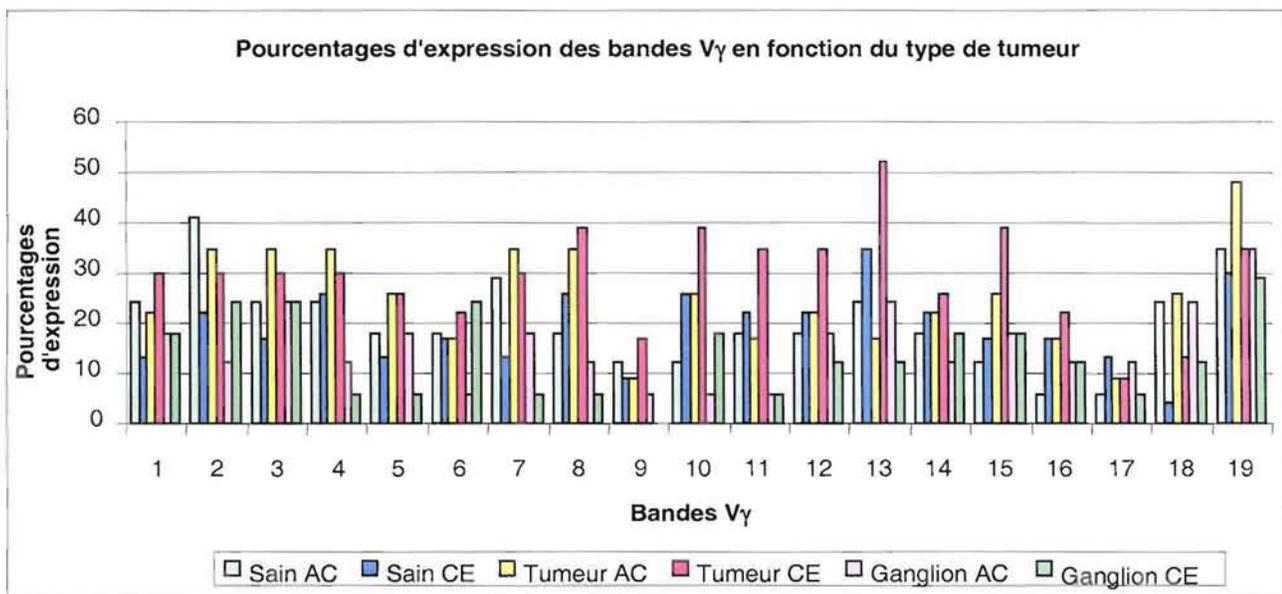
Dans les tissus sains, les bandes V γ 1, 2, 3, 5, 7 et 18 étaient plus fréquemment présentes chez les patients présentant un adénocarcinome que chez les patients présentant un carcinome épidermoïde. A l'inverse, les bandes V γ 8, 10, 13, 16 et 17 étaient plus exprimées dans les carcinomes épidermoïdes (Figure 37).

Dans les tumeurs, les bandes V γ 18 et 19 étaient plus fréquentes dans les adénocarcinomes. La bande V γ 13 était beaucoup plus présente dans les carcinomes épidermoïdes. De même, les bandes V γ 1, 9, 10, 11, 12, et 15 étaient plus exprimées dans les carcinomes épidermoïdes.

Dans les ganglions, la fréquence des bandes V γ 5, 7, 9, 13 et 18 était supérieure dans les adénocarcinomes comparés aux carcinomes épidermoïdes. A l'inverse, la fréquence des bandes V γ 2, 6 et 10 est supérieure dans les carcinomes épidermoïdes (Figure 37).

Figure 37 **Restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires en fonction du type de cancer.**

AC : adénocarcinome, EC : carcinome épidermoïde.



Certaines bandes ont semblé être spécifiques des carcinomes épidermoïdes puisqu'elles étaient présentes dans le tissu tumoral de patients présentant un carcinome épidermoïde mais absentes du tissu sain des mêmes patients (20 cas). Les plus fréquentes de ces bandes étaient les bandes 13 (8/23 cas), 11 (4/23 cas) et 10, 12, 15 (3/23 cas).

Dans les adénocarcinomes, les bandes absentes du tissu sain, les plus fréquentes étaient les bandes 2 (7/17) et 7 (5/17).

Les carcinomes à grandes cellules exprimaient préférentiellement la bande 10 (2/4 cas), absente du tissu sain correspondant.

13.2.3. Etude comparée de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR en fonction du stade tumoral

Lorsque l'on a comparé l'analyse de la fréquence d'expression des différentes bandes V γ , caractérisant 19 segments V γ du TCR identifiés, entre les patients ne présentant pas d'extension tumorale aux ganglions proximaux et ceux en présentant une, il est apparu certaines différences. Ainsi :

✓ D'une façon globale, c'était chez les patients présentant une extension ganglionnaire qu'étaient présentes le plus de bandes.

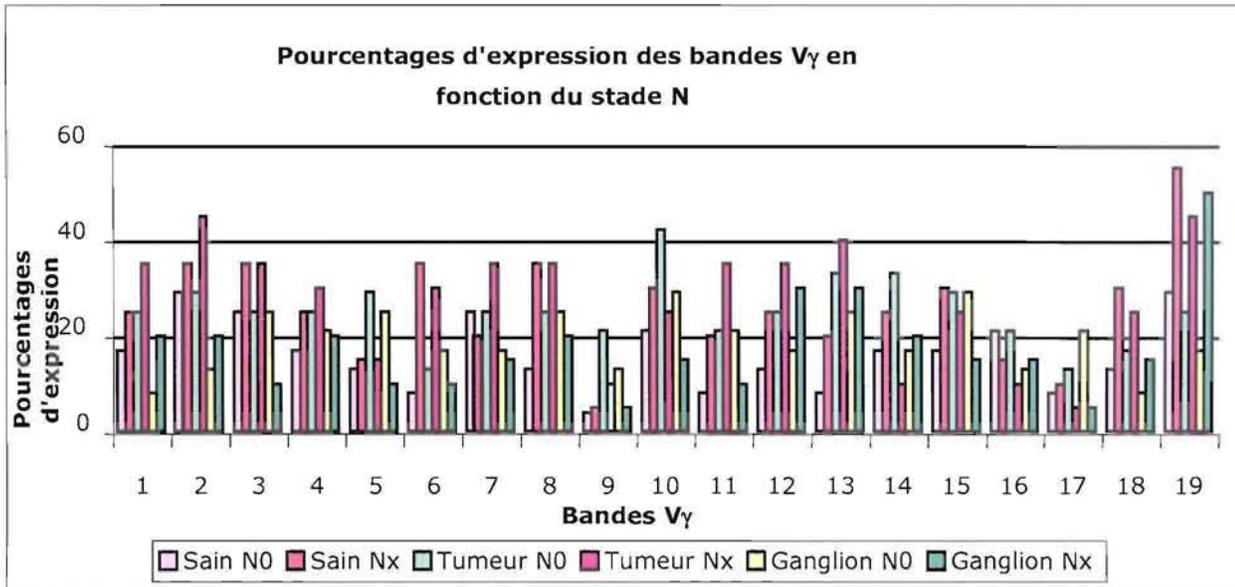
✓ Dans les tissus sains, seules les bandes 7 et 16 étaient un peu plus fréquemment exprimées chez les patients ne présentant pas d'extension tumorale ganglionnaire. Les quinze autres chaînes V γ du TCR étaient plus exprimées chez les patients présentant une extension ganglionnaire, en particulier, les bandes V γ 3, 6, 8, 11, 12, 13, 15, 18 et 19. La bande 19 était celle qui présentait la plus grande différence d'expression entre les deux stades N dans les tissus sains (29% pour N0, 55% pour Nx) (Figure 38).

✓ Dans les tumeurs, les bandes 5, 9, 10, 14, 15, 16 et 17 étaient plus fréquentes chez les patients ne présentant pas d'extension tumorale aux ganglions. Les douze autres chaînes V γ du TCR étaient plus exprimées chez les patients présentant une extension ganglionnaire, en particulier, les bandes V γ 2, 6, 11 et 19. La bande 14 était celle qui présentait la plus grande différence d'expression entre les deux stades N dans les tumeurs (33% pour N0, 10% pour Nx,) (Figure 38).

✓ Dans les ganglions, les bandes 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 15 et 17 étaient plus exprimées chez les patients ne présentant pas d'extension tumorale. Il est à noter que dans les ganglions c'était cette fois chez les patients ne présentant pas d'extension tumorale ganglionnaire qu'a été détecté le plus grand nombre de bandes V γ . Les autres chaînes V γ du TCR étaient plus exprimées chez les patients présentant une extension ganglionnaire. La bande 19 était, comme pour les tissus sains, celle qui présentait la plus grande différence d'expression entre les deux stades N dans les ganglions (17% pour N0, 50% pour Nx) (Figure 38).

Figure 38 **Restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires en fonction de l'envahissement tumoral des ganglions lymphatiques proximaux.**

N0 : pas d'extension ganglionnaire, Nx : extension ganglionnaire.



Lorsque l'on compare l'analyse de la fréquence d'expression des différentes bandes V γ , caractérisant 19 segments V γ du TCR différents en fonction du stade de différenciation tumorale T, il est apparu des différences. Ainsi :

✓ Dans les tissus sains, les bandes 7, 8, 11, 12, 13 et 19 étaient plus exprimées chez les patients présentant un stade T1 comparés aux patients présentant un stade T2. A l'inverse, les autres bandes étaient plus fréquentes chez les patients présentant un stade T2. Les bandes 1, 9, 15 et 17 étaient absentes des tissus sains des patients présentant un stade T1. La bande 13 était celle qui présente la plus grande différence d'expression entre les stades T1 et T2 dans les tissus sains (67% pour T1, 22% pour T2).

Lorsque l'on a comparé l'expression des bandes V γ des tissus sains des patients présentant les stades T2 et T3-4, il est apparu également un certain nombre de différences. Une grande majorité de bandes V γ (13 bandes), les bandes 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18 et 19, étaient plus exprimées dans les tissus sains des patients présentant un stade de

différenciation T2 comparés aux patients présentant des stades T3 et T4. Les autres bandes V γ étaient plus présentes chez les patients présentant des stades T3 et T4. Les bandes 12, 16 et 17 étaient absentes des tissus sains des patients présentant des stades T3 et T4. Les bandes 12 et 16 étaient celles qui présentent la plus grande différence d'expression entre les stades T2 et T3-4 dans les tissus sains (30% pour T2, 0% pour T3-4).

Globalement, dans les tissus sains, la fréquence des bandes 12, 13 et 19 décroissait du stade T1 aux stades T3-4. A l'inverse, la présence des bandes 6, 9 et 14 augmentait du stade T1 aux stades T3-4 (Figure 39 et Figure 40).

✓ Dans les tumeurs, neuf segments V γ étaient plus fréquents chez les patients présentant une tumeur de stade T1 par comparaison aux patients présentant une tumeur de stade T2. Il s'agissait en particulier des bandes V γ 6, 8, 9, 11, 12, 13 et 19. A l'inverse, dix bandes V γ étaient plus présentes chez les patients présentant le stade T2, en particulier les bandes V γ 5, 14, 15 et 18. Les segments V γ 5 et 9 n'étaient jamais exprimés chez les patients de stade T1. La bande 12 était celle qui présentait la plus grande différence d'expression entre les stades T1 et T2 dans les tumeurs (67% pour T1, 35% pour T2, soit une différence d'expression de 32%).

Lorsque l'on a comparé l'expression des bandes V γ des tumeurs des patients présentant les stades T2 et T3-4, il est apparu également un certain nombre de différences. En effet, onze bandes V γ étaient plus fréquentes dans les tumeurs de stade T2 que dans les tumeurs de stades T3 et T4. Les plus grandes différences d'expression étaient observées pour les bandes V γ 10, 12, 15, 16, 18 et 19. A l'inverse, huit bandes V γ étaient plus présentes chez les patients présentant les stades T3 et T4, en particulier les bandes V γ 7, 8, 9 et 11. Les bandes V γ 10, 14, 15, 16, 17 et 18 n'étaient jamais exprimées chez les patients de stades T3 et T4. La bande 12 était celle qui présentait la plus grande différence d'expression entre les stades T2 et T3-4 dans les tumeurs (48% pour T2, 0% pour T3-4).

Globalement, dans les tumeurs, la fréquence des bandes 2, 6, 10, 12, 13, 17 et 19 décroissait du stade T1 aux stades T3-4. A l'inverse, la présence des bandes 1, 3, 4, 5, 7 et 9 augmentait du stade T1 aux stades T3-4 (Figure 39 et Figure 40).

✓ Dans les ganglions, sept segments V γ étaient plus fréquents chez les patients présentant une tumeur de stade T1 par comparaison aux patients présentant une tumeur de stade T2, en

particulier, les bandes V γ 7, 8, 12, 13 et 19. A l'inverse, 12 bandes V γ étaient plus présentes chez les patients présentant le stade T2, en particulier les bandes V γ 1, 4, 10, 15 et 17. Les bandes V γ 1, 9, 15 et 17 n'étaient jamais présentes chez les patients de stade T1. La bande 15 est celle qui présentait la plus grande différence d'expression entre les stades T1 et T2 dans les ganglions (0% pour T1, 43% pour T2) (Figure 39).

Lorsque l'on a comparé l'expression des bandes V γ des ganglions des patients présentant les stades T2 et T3-4 il est apparu également un certain nombre de différences. En effet, une grande majorité (14) de chaînes V γ était plus fréquente dans les ganglions de stade T2 que dans les ganglions de stades T3 et T4. Les plus grandes différences d'expression étaient observées pour les chaînes V γ 1, 6, 10, 15, 16, 17, 18 et 19. A l'inverse, 5 bandes V γ étaient plus présentes chez les patients présentant des stades T3 et T4, en particulier les bandes V γ 7 et 8. Les bandes V γ 1, 6, 15, 16, 17, 18 et 19 n'étaient jamais exprimées chez les patients de stades T3 et T4. Les bandes 15 et 19 étaient celles qui présentaient la plus grande différence d'expression entre les stades T2 et T3-4 dans les ganglions (43% pour T2, 0% pour T3-4) (Figure 40).

Globalement, dans les ganglions, la fréquence des bandes 3, 12, 13 et 19 décroissait du stade T1 aux stades T3-4. A l'inverse, la présence des bandes 4 et 9 augmentait du stade T1 aux stades T3-4 (Figure 39 et Figure 40).

Certaines bandes semblaient spécifiques du stade T2, ce sont les bandes V γ 1, 15 et 17 dans les ganglions. Certaines bandes n'étaient exprimées dans aucun tissu pour un stade de différenciation T donné. Ce sont les bandes V γ 9 pour le stade T1 et V γ 16 et 17 pour les stades T3 et T4 (Figure 40).

Figure 39 Comparaison de la restriction d'utilisation du répertoire $V\gamma$ du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires en fonction des stades de différenciation tumorale T1 et T2.

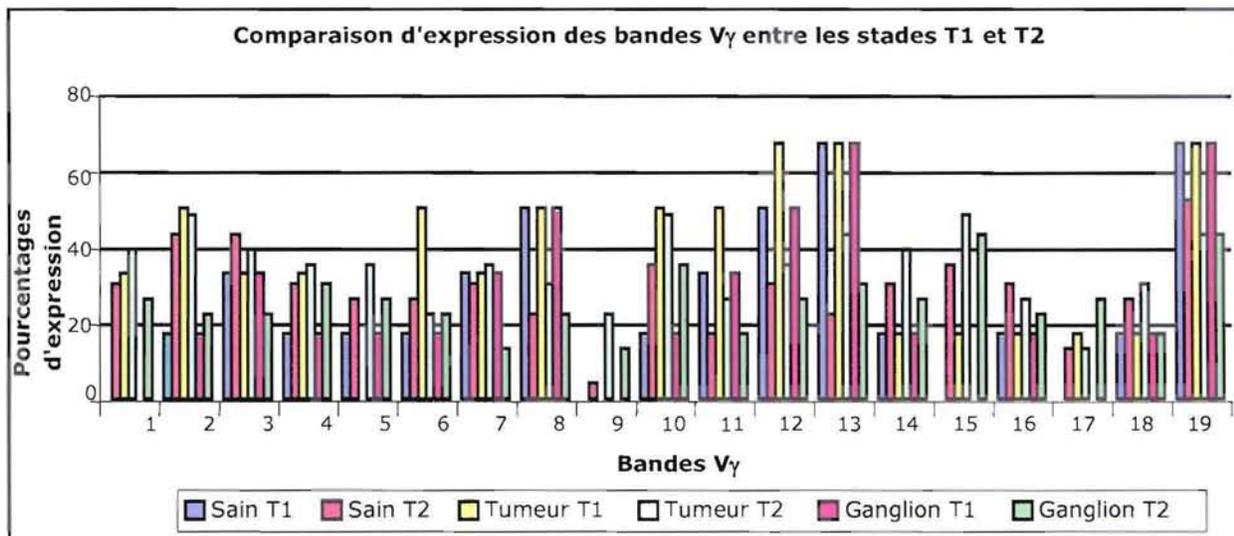
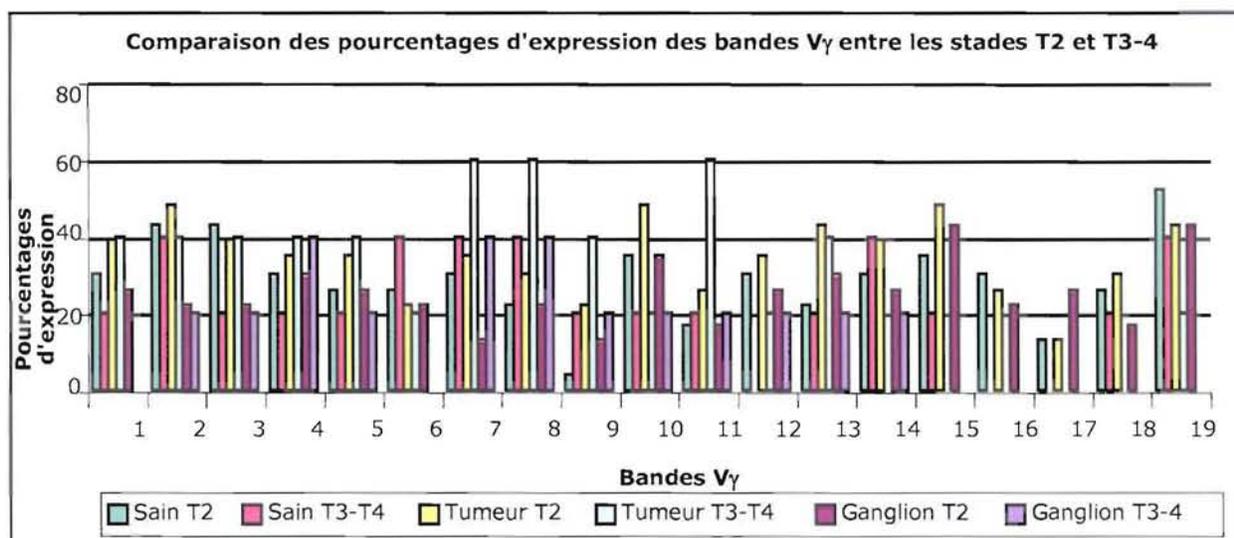


Figure 40 Comparaison de la restriction d'utilisation du répertoire $V\gamma$ du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires en fonction des stades de différenciation tumorale T2 et T3-4.



13.2.4. Etude comparée de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR en fonction de l'âge des patients

Lorsque l'on a comparé la fréquence d'expression des différentes bandes V γ , en fonction de l'âge des patients, il est apparu des différences. Ainsi :

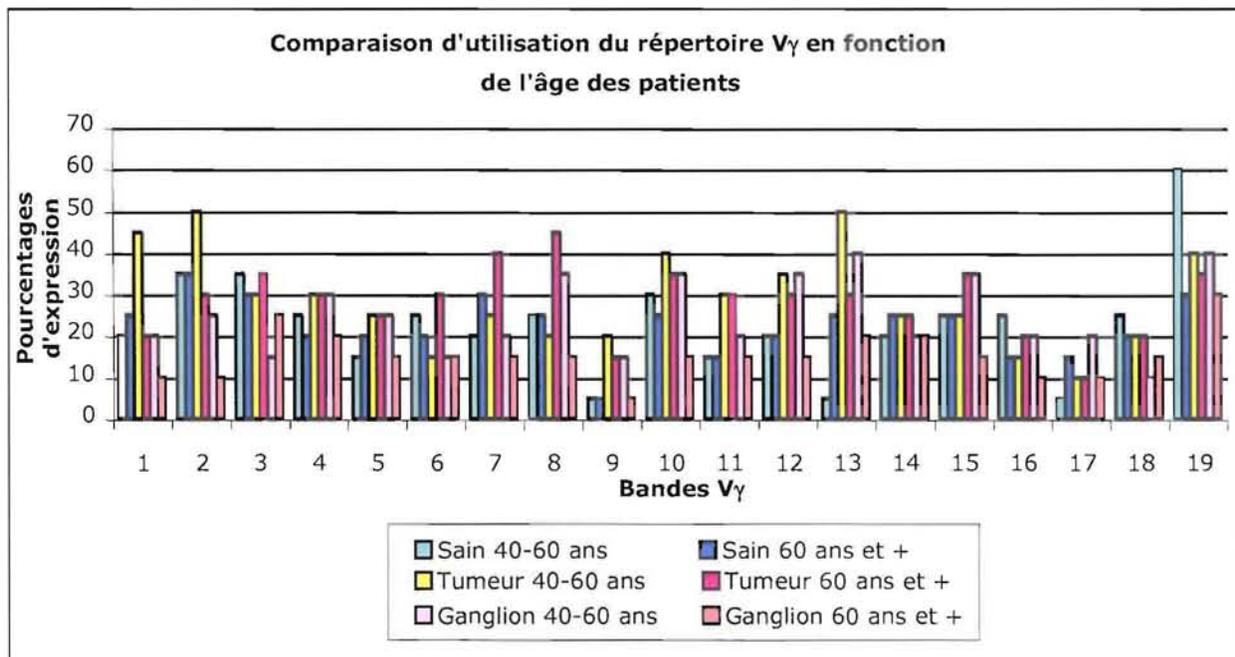
✓ Globalement, les patients entre 40 et 60 ans présentaient plus de bandes V γ que les patients plus âgés (60 ans et plus).

✓ Dans les tissus sains, la bande 19 était largement plus exprimée chez les patients les moins âgés (60% chez les 40-60 ans et 30% chez les 60 ans et plus). De plus, six bandes V γ étaient légèrement plus exprimées chez les patients les moins âgés. En revanche, six segments V γ étaient plus présents chez les patients les plus âgés, en particulier les V γ 7, 13 et 17. Les six autres bandes étaient exprimées de la même façon quel que soit l'âge des patients (Figure 41).

✓ Dans les tumeurs, sept bandes V γ étaient plus souvent présentes chez les patients les moins âgés et en particulier les bandes V γ 1, 2 et 13. A l'inverse, six segments V γ , et en particulier les V γ 6, 7 et 8, étaient plus fréquents chez les patients les plus âgés. Les six autres bandes étaient exprimées de la même façon quelque soit l'âge des patients. Les bandes présentant la plus grande différence d'expression en fonction de l'âge des patients dans les tumeurs étaient les bandes 1 et 8 (45% chez les 40-60 ans contre 20% chez les 60 ans et plus pour la bande 1, 20% chez les 40-60 ans contre 45% chez les 60 ans et plus pour la bande 1) (Figure 41).

✓ Dans les ganglions, quinze bandes V γ sur les 19 (soit 79%) étaient plus exprimées chez les patients les moins âgés. La différence d'expression était particulièrement marquée pour les bandes V γ 2, 8, 10, 12, 13 et 15. Seuls les segments V γ 3 et 18 étaient légèrement plus exprimés chez les patients les plus âgés. Enfin, la bande V γ 14 était exprimée avec la même fréquence chez les patients quel que soit leur âge (Figure 41).

Figure 41 **Comparaison de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires en fonction de l'âge des patients.**



13.2.5. Etude comparée de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR en fonction de la consommation tabagique

Lorsque l'on a comparé l'analyse de la fréquence d'expression des différentes bandes V γ , caractérisant 19 segments V γ du TCR différents en fonction de l'âge des patients, il est apparu des différences d'expression de certaines spécificités V γ . Ainsi :

- ✓ Globalement, les patients fumant moins de 50 paquets-année (PA) présentaient plus de bandes V γ que les patients fumant plus de 50 PA.

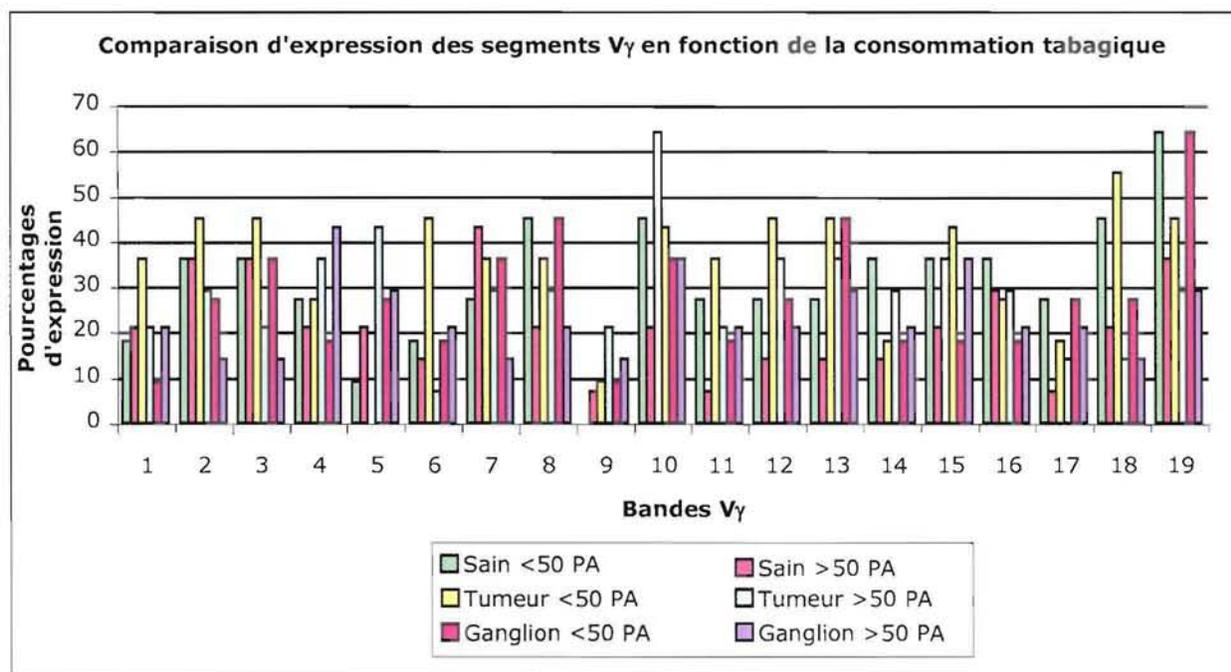
- ✓ Dans les tissus sains, une grande majorité de spécificités V γ (13) étaient plus présentes chez les moins fumeurs (<50 PA). De plus, de grandes différences d'expression étaient mises en évidence pour les bandes V γ 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18 et 19. Les segments V γ 1, 5, 7 et 9 étaient, quant à eux, plus présents chez les patients ayant la plus forte consommation tabagique (>50 PA). Les bandes V γ 2 et 3 étaient exprimées également quelle que soit la consommation tabagique. La bande V γ 9 était absente des tissus sains des patients ayant la

moins forte consommation tabagique. Enfin, la bande V γ 19 montrait la plus grande différence de fréquence d'expression en fonction de la consommation tabagique dans les tissus sains (64% pour les fumeurs de moins de 50 PA, 36% pour les fumeurs de plus de 50 PA) (Figure 42).

✓ Dans les tumeurs, une grande majorité de spécificités V γ (13) étaient plus présentes chez les moindres fumeurs (<50 PA). De plus, de grandes différences d'expression ont été mises en évidence pour les bandes V γ 1, 2, 3, 6, 10, 11, 18 et 19. En revanche, les six autres bandes V γ étaient plus exprimées chez les grands fumeurs que chez les moins grands fumeurs, en particulier les bandes 5, 9 et 14. De plus la bande 5 n'était jamais présente chez les patients fumant moins de 50 PA, elle constituait de ce fait la bande présentant la plus grande différence de fréquence d'expression en fonction de la consommation tabagique dans les tumeurs en étant présente chez 43% des patients fumant plus de 50 PA (Figure 42).

✓ Dans les ganglions, neuf bandes V γ étaient plus fréquentes chez les patients fumant moins de 50 PA comparé aux patients fumant plus de 50 PA. En particulier, les segments V γ 3, 7, 8, 13 et 19. Neuf bandes V γ étaient pour leur part plus exprimées chez les grands fumeurs, en particulier les bandes 1, 4 et 15. La spécificité représentée par la bande V γ 10 était exprimée de la même façon quelle que soit l'importance de la consommation tabagique. Enfin, la bande V γ 19 montre la plus grande différence de fréquence d'expression en fonction de la consommation tabagique dans les ganglions (64% pour les fumeurs de moins de 50 PA, 29% pour les fumeurs de plus de 50 PA) (Figure 42).

Figure 42 **Comparaison de la restriction d'utilisation du répertoire V γ du TCR dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires en fonction de la consommation tabagique.**



13.3. Comparaison des résultats des études de clonalité obtenus en cytométrie de flux et par la technique de DGGE/TTGE

La comparaison tissu par tissu de la présence ou de l'absence d'une restriction d'utilisation des répertoires V β et V γ a permis d'observer un degré de clonalité semblable dans 85% des tumeurs. Des résultats similaires ont été observés dans 87.5 % des cas pour les tissus pulmonaires sains et dans 91.3 % des cas pour les ganglions.

14. Etudes immunohistologiques

Les tissus sains et tumoraux de 51 patients ont été analysés, seuls 16 tissus ganglionnaires étaient suffisamment étendus pour permettre l'analyse en immunohistologie.

L'étude en immunofluorescence sur cryocoupes appliquée aux tissus sains, tumoraux et aux ganglions de patients atteints d'un cancer bronchique non-à petites cellules a permis de caractériser les niveaux d'expression de diverses molécules exprimées à la surface des lymphocytes T et des pneumocytes. De plus, cette technique renseigne sur la localisation histologique du marquage fluorescent.

Le contrôle sans premier anticorps montrait une autofluorescence des tissus élastiques, mais aucun marquage non spécifique dans d'autres structures.

✓ L'anticorps monoclonal anti-CD3 reconnaît les lymphocytes T à la surface desquels ce complexe multimoléculaire est exprimé en association avec le complexe de reconnaissance antigénique (TCR). CD3 est strictement spécifique des lymphocytes T.

✓ CD4 est exprimé à la surface des lymphocytes T helper, des monocytes, des macrophages et de certaines cellules dendritiques.

✓ CD8 est exprimé à la surface des lymphocytes T cytotoxiques.

✓ Les TCR $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ caractérisent les deux voies de différenciation du TCR des cellules T.

✓ L'antigène leucocytaire commun CD45 est exprimé à la surface des cellules d'origine hématopoïétique et il joue un rôle actif dans la transduction des signaux d'activation des lymphocytes T. L'isoforme CD45RA est associée à la sous population de cellules T « naïves » alors que l'isoforme CD45RO est associée à la sous population de cellules T « mémoires ».

✓ L'anticorps monoclonal anti-CD25 reconnaît la chaîne α du récepteur à l'IL-2 présente sur les lymphocytes T et B activés.

✓ La β 2 microglobuline est une molécule de classe I du CMH présente sur les cellules présentatrices d'antigène, les cellules T et B activées ainsi que sur toutes les cellules présentant des antigènes endogènes.

✓ L'anticorps anti-HLA-DR reconnaît les déterminants non polymorphiques des molécules HLA-DR de classe II du CMH qui sont présents sur les cellules présentatrices d'antigène, les cellules B et T activées, les monocytes, les macrophages ainsi que sur les pneumocytes.

Les molécules HLA-DP et HLA-DQ sont également des molécules de classe II du CMH.

14.1. Etudes histologiques des tissus sains, tumoraux et ganglionnaires

14.1.1. Etude histologique sur cryocoupes des tissus sains

L'étude histologique des tissus sains a confirmé l'absence de cellules tumorales dans ces tissus. Elle a de plus montré que les lymphocytes étaient rares ou absents dans la majorité des tissus sains (61% des cas). Lorsqu'ils étaient présents, les lymphocytes étaient principalement présents sous forme de cellules éparses dans le parenchyme (moyenne : 2000 ± 152 cellules/mm²). Dans 39% des cas, les lymphocytes étaient également présents sous forme de petits foyers lymphocytaires proches de structures bronchiques ou vasculaires (moyenne : 4800 ± 316 cellules/mm²) (Figure 43).

14.1.2. Etude histologique sur cryocoupes des tumeurs

Toutes les sections tumorales montraient une forte infiltration de cellules tumorales, souvent disposées en foyers entourés de tissu stromal. La taille des échantillons était suffisante pour permettre l'observation de tissu sain adjacent à la tumeur dans 40 cas sur 51 étudiés. L'étude histologique montrait la présence de lymphocytes dans 88% des tumeurs. Dans 78% des cas les lymphocytes étaient présents sous forme de foyers lymphocytaires étendus (moyenne : 15200 ± 3847 cellules/mm²). Ces foyers étaient localisés dans la stroma réaction, à la périphérie tumorale, ou parfois au sein de la tumeur elle-même. Des lymphocytes épars étaient également présents dans 84% des tumeurs avec une valeur moyenne de 800 ± 78 cellules/mm² (Figure 44).

Les six tumeurs ne présentant pas d'infiltration lymphocytaire étaient toutes des tumeurs différenciées, avec une densité en cellules tumorales très forte dans la moitié des cas et à l'inverse une densité cellulaire très faible dans l'autre moitié des cas. Cinq des six tumeurs ne présentant pas d'infiltration lymphocytaire étaient des tumeurs de stade T2 ne présentant pas d'extension tumorale aux ganglions proximaux. Il n'a pas été mis en évidence de différence significative de la présence de lymphocytes entre les patients présentant une tumeur différenciée ou non différenciée.

L'étude histologique des tissus tumoraux met en évidence un certain nombre de différences de structures en fonction du type de tumeur. Ainsi :

- ✓ Les adénocarcinomes étaient généralement mixtes, caractérisés par la néo-formation de structures glandulaires et papillaires contenant souvent des composés de la stroma réaction en leur centre. La stroma réaction était généralement fibreuse, et lorsque l'adénocarcinome était peu différencié, il existait une nécrose importante.

- ✓ Les carcinomes épidermoïdes différenciés étaient caractérisés par la production de kératine, par de grandes zones de nécrose et par une très grande densité de la tumeur lorsqu'elle était peu différenciée. La stroma réaction était très fibreuse et la néo angiogenèse était importante.

- ✓ Les carcinomes à grandes cellules étaient caractérisés par la formation de cellules volumineuses avec un développement tumoral très intriqué : il n'existait généralement pas de démarcation entre la stroma réaction et la tumeur elle-même.

14.1.3. Etude histologique sur cryocoupes des ganglions

Les ganglions renferment de par leur nature, structure et fonction, essentiellement des lymphocytes T et B. Les cellules T se trouvent en périphérie des centres germinatifs, autour des cellules B.

L'architecture des ganglions était très souvent désorganisée dans ces tissus issus de patients présentant un CBNPC. Dans près de la moitié des ganglions étudiés (7 cas sur 16), le tissu lymphoïde ganglionnaire était clairement infiltré de cellules tumorales métastatiques.

Les ganglions présentait des centres germinatifs bien visibles dans 12 des 16 cas étudiés. Chez les quatre autres patients, les ganglions étaient désorganisés et infiltrés pas des cellules tumorales. Chez ces patients les centres germinatifs n'étaient plus identifiables.

14.1.4. Etudes histologiques comparées des tissus sains et des tumeurs

Les études histologiques comparées des tissus sains et tumoraux ont montré que l'infiltration lymphocytaire était significativement plus importante dans les tumeurs que dans les tissus sains. En effet, les lymphocytes sont plus abondants dans le tissu tumoral que dans le tissu sain du même patient dans 74 % des cas ($p < 0,0001$) (Figure 43 et Figure 44).

Dix pourcent des patients ne présentaient pas d'infiltration lymphocytaire, quel que soit le tissu étudié. Enfin, dans 8% des cas, l'infiltration lymphocytaire était plus importante dans le tissu sain que dans le tissu tumoral.

L'analyse du groupe de patients dont la consommation tabagique était connue a révélé chez tous la présence de lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL). Ces TIL sont plus nombreux, chez les fumeurs, que les lymphocytes présents dans le tissu sain d'un même patient, ceci sans relation avec le degré de consommation tabagique.

Figure 43 Exemple de coloration au bleu de toluidine d'une cryocoupe de tissu sain en microscopie optique. Grossissement : 100x.

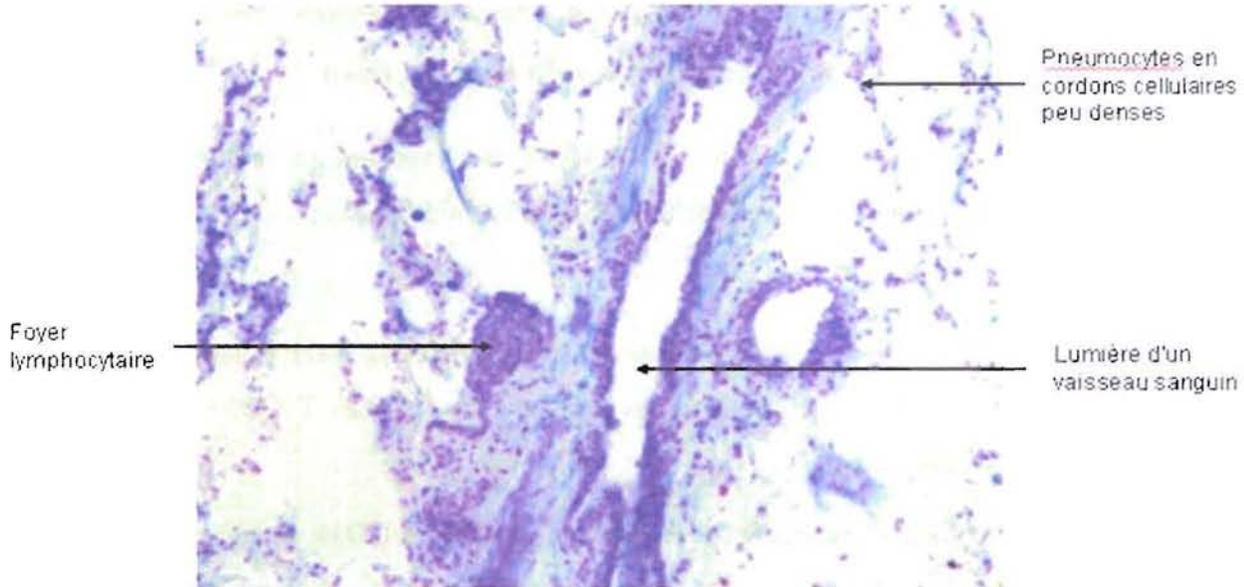
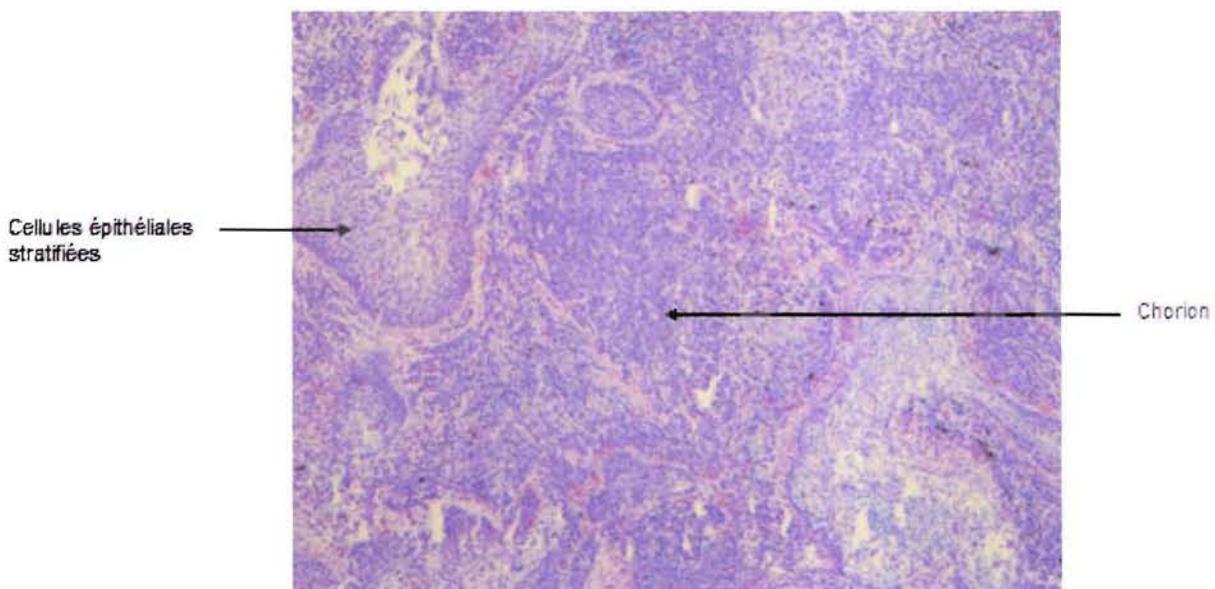


Figure 44 Exemple de coloration au bleu de toluidine d'une cryocoupe de tumeur en microscopie optique. Grossissement : 100x.

Le chorion, sous l'épithélium, est riche en cellules mononuclées dont de nombreux lymphocytes.



14.2. Expression de différents marqueurs lymphocytaires et pneumocytaires

14.2.1. Expression de différents marqueurs lymphocytaires et pneumocytaires en fonction du type de tissu

La densité cellulaire, pour les lymphocytes, est exprimée en nombre de cellules par mm². L'ensemble de ces résultats est synthétisé dans le Tableau 13 .

✓ Les lymphocytes T exprimant à leur surface la molécule CD3 étaient présents dans 25 cas sur 51 dans les tissus sains. Dans les tumeurs, des cellules T CD3+ ont été mises en évidence dans 44 cas sur 51.

L'analyse patient par patient a révélé que les cellules CD3+ étaient présentes, dans 23 cas, à la fois dans le tissu sain et le tissu tumoral du même patient. L'intensité du marquage était toutefois nettement supérieure dans les tissus sains. Parmi ces vingt trois patients, l'intensité d'expression de CD3 était inférieure dans les tumeurs comparées aux tissus sains chez 12 patients. En revanche, l'intensité de CD3 était supérieure dans les tumeurs chez 6 patients. L'intensité d'expression de CD3 était similaire dans les tissus sains et tumoraux chez 5 patients (Figure 45 et Figure 46).

CD3 était très exprimé dans les ganglions avec une intensité de fluorescence significativement supérieure à celle des tumeurs (différence de score $p=0,02$) (Tableau 13).

Figure 45 Exemple d'immunomarquage de CD3 dans les tissus sains. Microscopie à fluorescence. Grossissement : x400.

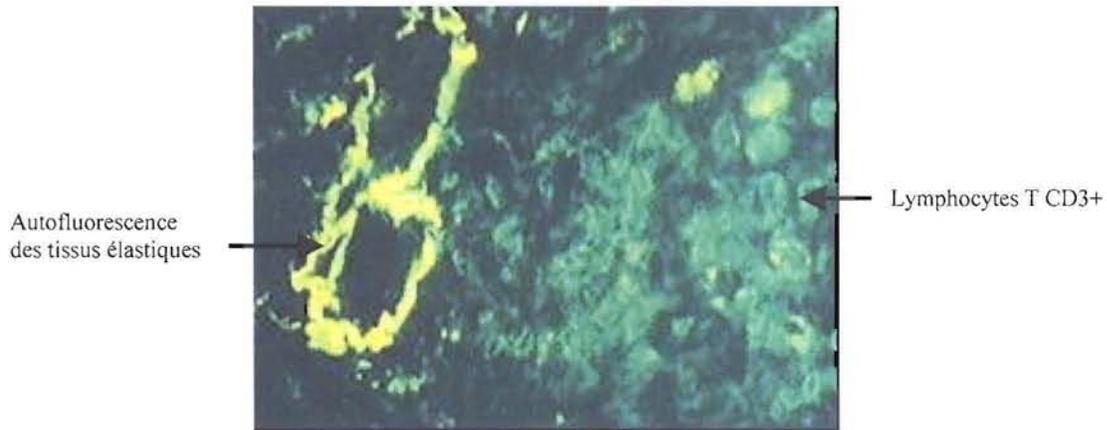
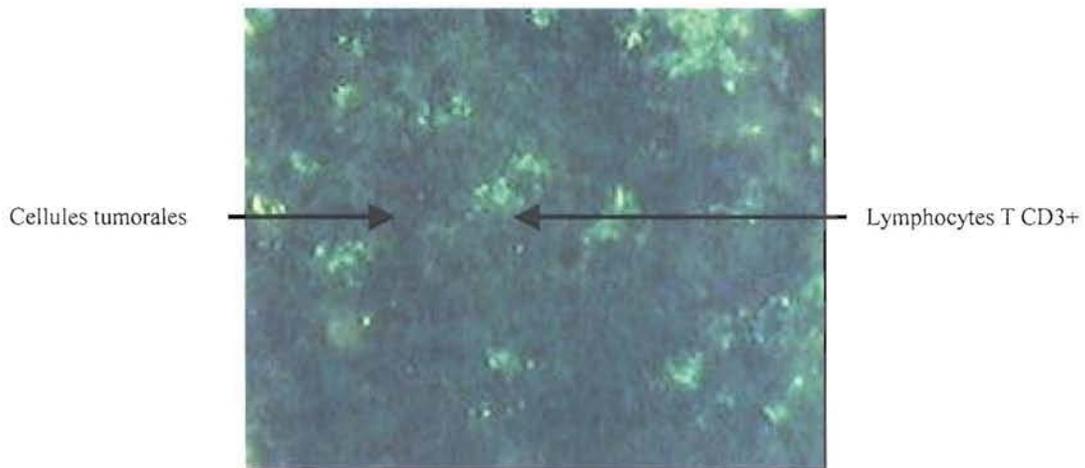


Figure 46 Exemple d'immunomarquage de CD3 dans les tumeurs. Microscopie à fluorescence. Grossissement : x400.



✓ Les lymphocytes T CD4+ étaient présents dans 19 tissus sains et dans 39 tumeurs sans différence marquée d'intensité de fluorescence. Cependant, l'intensité des cellules CD4+ était

légèrement supérieure dans les ganglions correspondants. Les lymphocytes T CD4+ représentaient 75% des cellules T des ganglions (Tableau 13).

✓ Dans les tissus sains, des cellules CD8+ étaient présentes dans 24 cas alors que 44 tumeurs en contenaient. L'expression de CD8 était significativement supérieure dans les tumeurs (différence de score $p=0,0006$). Les cellules CD8+ représentaient les deux tiers des cellules des infiltrats lymphocytaires des stroma réactions. Chez 41 patients les cellules CD8+ étaient visibles dans les îlots tumoraux, en contact étroit avec les cellules tumorales. La très grande majorité des cellules T éparses étaient CD8+, quel que soit le tissu considéré. Dans les ganglions, les cellules CD8+ représentaient 25% des cellules T (Tableau 13).

✓ Le complexe du TCR $\alpha\beta$ était faiblement exprimé dans les ganglions alors que les cellules T étaient très nombreuses dans ces tissus. Cette faible intensité de marquage a rendu difficile la visualisation du TCR $\alpha\beta$ sur les cellules T souvent éparses des tissus sains. Toutefois, la comparaison des tumeurs et des ganglions a révélé une diminution significative d'expression du TCR $\alpha\beta$ dans les tumeurs (comparaison de scores $p=0,01$ pour le nombre de cellules marquées, $p=0,007$ pour l'intensité de fluorescence). Une diminution d'expression du TCR $\alpha\beta$ dans les tumeurs a également été mise en évidence chez 10 des 17 patients chez qui la présence du TCR $\alpha\beta$ était détectée à la fois dans le tissu tumoral et ganglionnaire (Tableau 13).

✓ Les cellules TCR $\gamma\delta$ + et les cellules CD25+ étaient très rares ou absentes quelque soit le tissu. En effet un marquage de TCR $\gamma\delta$ a pu être observé seulement dans 6 tissus sains, 5 tumeurs et 4 ganglions. Un marquage de CD25 a été visualisé seulement dans 3 tissus sains, 6 tumeurs et 6 ganglions (Tableau 13).

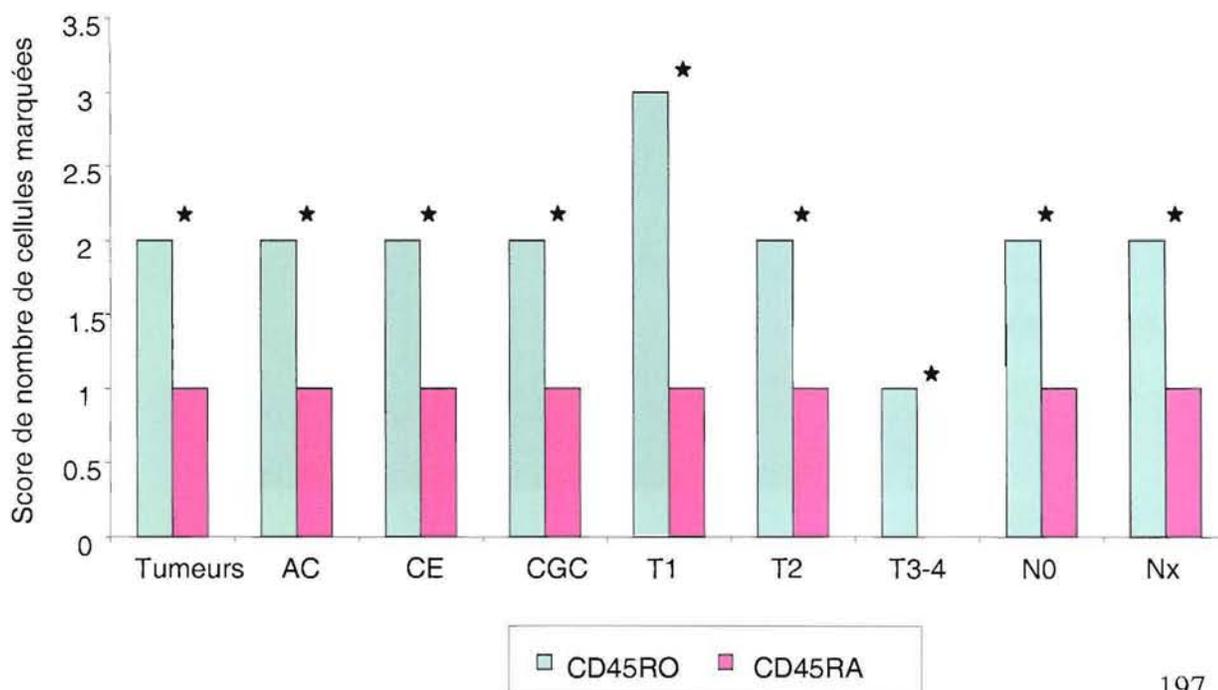
✓ CD45RA, présent sur les lymphocytes « naïfs » ou caractéristique d'une activation tardive de ces cellules, et CD45RO caractérisant les lymphocytes « mémoires », ont montré des différences d'expression en fonction du type tissulaire considéré. Des cellules CD45RA+ étaient présentes dans 18 tissus sains et dans 36 tumeurs. Des cellules CD45RO+ étaient

présentes dans 21 tissus sains et dans 39 tumeurs. Ces deux isotypes étaient très exprimés dans les ganglions dans des proportions similaires.

Dans les tumeurs, les deux isotypes CD45RA et CD45RO avaient une intensité de fluorescence significativement supérieure sur les TIL par rapport aux cellules éparses des tissus sains (comparaison de scores $p=0,0002$ pour CD45RA et $p=0,0001$ pour CD45RO). Lorsque CD45RA et CD45RO étaient tous les deux présents dans le tissu tumoral d'un patient donné, CD45RO était significativement exprimé à la surface de plus de cellules T que CD45RA ($p=0,01$). La même observation a été faite, dans les tumeurs, pour tous les types de tumeurs et à tous les stades d'évolution tumorale (Figure 47). Enfin, il a été observé que le nombre de cellules CD45RO+ diminuait lorsque la consommation tabagique des patients augmentait (médiane du nombre de cellules marquées : 3 <40 paquets-année (PA), 2 40-59 PA, 1 >60 PA) (Tableau 13).

Figure 47 **Comparaison de l'expression de CD45RO et CD45RA dans les tumeurs, selon le type de tumeur et les stades d'évolution tumorale en fonction de la classification TNM.**

Les données sont exprimées sous forme de médianes de scores de nombre de cellules marquées. ★ : significativement différent.



La $\beta 2$ microglobuline est un des composés du complexe multi-moléculaire de classe I du CMH, qui permet à toutes les cellules nucléées de présenter les antigènes endogènes. La $\beta 2$ microglobuline était exprimée de façon très intense sur les pneumocytes sains et les lymphocytes, dans les tissus sains. De même l'expression de la $\beta 2$ microglobuline était très intense à la surface des lymphocytes des ganglions intrapulmonaires.

En revanche, dans les tumeurs, l'expression de la $\beta 2$ microglobuline était très faible voire absente sur les cellules tumorales. Cette différence d'expression de la $\beta 2$ microglobuline entre les tissus sains et les tumeurs était statistiquement significative ($p=0,005$) (Tableau 13). De plus, une diminution d'expression de la $\beta 2$ microglobuline à la surface des pneumocytes tumoraux par comparaison aux pneumocytes sains a été observée chez 50 patients sur 51. De même, l'expression de la $\beta 2$ microglobuline était significativement diminuée à la surface des lymphocytes intratumoraux, comparé aux lymphocytes des tissus sains ($p=0,0002$) (Figure 48 et Figure 49).

Figure 48 **Exemple d'immunomarquage de la $\beta 2$ microglobuline dans les tissus sains. Microscopie à fluorescence. Grossissement : x400.**

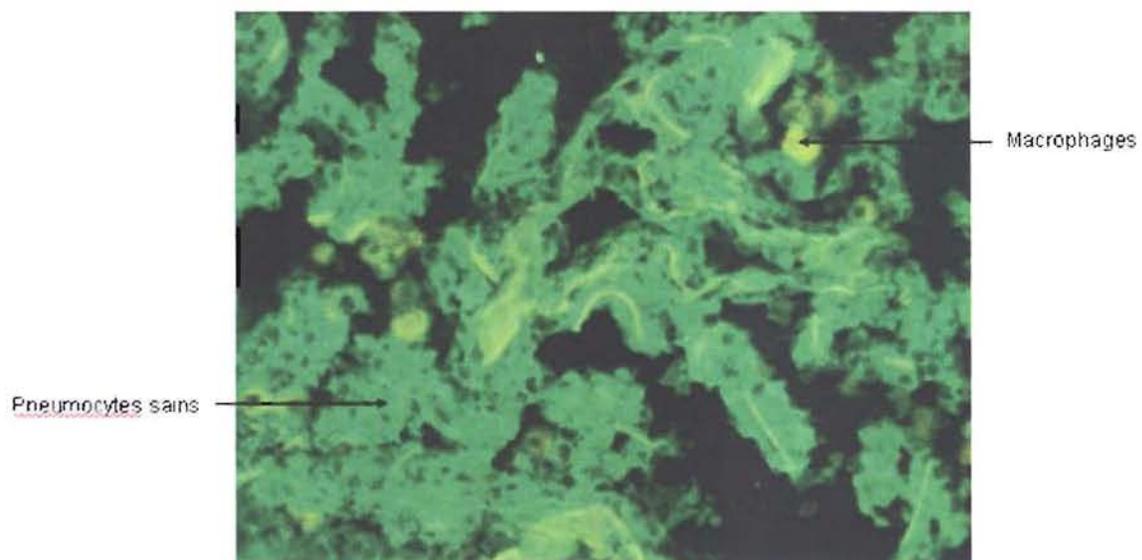


Figure 49 Exemple d'immunomarquage de la $\beta 2$ microglobuline dans les tumeurs.
Microscopie à fluorescence. Grossissement : x100.

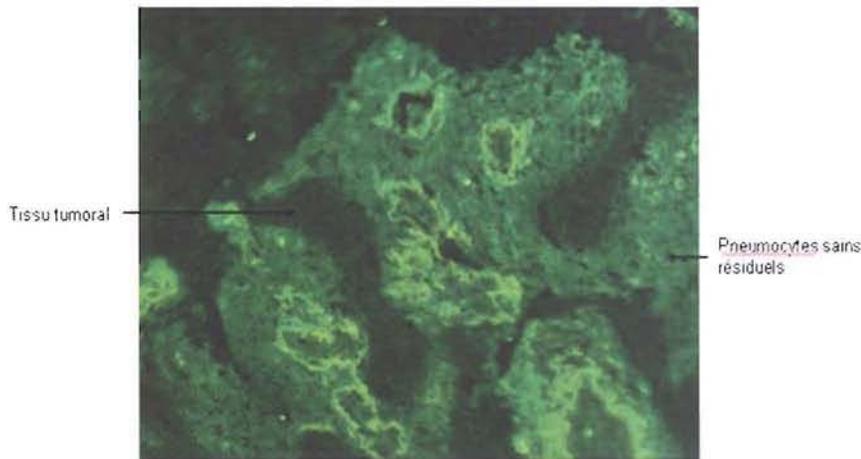
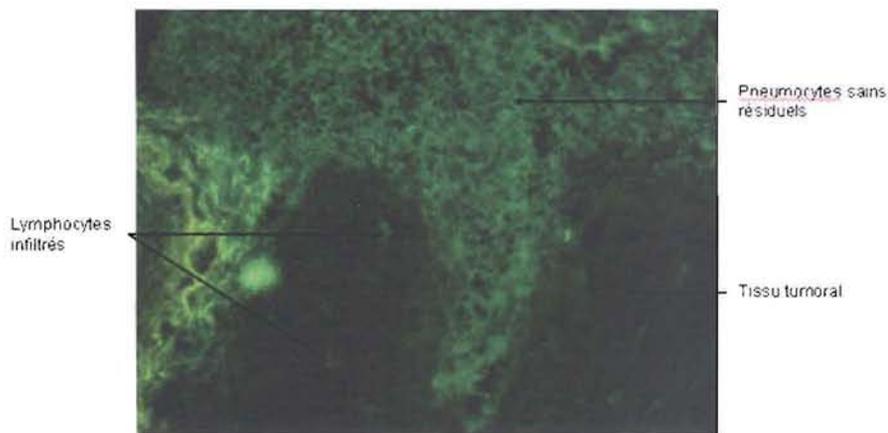


Figure 50 Exemple d'immunomarquage de la $\beta 2$ microglobuline dans les tumeurs.
Microscopie à fluorescence. Grossissement : x400.



✓ Le marqueur HLA-DR, complexe multi-moléculaire de classe II du CMH, était lui aussi et de façon plus surprenante, très exprimé à la surface des pneumocytes et des lymphocytes des tissus sains. HLA-DR était également très exprimé à la surface des lymphocytes ganglionnaires. En revanche, le complexe HLA-DR était absent ou rare à la surface des cellules tumorales par comparaison aux pneumocytes sains, et cette différence était significative (comparaison de scores : $p=0,008$) (Tableau 13). De plus, une diminution d'expression de HLA-DR à la surface des pneumocytes tumoraux par comparaison aux pneumocytes sains a été observée chez 45

patients. De même, l'intensité d'expression ainsi que le nombre de cellules marquées étaient significativement inférieurs à la surface des lymphocytes intratumoraux ($p=0,0001$) (Figure 51).

Figure 51 Exemple d'immunomarquage de HLA-DR classe II dans les tissus sains.
Microscopie à fluorescence. Grossissement : x400.

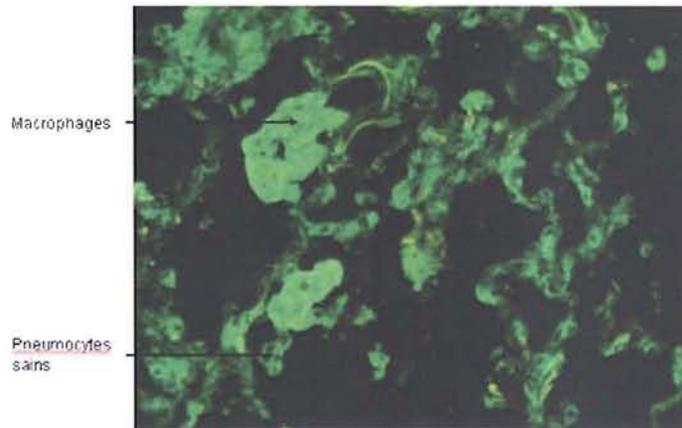


Figure 52 Exemple d'immunomarquage de HLA-DR classe II dans les tumeurs.
Microscopie à fluorescence. Grossissement : x100.

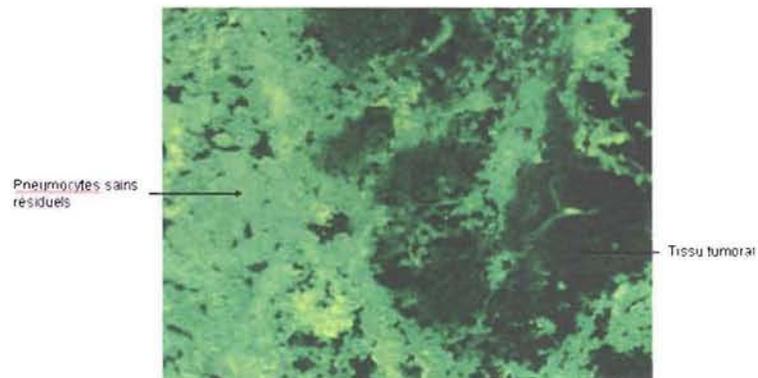
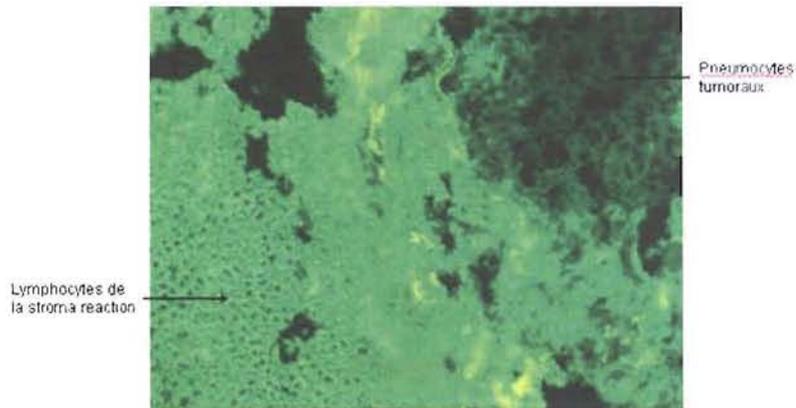


Figure 53 Exemple d'immunomarquage de HLA-DR classe II dans les tumeurs.
Microscopie à fluorescence. Grossissement : x400.



✓ Un discret marquage pour HLA-DQ, autre complexe multi-moléculaire de classe II du CMH n'a été observé que chez 35 patients dans les tissus sains, dans 34 tumeurs et chez 13 des 16 patients dont les ganglions ont été étudiés. Il n'a pas été observé de différence significative d'expression de HLA-DQ entre les tissus sains et tumoraux. En revanche l'expression de HLA-DQ était légèrement supérieure dans les ganglions comparés aux deux autres types de tissus (Tableau 13).

✓ Aucun marquage du complexe multi-moléculaire de classe II HLA-DP n'a été mis en évidence dans aucun type de tissu.

Tableau 13 Niveaux d'expression de marqueurs immunologiques dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires par immunofluorescence sur coupes à la congélation.

Les données sont exprimées sous forme de médianes de scores de cellules marquées et de scores d'intensité de fluorescence pour chaque marqueur et pour chaque type de tissu. Les scores sont exprimés suivant une échelle de 0 à 4. NB : nombre de cellules marquées, IF : intensité de fluorescence, β 2m : β 2 microglobuline.

Scores Marqueurs	NB Sains	NB Tumeurs	NB Ganglions	IF Sains	IF Tumeurs	IF Ganglions
CD3	0	3	2	0	2	3
CD4	0	2	3	0	2	2
CD8	0	1	1	0	2	3
TCR $\alpha\beta$	0	0	3	0	0	2
TCR $\gamma\delta$	0	0	0	0	0	0
CD45RO	0	2	2	0	2	2
CD45RA	0	1	2	0	2	2
CD25	0	0	0	0	0	0
β 2m sur lymphocytes	4	2	4	3	2	4
β 2m sur pneumocytes	0	2	0	0	0	0
HLA-DR sur lymphocytes	4	2	4	3	2	4
HLA-DR sur pneumocytes	0	2	0	0	0	0
HLA-DP	0	0	0	0	0	0
HLA-DQ	1	1	3	1	1	2

14.2.2. Expression comparée de différents marqueurs lymphocytaires et pneumocytaires en fonction du type de tumeur

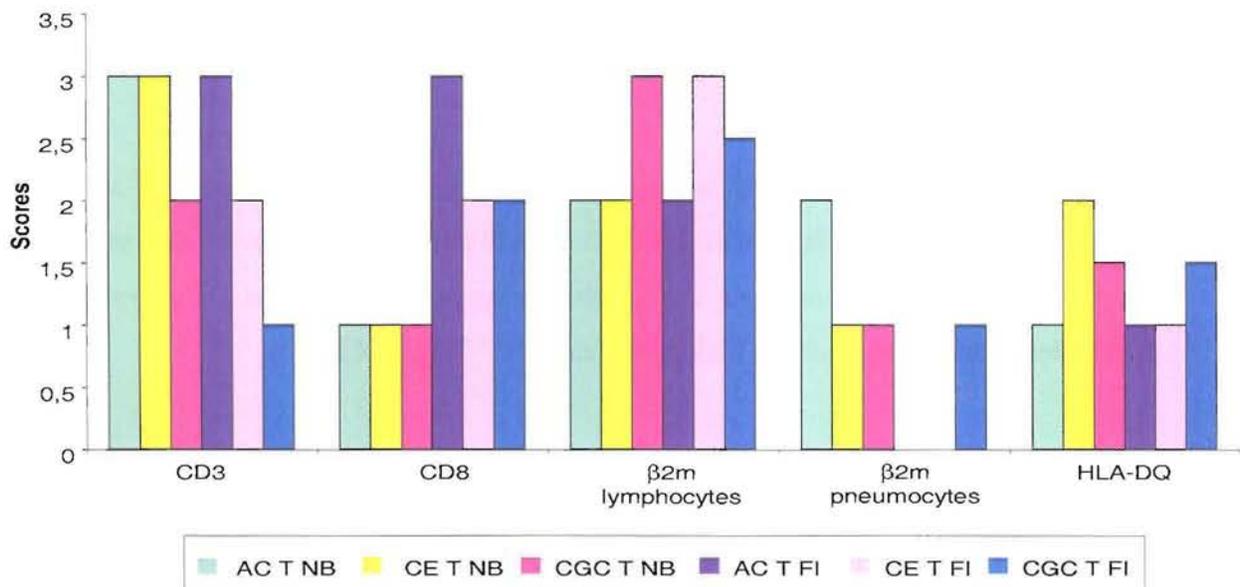
Dans les tissus sains, l'unique différence observée en fonction du type de cancer était le nombre de lymphocytes présents qui était supérieur chez les patients présentant un adénocarcinome par rapport à ceux présentant un carcinome épidermoïde.

Dans les tumeurs, de nombreuses différences d'intensité de fluorescence ont été mises en évidence. En particulier, les molécules CD3 et CD8 qui étaient exprimées plus intensément à la surface des cellules T infiltrant les adénocarcinomes qu'à la surface des lymphocytes T infiltrant les carcinomes épidermoïdes. (médiane d'IF : 3 AC, 2 CE).

En revanche, la β 2 microglobuline était exprimée plus intensément à la surface des pneumocytes et des lymphocytes dans les carcinomes épidermoïdes comparés aux adénocarcinomes (médiane : 2 AC, 3 CE). De même, HLA-DQ était exprimé à la surface de plus de pneumocytes et de lymphocytes dans les carcinomes épidermoïdes (médiane : 1 AC, 2 CE) (Figure 54).

Figure 54 **Comparaison des niveaux d'expression de CD3, CD8, β 2 microglobuline et HLA-DQ dans les tumeurs, en fonction du type de tumeur.**

Les données sont exprimées sous forme de médianes de scores de nombre de cellules marquées et d'intensité de fluorescence. β 2m : β 2 microglobuline

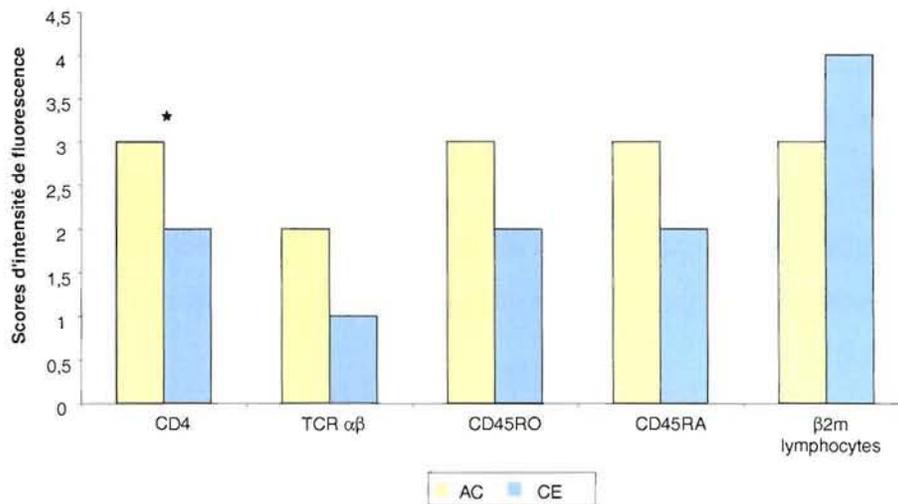


CD4, était exprimé significativement plus intensément dans les ganglions de patients présentant un adénocarcinome que dans ceux de patients présentant un carcinome épidermoïde (médiane : 3 AC, 2 CE, $p=0,03$). C'était également le cas pour le TCR $\alpha\beta$ avec une médiane de fluorescence de 2 pour les adénocarcinomes et de 1 pour les carcinomes épidermoïdes, CD45RA et CD45RO avec pour chacun une médiane de fluorescence de 3 pour les adénocarcinomes et de 2 pour les carcinomes épidermoïdes. HLA-DQ était, quant à lui, présent dans les ganglions de tous les patients pour lesquels un adénocarcinome avait été diagnostiqué alors que HLA-DQ était présent dans 3 ganglions des 5 patients présentant un carcinome épidermoïde.

La β 2 microglobuline était exprimée plus intensément dans les ganglions de patients présentant un carcinome épidermoïde (médiane : 3 AC, 4 CE) (Figure 55).

Figure 55 **Comparaison des niveaux d'expression de CD4, TCR $\alpha\beta$, CD45RA et CD45RO dans les ganglions, en fonction du type histologique de tumeur.**

Les données sont exprimées sous forme de médianes de scores d'intensité de fluorescence.



Dans les quatre cas de carcinomes à grandes cellules (CGC), des cellules CD3 étaient présentes trois fois dans le tissu sain alors qu'elles avaient été observées dans moins de 50% des cas dans le tissu sain des patients présentant des adénocarcinomes ou des carcinomes épidermoïdes. Cependant l'intensité d'expression de CD3 était moins forte dans les tumeurs des patients présentant un carcinome à grandes cellules que dans les adénocarcinomes (médiane : 2 AC, 1 CGC). Il en était de même pour l'expression de CD8 dans les tumeurs.

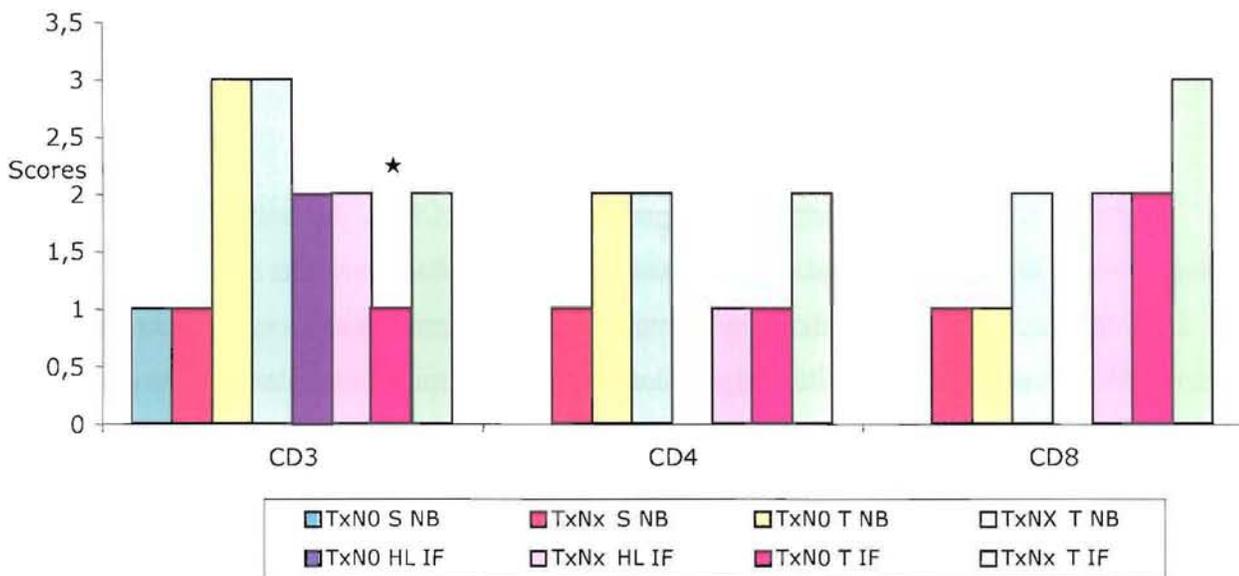
14.2.3. Expression comparée de différents marqueurs lymphocytaires et pneumocytaires en fonction du stade tumoral

Lorsqu'une extension tumorale aux ganglions pulmonaires proximaux était diagnostiquée (stade TxNx comparé au stade TxN0 selon la classification TNM), des lymphocytes infiltrant la tumeur ont été observés chez tous les patients. Les cellules T

cytotoxiques étaient plus nombreuses et CD8 était exprimé plus intensément dans les tissus sains des patients présentant une extension ganglionnaire. De plus, CD8 était exprimé plus intensément que CD4. Dans les tumeurs, l'intensité de fluorescence de CD3 était significativement supérieure chez les patients de stade TxNx en comparaison des patients de stade TxN0 ($p=0,03$) (Figure 56). Dans les ganglions, le nombre de cellules exprimant la $\beta 2$ microglobuline (médiane : 4 N0, 1 Nx) ainsi que HLA-DR (médiane 4 N0, 2 Nx) à leur surface était inférieur chez les patients présentant une extension tumorale ganglionnaire.

Figure 56 Comparaison des niveaux d'expression de CD3, CD4 et CD8 dans les tissus sains et les tumeurs en fonction de l'extension tumorale aux ganglions proximaux.

Les données sont exprimées sous forme de médianes de scores de nombre de cellules marquées et d'intensité de fluorescence. ★ : significativement différent.



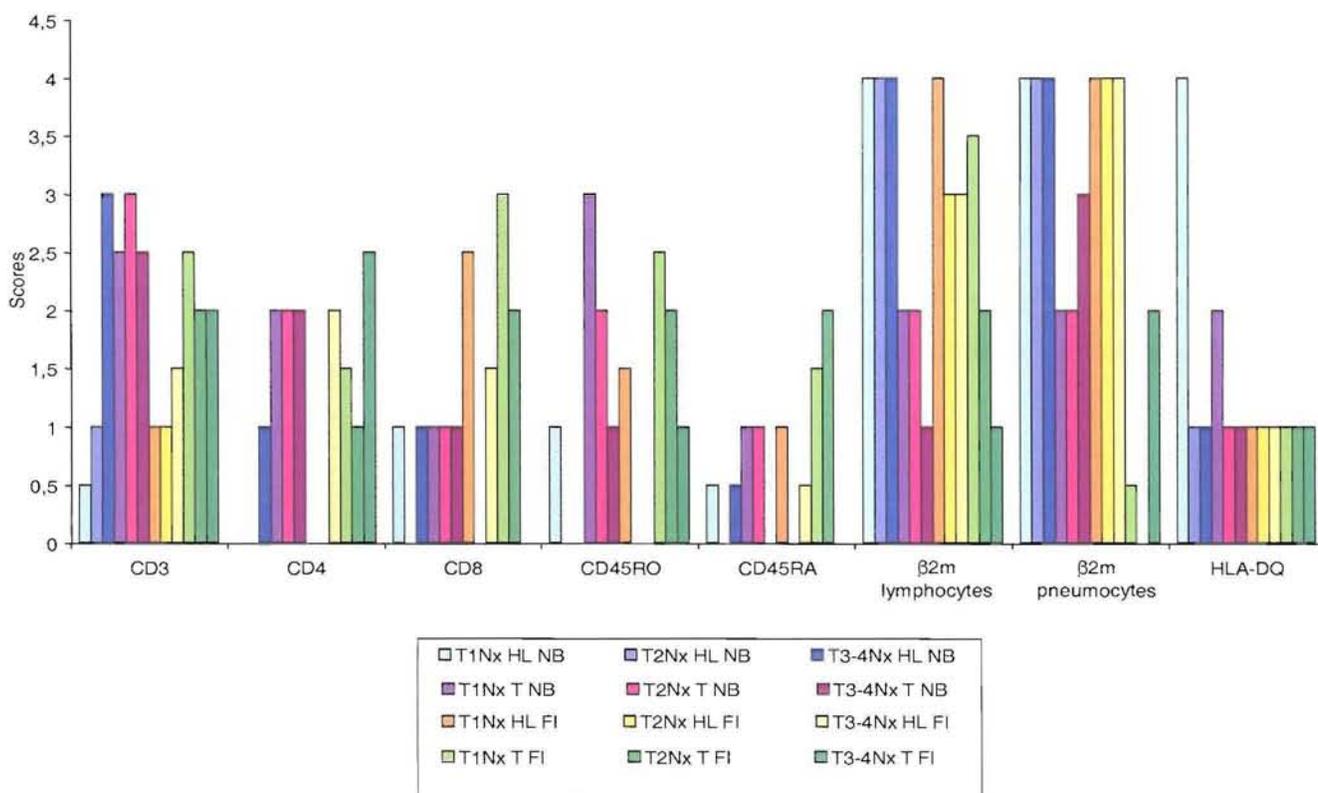
La présence de métastases n'était pas associée à des modifications d'expression notables des marqueurs étudiés. Toutefois, les quatre patients présentant des métastases présentaient plus de lymphocytes dans les tumeurs que dans les tissus sains avec une expression intense de CD3 et de CD8 à la surface des lymphocytes infiltrant les tumeurs.

L'analyse comparative de l'expression des différents marqueurs en fonction du stade d'évolution tumoral T de la classification TNM a révélé un certain nombre de différences. Ainsi, la proportion de patients avec une absence totale de lymphocytes dans le tissu sain et la tumeur diminuait lorsque le stade d'évolution tumorale augmentait pour disparaître complètement dans les stades les plus évolués (16,5% T1, 6% T2, 0% T3-4). De même, la proportion de patients présentant plus de lymphocytes dans la tumeur que dans le tissu sain diminuait lorsque le stade T augmentait (83,5% T1, 79% T2, 67% T3-4). Dans les tissus sains, le nombre de lymphocytes présents était supérieur aux stades T3 et T4 par comparaison aux autres stades. En revanche, aucune différence notable de l'infiltration lymphocytaire en fonction des stades T n'a été observée dans les tumeurs (Figure 57).

Dans les tissus sains, le nombre et l'intensité de fluorescence des cellules CD3+ et CD4+ augmentaient en fonction de l'évolution tumorale. En revanche, l'expression du TCR $\alpha\beta$, de CD45RO et de HLA-DQ diminuait en fonction des stades T croissants. Dans les tumeurs, l'expression de CD8, CD45RO, CD45RA, de la β 2 microglobuline et de HLA-DR diminuait également avec l'évolution tumorale (Figure 57).

Figure 57 Comparaison des niveaux d'expression de CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO, β 2 microglobuline et HLA-DQ dans les tissus sains et tumoraux en fonction des stades d'évolution tumorale T.

Les données sont exprimées sous forme de médianes de scores de nombre de cellules marquées et d'intensité de fluorescence.



14.2.4. Expression comparée de différents marqueurs lymphocytaires et pneumocytaires en fonction de l'âge des patients

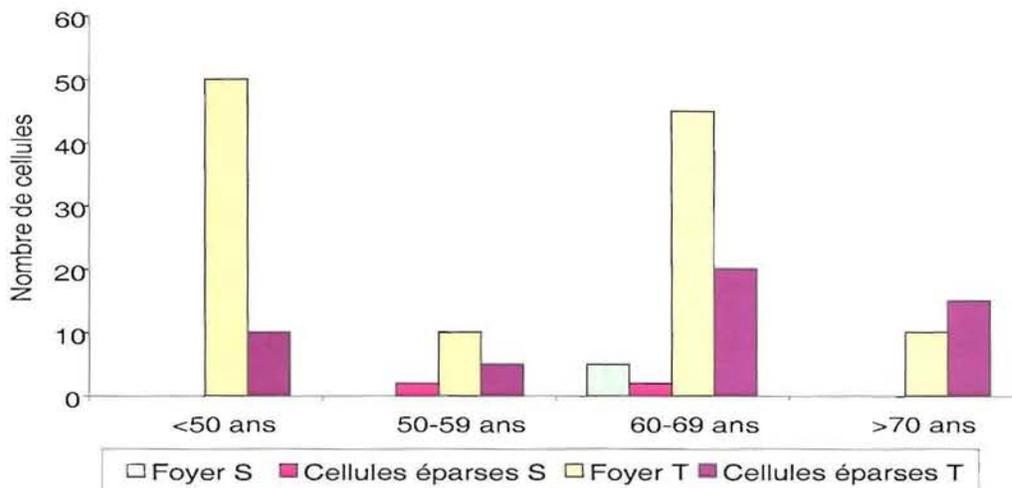
Chez les patients de moins de 50 ans, des lymphocytes étaient toujours présents à la fois dans la tumeur et le tissu sain. Chez ces patients, le tissu tumoral contenait plus de lymphocytes que le tissu sain. Le nombre de patients ne présentant aucune infiltration lymphocytaire quel

que soit le tissu considéré augmentait avec l'âge des patients (0% <50 ans, 11% 50-59 ans, 6% 60-69 ans et 17% >70 ans).

Dans les tissus sains, la présence de foyers lymphocytaires était rare. Cependant, chez les patients âgés de 60 à 69 ans, et uniquement chez eux, il a été observé de petits foyers contenant en moyenne : 800 ± 97 cellules/mm². De même, peu de cellules éparses étaient présentes dans les tissus sains, elles étaient présentes uniquement chez les patients âgés de 50 à 69 ans (moyenne : 500 ± 69 cellules/mm²) (Figure 58).

Dans les tumeurs, le nombre de cellules constituant les foyers variait beaucoup avec l'âge des patients, mais cette variation n'était pas homogène. Ainsi, les foyers lymphocytaires étaient importants dans les tumeurs des patients les plus jeunes, mais le nombre de cellules les constituant diminuait significativement chez les patients âgés de 50 à 59 ans. La taille des foyers lymphocytaires augmentait fortement chez les patients âgés de 60 à 69 pour diminuer à nouveau chez ceux âgés de plus de 70 ans. En effet, le nombre moyen de cellules constituant ces foyers dans les tumeurs était de 50 pour les patients de moins de 50 ans, de 10 cellules/foyer pour les patients âgés de 50 à 59 ans ($p=0,07$), de 45 cellules/foyer pour les patients âgés de 60 à 69 ans ($p=0,02$) et de 10 cellules/foyer pour les patients âgés de plus de 70 ans ($p=0,06$). Au niveau des cellules éparses dans les tumeurs, elles étaient significativement plus nombreuses chez les patients âgés de plus de 60 ans que chez les patients âgés de moins de 60 ans ($p=0,04$) (Figure 58).

Figure 58 **Comparaison du nombre de cellules constituant les foyers lymphocytaires et du nombre de cellules éparses dans les tissus sains et les tumeurs, en fonction de l'âge des patients.**



15. Productions cytokiniques des cancers bronchiques non-à petites cellules (CBNPC)

La présence de 11 cytokines différentes a été étudiée, dans les tissus sains et tumoraux de 10 patients, c'est à dire dans 20 échantillons tissulaires. La présence d'ARN messagers de ces cytokines rend compte de leur production dans les tissus. L'ARN total des échantillons a été obtenu par une extraction phénolique au Trizol puis les échantillons ont été amplifiés par reverse transcriptase polymérase chain reaction (RT-PCR). Les amplicons ont été additionnés de bromure d'éthidium puis analysés par électrophorèse en gel d'agarose et révélation aux UV.

Suite à l'étude de la stroma réaction sur cryocoupes, 10 patients ont été sélectionnés pour cette étude, 5 présentant une forte stroma réaction et 5 présentant une absence totale ou une très faible stroma réaction dans le tissu tumoral. Afin de confirmer les profils d'expression du TNF α et de l'interleukine 10 (IL-10), 30 patients ont été sélectionnés, 15 présentant une forte stroma réaction et 15 présentant une absence totale ou une très faible stroma réaction dans le tissu tumoral.

15.1. Amplification d'ARN cytokiniques

L'ensemble des résultats est résumé dans le Tableau 14 , le Tableau 15 et la Figure 59 .

15.1.1. Fréquence d'expression des ARNm de cytokines

✓ Interféron γ (IFN γ) :

L'IFN γ était la cytokine la plus exprimée dans le CBNPC puisqu'il était présent dans 75% des tissus testés pour cette cytokine. L'IFN γ était exprimé dans plus de la moitié des tissus sains (70%) avec une très nette prédominance pour les stroma réaction faibles ou absentes (71%). L'IFN γ était également présent dans la quasi totalité des tumeurs (80%) avec cette fois

une fréquence d'apparition nettement supérieure dans les tumeurs présentant une forte stroma réaction.

✓ Interleukine 6 (IL-6) :

L'IL-6 était très fréquemment exprimée dans les CBNPC puisqu'elle était présente dans 70% des tissus indépendamment de l'importance de la stroma réaction. L'IL-6 était exprimée dans 60% des tissus sains et 80% des tumeurs, sans différence d'expression en fonction de la taille de la stroma réaction.

✓ Growth Related Oncogene α (GRO α) :

GRO α était présent dans la moitié des tissus avec une fréquence légèrement supérieure dans les tissus des patients présentant une forte stroma réaction (60%). GRO α était faiblement présent dans les tissus sains des CBNPC (30%) et était uniquement présent dans les tissus sains de patients présentant une forte stroma réaction. Dans les tumeurs, GRO α était présent dans la majorité des tissus (70%) avec une expression légèrement supérieure dans les tumeurs présentant une faible stroma réaction.

✓ Interleukine 10 (IL-10) :

L'IL-10 était présente dans 45% des cas avec une distribution globale indépendante de l'importance de la stroma réaction. L'IL-10 était exprimée dans 33% des tissus sains. Elle était présente dans la majorité des tumeurs (57%) et était plus exprimée dans les tumeurs avec une forte stroma réaction associée.

✓ Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) :

MCP-1 était exprimé dans 45% des cas, principalement dans les tissus de patients présentant une forte stroma réaction (67%). MCP-1 était peu représenté dans les tissus sains et était exprimé uniquement dans les tissus présentant une stroma réaction importante. MCP-1 était également présent dans la majorité des tumeurs (60%) mais sans différence d'expression en fonction de l'importance de la stroma réaction.

✓ Tumor Necrosis Factor α (TNF α) :

Le TNF α était exprimé dans 25 tissus sur 60 testés, c'est à dire dans 42% des cas. Le TNF α était plus fréquemment exprimé dans les tissus présentant une forte stroma réaction (60%). Le TNF α était peu exprimé dans les tissus sains (20%), sans différence d'expression selon l'importance de la stroma réaction. En revanche, le TNF α était exprimé dans la majorité des tumeurs (63%) et cette cytokine était présente plus fréquemment dans les tissus de patients présentant une forte stroma réaction (63%).

✓ Angiogénine (ANG) :

L'angiogénine était présente dans 40% des cas avec une nette prédominance d'expression dans les tissus de patients présentant une forte stroma réaction (67%). L'expression de l'angiogénine dans les tissus sains et les tumeurs était comparable à celle de GRO α .

✓ Epithelial Neutrophil-Activating 78 (ENA-78) :

ENA-78 est peu représenté dans le CBNPC, il était exprimé dans 35% des cas. ENA-78 était un peu plus fréquemment exprimé dans les tissus de patients présentant une forte stroma réaction (57%). Sa présence a été mise en évidence dans 20% des tissus sains et dans la moitié des tumeurs avec une expression préférentielle dans les tumeurs de patients présentant une forte stroma réaction.

✓ RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and presumably Secreted) :

RANTES était également peu exprimé dans le CBNPC (30% des tissus) sans différence de fréquence d'expression liée à l'importance de la stroma réaction. Cette cytokine n'était exprimée que dans un seul tissu sain présentant une stroma réaction importante. Elle était exprimée dans la moitié des tumeurs avec une expression supérieure dans les tumeurs dépourvues de stroma réaction ou avec une stroma réaction faible.

✓ Tumor Growth Factor β (TGF β) :

Le TGF β était peu exprimé dans le CBNPC puisque son expression n'a été mise en évidence que dans 25% des tissus avec une nette prédominance dans les tissus présentant une forte stroma réaction (80%). Il n'était jamais exprimé dans les tissus sains. En revanche, le TGF β était présent dans la moitié des tissus tumoraux testés avec une très forte prédominance dans les tumeurs présentant une stroma réaction importante (80%).

- **Comparaison des niveaux d'expression des différentes cytokines dans les tissus sains**

Dans les tissus sains, l'INF γ était la cytokine la plus représentée avec 70% d'expression, suivie par l'IL-6 (60%). Venaient ensuite l'IL-10, GRO α , MCP-1 et ANG qui étaient exprimés dans environ 30% des cas. Le TGF β était totalement absent des tissus sains. L'INF γ était significativement plus exprimé que RANTES dans les tissus sains ($p=0,02$).

Si l'on compare les niveaux d'expression des diverses cytokines en fonction de l'importance de la stroma réaction dans les tissus sains, il est apparu que RANTES, GRO α , MCP-1 et ANG étaient exprimés uniquement dans les tissus sains de patients présentant une forte stroma réaction ($p=0,0143$). A l'inverse, l'INF γ était principalement exprimé dans les tissus de patients ne présentant pas de stroma réaction ou avec une stroma réaction faible.

- **Comparaison des niveaux d'expression des différentes cytokines dans les tumeurs**

Dans les tumeurs, l'INF γ et l'IL-6 étaient les cytokines les plus fréquemment exprimées (80%), suivies de GRO α (70%), du TNF α , de MCP-1 et de l'IL-10 (~60%). Les autres cytokines étaient exprimées dans la moitié des tumeurs. L'INF γ était significativement plus exprimé que ANG, ENA-78, RANTES et le TGF β ($p=0,033$).

Si l'on compare les niveaux d'expression des diverses cytokines en fonction de l'importance de la stroma réaction dans les tumeurs, il est apparu que le TGF β était très majoritairement exprimé dans les tumeurs avec forte stroma réaction (80%, $p=0,0027$). Le

TNF α , l'INF γ , l'IL-10 et ENA-78 étaient également plus exprimés dans les tumeurs présentant une stroma réaction importante (~60%). En revanche, RANTES, GRO α et ANG étaient plus fréquents dans les tumeurs présentant une stroma réaction faible ou absente (~60%).

- Comparaison des niveaux d'expression des différentes cytokines dans les tumeurs et les tissus sains

Toutes les cytokines étudiées étaient plus exprimées dans les tumeurs que dans les tissus sains. Le TGF β était exprimé exclusivement dans les tumeurs (p=0,033). RANTES (83%) suivi du TNF α qui était plus exprimé dans les tumeurs que dans les tissus sains (p=0,003), ENA-78 et MCP-1 étaient les autres cytokines les plus majoritairement exprimées dans les tumeurs (~70%). L'INF γ et l'IL-6 étaient quant à elles presque autant présentes dans les tissus sains que dans les tumeurs.

Si l'on compare ces résultats en fonction de l'importance de la stroma réaction, il n'est pas apparu de cytokine exprimée majoritairement en SRF ou SRI pour les deux tissus. Cependant certaines cytokines comme le TNF α , l'IL-10, l'IL-6 et ENA-78 avaient une expression égale en SRI et SRF dans les tissus sains mais étaient plus exprimées dans les tumeurs avec une stroma réaction importante. En revanche, l'INF γ était plus exprimé en SRF dans les tissus sains et en SRI dans les tumeurs. A l'inverse, RANTES, GRO α et ANG étaient très légèrement plus exprimés en SRI dans les tissus sains et en SRF dans les tumeurs

Tableau 14 Expression comparée de dix cytokines dans l'ensemble des tissus pulmonaires sains et tumoraux testés.

Les résultats sont exprimés systématiquement en nombre de cas positifs (NB) et en pourcentages (%). SRI : Stroma Réaction Importante, SRF : Stroma Réaction Faible. Dans les colonnes tissus sains et tumeurs, 10 patients ont été testés sauf pour les cytokines TNF α et IL-10 pour lesquelles 30 patients ont été testés. Le pourcentage d'expressions pour les colonnes SRI et SRF est calculé par rapport au nombre de cas où la cytokine est exprimée dans les tissus pulmonaires sains ou tumoraux .

Cytokines	Tous tissus		Tissus sains				Tumeurs			
	NB	%	NB	% par rapport au total	% SRI	% SRF	NB	% par rapport au total	% SRI	% SRF
TNFα	25	42	6	24	50	50	19	76	63	37
IFNγ	71	75	7	47	29	71	8	53	63	37
IL-10	27	45	10	37	50	50	17	63	59	41
TGFβ	5	25	0	0	0	0	5	100	80	20
RANTES	6	30	1	17	100	0	5	83	40	60
GROα	10	50	3	30	100	0	7	70	43	57
MCP-1	9	45	3	33	100	0	6	67	50	50
ANG	8	40	3	37	100	0	5	63	40	60
IL-6	14	70	6	45	50	50	8	57	50	50
ENA-78	7	35	2	29	50	50	5	71	60	40

Figure 59 **Pourcentage d'expression de dix cytokines dans l'ensemble des tissus sains et des tumeurs.**

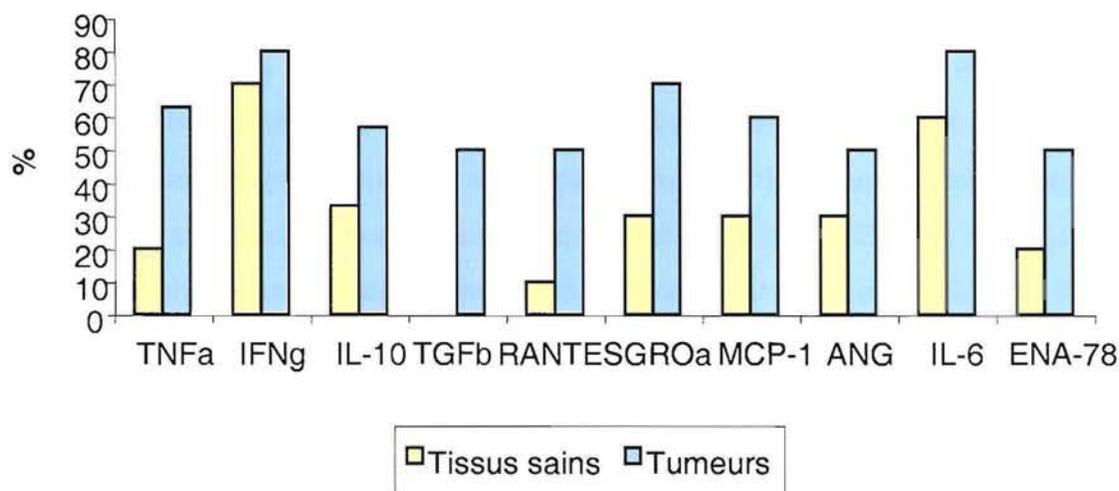


Tableau 15 Test de significativité statistique Khi2 pour l'ensemble des cytokines étudiées.

Les valeurs en gras sont statistiquement significatives

	TNFα	IFNγ	IL-10	TGFβ	RANTES	GROα	MCP-1	ANG	IL-6	ENA78
TNFα		0,025	0,3	0,31	0,51	0,53	0,75	1	0,057	0,74
IFNγ			0,016	0,0016	0,0044	0,102	0,05	0,025	0,72	0,01
IL-10				1	0,72	0,1	0,18	0,3	0,004	0,49
TGFβ					0,72	0,1	0,18	0,31	0,004	0,49
RANTES						0,19	0,33	0,51	0,011	0,74
GROα							0,75	0,53	0,2	0,34
MCP-1								0,75	0,11	0,52
ANG									0,057	0,74
IL-6										0,027

DISCUSSION

Des cellules tumorales apparaissent fréquemment dans l'organisme, mais sont la plupart du temps éliminées par le système immunitaire. Cependant, au stade avancé de la cancérogenèse que représentent les tumeurs accessibles à la chirurgie, la surveillance immune a été mise en échec (Zimmermann, 2005). Les travaux de la littérature montrent que les cellules tumorales utilisent différents mécanismes afin de diminuer leur reconnaissance et leur destruction par les cellules du système immunitaire :

- ✓ Modulation d'expression du complexe CD3/TCR à la surface des TIL
- ✓ Induction de l'apoptose des TIL par le complexe Fas/Fas L
- ✓ Diminution d'expression des molécules du CMH à la surface des cellules tumorales
- ✓ Production de cytokines immunosuppressives
- ✓ Absence de signaux de costimulation
- ✓ Diminution de l'expression des antigènes tumoraux ou altération de ces peptides (Platsoucas, 2003).

L'étude de la clonalité des lymphocytes T de la stroma réaction des cancers bronchiques non-à petites cellules a permis dans ce travail de mettre en évidence l'existence d'une restriction d'utilisation des répertoires V β et V γ suggérant une oligclonalité de ces lymphocytes T caractérisée par :

- ✓ l'existence de clones V β dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires.
- ✓ la mise en évidence de l'existence de 19 bandes distinctes en DGGE/TTGE. En effet, les amorces de PCR utilisées couvrant la globalité du TCR V γ , la présence d'une bande représentait la signature d'un clone particulier de cellules T.

L'existence de clones de V β et de V γ a été mise en évidence à la fois dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires, à des fréquences variables. La présence de clones dans les

ganglions était un résultat attendu puisque les ganglions sont des organes lymphoïdes secondaires constitués de cellules immunitaires, dont de nombreux lymphocytes T et B. En revanche, la présence de clones de cellules T dans les tissus pulmonaires sains est beaucoup plus surprenante. En effet, chez des sujets sains, le système immunitaire effectue une surveillance à grande échelle afin de détecter des agents pathogènes ou des cellules néoplasiques éventuelles. Le répertoire du TCR utilisé doit être maximal afin d'obtenir une surveillance immune optimale (Goldsby, 2000).

L'étude immunohistologique a montré que le tissu pulmonaire sain est caractérisé par une faible densité de lymphocytes mais qu'il existe des foyers lymphocytaires dans beaucoup de tissus sains chez les fumeurs et que ces lymphocytes présentent un répertoire restreint de segments V β du TCR où de petits clones utilisant V β 3, V β 7.2, V β 8, V β 12, V β 14, V β 16, V β 20 et V β 21.3 sont les plus fréquents. Cette restriction de répertoire est confirmée par la présence de 6 bandes V β récurrentes dans les tissus sains. Le tabagisme peut provoquer des inflammations chroniques du tractus respiratoire conduisant à un biais d'utilisation du répertoire du TCR $\alpha\beta$ caractérisant une oligoclonalité (Korn, 2005). De même, dans un certain nombre de maladies pulmonaires, dont certaines peuvent être liées au tabac, il a été mis en évidence une oligoclonalité des lymphocytes T. Ainsi, un travail de Shimizudani et collaborateurs (2001), a montré, par PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) suivie d'un séquençage des gènes V β du TCR, qu'il existe une oligoclonalité des lymphocytes T périphériques, provenant de liquides de lavage bronchoalvéolaire, avec récurrence de huit clones : V β 3, 4, V β 5, V β 8, V β 9, V β 12, V β 18 et V β 20 chez une patiente atteinte de bronchite chronique à éosinophiles. Cinq de ces clones (V β 3, V β 4, V β 8, V β 12 et V β 20) sont communs avec les clones les plus fréquemment rencontrés dans nos propres travaux dans le parenchyme sain comme dans les stroma réactions tumorales. De même, une oligoclonalité des lymphocytes T périphériques a été mise en évidence dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire de patients présentant une fibrose pulmonaire idiopathique (Shimizudani, 2002), une sarcoïdose (Jones, 1996 ; Usui, 1996) ou une alvéolite allergique (Murayama, 1995).

De plus, une étude de Burastero et collaborateurs (1996) sur cinq patients, a montré, par PCR suivie d'une analyse en hétéroduplex, qu'il n'existe pas d'oligoclonalité des lymphocytes T $\alpha\beta$ dans le poumon de non fumeurs en bonne santé. Il est donc possible de considérer que ces clones soient spécifiques de lésions très précoces pré-tumorales liées au tabac.

Ces résultats sont également confortés ici par la mise en évidence du caractère polyclonal des lymphocytes du sang périphérique chez des patients atteints de cancer du poumon. Ceci renforce l'idée d'une localisation tissulaire spécifique de ces clones.

Une partie des clones observés dans le tissu tumoral étaient également présents dans les ganglions régionaux, suggérant la circulation de ces cellules T entre la tumeur et le tissu lymphoïde correspondant. Ceci est en accord avec les données de la littérature dans d'autres types de cancers comme le cancer du sein (Allan, 2004), du col de l'utérus (Santin, 2001) ou du pancréas (Von Bernstorff, 2001), ainsi que dans les cancers bronchiques non-à petites cellules (Meta, 1995).

Toutes les cellules T exprimant un TCR $\alpha\beta$ ont préalablement réarrangé leur TCR $\gamma\delta$ au cours de la maturation intrathymique. La plupart de ces réarrangements sont non-productifs, cependant ils peuvent être détectés dans l'ADN. Ceci implique que, dans un clone donné, tous les lymphocytes T $\alpha\beta$ possèdent non seulement le même TCR, mais également le même réarrangement de leur chaîne γ . Les lymphocytes T portant un TCR $\alpha\beta$ reconnaissent exclusivement les antigènes sous forme de peptides présentés par des molécules du CMH. Ces lymphocytes circulent intensément entre la circulation périphérique, les organes lymphoïdes et les tissus afin d'effectuer la surveillance immune. Leur TCR doit ainsi reconnaître l'antigène avec un très haut degré de spécificité, et les réarrangements des segments géniques des chaînes $\alpha\beta$ permettent de produire 10^{13} spécificités différentes (Goldsby, 2000). Les lymphocytes portant un TCR $\gamma\delta$ reconnaissent quant à eux des antigènes sous forme de composés non peptidiques ou de protéines intactes. Ils sont de plus généralement fixes et ont accès à une variété réduite d'antigène. Les TCR $\gamma\delta$ présentent donc une variabilité restreinte (Allison, 2001).

Lors du réarrangement du TCR, lorsque le réarrangement $\gamma\delta$ n'est pas productif, le réarrangement de la chaîne β a lieu et lorsque ce réarrangement β est productif il existe un temps d'arrêt dans le processus de réarrangements. En effet, le lymphocyte T portant un réarrangement productif va proliférer avant de terminer la construction de son TCR par les réarrangements de la chaîne α . Ainsi chaque chaîne β fonctionnelle est associée avec beaucoup de chaînes α différentes dans les cellules progénitrices. L'analyse des réarrangements de la

chaîne β informent donc sur une restriction éventuelle d'utilisation de répertoire mais n'est pas synonyme d'une clonalité stricte, contrairement à l'étude des réarrangements de la chaîne γ (Janeway, 2001).

Un segment $V\beta$ -beta ($V\beta 13.1$) semble spécifique des carcinomes épidermoïdes en ce sens qu'il est absent des tissus sains des mêmes patients. Il n'a en revanche pas été observé de restriction intratumorale particulière dans le cas des adénocarcinomes.

Toutefois, il existe des différences dans les restrictions de répertoire identifiées avec les deux techniques utilisées. On observe en effet un clone $\alpha\beta$ intratumoral absent du tissu sain uniquement pour les carcinomes épidermoïdes alors que deux clones gamma semblent spécifiques des adénocarcinomes et un des carcinomes épidermoïdes.

L'étude du répertoire $V\beta$ met en évidence des TCR fonctionnels et exprimés à la surface des cellules. Le clone observé dans les carcinomes épidermoïdes pourrait donc être spécifique d'un antigène tumoral. A l'inverse, l'amplification du gène V-gamma, toujours réarrangé mais généralement non fonctionnel, reflète plutôt, lorsqu'elle met en évidence une restriction de répertoire, l'existence de lymphocytes T dérivés d'une cellule initiale unique, donc une prolifération locale. Les résultats observés ici suggèrent donc que les lymphocytes recrutés dans la stroma réaction des adénocarcinomes utilisent des segments $V\beta$ similaires à ceux présents dans le tissu sain des fumeurs, ou non explorés par la technique utilisée qui recouvre 70 % des segments $V\beta$ du répertoire. Dans les deux cas, l'amplification de segments V-gamma restreints indique par ailleurs la prolifération in situ de plusieurs clones de lymphocytes (oligoclonalité). Ces deux caractéristiques, de recrutement et de prolifération locale, sont confortées par la mise en évidence en immunofluorescence sur ces cellules des isoformes CD45RA et CD45RO. Les cellules portant l'isoforme CD45RA sont soit des cellules naïves récemment recrutées, soit des cellules mémoire réactivées ou venant de terminer une réponse immunitaire (Seddiki, 2005) Les cellules CD45RA+ naïves, lorsqu'elles rencontrent l'antigène, prolifèrent clonalement et se différencient en cellules effectrices ou en cellules mémoires. Les cellules mémoires CD45RO+, issues d'un lymphocyte ayant reconnu l'antigène, se distinguent des cellules naïves par de nombreuses propriétés fonctionnelles telles que la capacité de générer une réponse immune en présence de quantités inférieures d'antigènes, une prolifération plus rapide en réponse à la stimulation antigénique, l'acquisition plus rapide des fonctions effectrices, la production de plus

de types cytokiniques et la possession d'un plus grand pattern de molécules d'adhésion leur permettant de migrer vers les tissus périphériques. Les cellules mémoires sont de plus en plus dépendantes de la stimulation antigénique par les cellules présentatrices d'antigène que les cellules naïves et peuvent continuer de se multiplier en périphérie longtemps après la stimulation antigénique (Beckhove, 2004, Béné, 1998, Kufer, 2001).

Les quelques études réalisées sur l'oligoclonalité des lymphocytes T dans la stroma réaction des cancers bronchiques non-à petites cellules ont comparé les TIL avec les lymphocytes du sang périphérique des mêmes patients, mais pas avec ceux des tissus sains et ganglionnaires. Une analyse, par PCR à haute résolution, de Echchakir et collaborateurs (1999), portant sur 9 patients, a montré que les clones V β 16 et V β 17, V β 12, V β 23 et V β 24 et V β 20 et V β 21 (selon les patients) étaient plus exprimés dans les tumeurs que dans le sang périphérique. Cette étude montrait également que les TIL mis en culture et activés à l'IL-2 présentent une oligoclonalité plus marquée que celle des lymphocytes infiltrant la tumeur « frais ». De plus, certaines spécificités V β ne sont pas exprimées parmi les lymphocytes mis en culture et activés par l'IL-2, ce qui suggère l'importance de réaliser les analyses de clonalité des lymphocytes T sur des lymphocytes intratumoraux fraîchement isolés, sans culture préalable. Ceci suggère également qu'une réorientation de la restriction d'utilisation du répertoire du TCR $\alpha\beta$ pourrait être possible en cultivant les TIL et en les activant avec des cytokines appropriées telle l'IL-2.

La DGGE est une méthode efficace pour l'étude des clones lymphocytaires qui a été largement appliquée au diagnostic et à l'exploration des lymphomes T (Cordel, 2001 ; Abou-Ellella, 2000 ; Theodorou, 1996). Ces études sont réalisées à des fins essentiellement diagnostiques ou de recherche génomique. Les études de tissus réactionnels sont très rares et la stroma réaction tumorale a été étonnamment peu étudiée dans la littérature avec cette approche. La quasi totalité des études ont été réalisées en biologie moléculaire, par amplification en PCR d'ADN (comme ici dans la technique de DGGE) ou, le plus souvent, d'ADN complémentaire généré à partir des mARN extraits des cellules. Ces travaux détectent, comme dans ce travail, un certain degré d'oligoclonalité dans la stroma réaction, avec une restriction d'utilisation du répertoire V β . Une étude de Peoples et collaborateurs (1993), a montré que les segments V β 6 et

V β 2, surtout, mais aussi V β 3, V β 7, V β 8 et V β 13.1, sont fréquemment utilisés par les lymphocytes infiltrant les cancers ovariens. Les cellules T cytotoxiques spécifiques des tumeurs mammaires et pancréatiques expriment majoritairement trois segments V β dans leur TCR : V β 9, V β 13.1 et V β 17 (Kirii, 1998). Dans le carcinome colorectal, les clones V β 9, 3 et V β 4 sont les plus fréquents (Baier, 1998). Seul le clone V β 13.1, présent dans les tumeurs mais absent des tissus sains dans notre étude, apparaît être commun dans la réaction immunitaire impliquée dans ces différents types de cancers. Le segment V β 3, très exprimé dans les cancers ovariens et colorectaux, est également un des clones V β que nous avons observé le plus fréquemment dans le cancer du poumon. Le clone V β 8 est fréquent à la fois dans les tumeurs bronchiques et ovariennes.

L'étude immunohistologique a permis de mettre en évidence la présence d'une stroma réaction d'importance variable dans les tissus tumoraux. La stroma réaction du cancer bronchique est variable en fonction du patient, du type de tumeur, de son stade de différenciation, mais aussi de beaucoup d'autres facteurs comme le tabagisme ou les gènes d'histocompatibilité (Vignaud, 1998).

Les lymphocytes sont très présents dans la stroma réaction puisque les tumeurs contiennent significativement plus de lymphocytes que les tissus sains. L'étude immunohistologique montre que les lymphocytes T de la stroma réaction des cancers bronchiques non-à petites cellules sont en grande majorité organisés en foyers péritumoraux et qu'une proportion plus ou moins grande de lymphocytes T peuvent être intratumoraux (tumor infiltrating lymphocytes ou TIL), ce qui est en accord avec les résultats de la littérature dans le cancer bronchique (Vignaud, 1998), ainsi que dans d'autres types de tumeurs comme le cancer du sein (Coronella, 2001 ; Fierabracci, 2006) ou le cancer colorectal (Menon, 2003).

Ce travail a confirmé que la stroma réaction est constituée de lymphocytes T CD3+, avec une répartition topographique différente des sous populations CD4+ et CD8+. Cependant, l'expression de CD3 est significativement moins intense dans les tumeurs par comparaison aux tissus et aux ganglions. Dans les ganglions, les cellules CD4+ sont quatre fois plus fréquentes que les cellules CD8+. A l'inverse, le ratio CD4+/CD8+ est inversé dans les tissus sains ainsi que dans les tumeurs.

La modulation d'expression du complexe CD3/TCR à la surface des TIL, dans le cancer bronchique, a été très peu étudiée. Dans cette étude, les résultats de cytométrie en flux et d'immunohistologie ont montré une très nette diminution d'expression de CD3 dans les tumeurs en comparaison aux ganglions, ce qui est a été confirmé par l'immunophénotypage en cytométrie de flux. Donc les lymphocytes T infiltrant les tumeurs sont présents mais sont inertes ou réprimés. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature mettant en évidence la diminution d'expression de CD3 dans de nombreux types de cancers, en particulier dans le cancer de la tête et du cou (Whiteside, 2004 ; Shibuya, 2002), les carcinomes rénaux (Tartour, 1995) et ORL (Reichert, 2001), les mélanomes (Rabinowich, 1996), les mésothéliomes (Jarnicki, 1996) et les effusions pleurales (Sikora, 2002), les lymphomes T (Edelman, 2000) et les leucémies lymphoblastiques (Torelli, 2003), les cancers colorectaux (Nakagomi, 1993), ovariens (Taylor, 2004), gastriques (Takahashi, 2001 ; Ishigami, 2004), pancréatiques (Von Bernstorff, 2001) et du sein (Schule, 2002). Ces études ont été réalisées en utilisant diverses techniques comme la cytométrie de flux quantitative, l'incorporation de thymidine tritiée, l'immunohistologie ou le Western blot et mettent en évidence une diminution significative d'expression de la chaîne ζ de CD3 dans les lymphocytes infiltrant les tumeurs ou les ganglions envahis. La diminution d'expression de CD3 est associée dans ces études à un mauvais pronostic et à un taux supérieur de rechutes.

Une diminution d'expression de CD3 est associée à des défaillances fonctionnelles des lymphocytes T avec :

✓ une baisse des activités tyrosine kinase suivant la reconnaissance de l'antigène. En effet, la liaison du ligand par le TCR entraîne la phosphorylation des domaines ITAM de CD3 par l'intermédiaire de tyrosine-kinases de la famille Src (Lck, Fyn...) et c'est ce signal qui permet la transduction des signaux d'activation (Whiteside, 2004 ; Werlen, 2002).

✓ une abolition ou une diminution des flux calciques liée à l'absence ou à la diminution des signaux d'activation transduits par CD3 suite à la reconnaissance de l'antigène (Goldsby, 2000). La diminution des flux calciques provoque la non transduction des signaux intracellulaires et la non activation des cellules T (Whiteside, 2004).

✓ un profil cytokinique altéré avec une diminution de production de certaines cytokines, en particulier de l'IL-2 et de l'IFN γ . En effet, la reconnaissance de l'antigène et la transduction du signal par CD3 entraîne la production de cytokines de prolifération et d'activation par les

cellules T (Goldsby, 2000). La transduction altérée du signal conduit à une activation partielle des lymphocytes T et à une production cytokinique insuffisante (Whiteside, 2004).

✓ une augmentation de la sensibilité des cellules T à l'apoptose : les cellules T portant un faible nombre de CD3 ζ expriment de forts taux de FasL ainsi que d'autres molécules induisant la mort cellulaire par apoptose. De plus, il existe une corrélation significative entre la prolifération des cellules T et l'expression de la chaîne ζ ainsi qu'entre l'apoptose des lymphocytes T et l'expression de la chaîne ζ . (Whiteside, 2004 ; Reichert, 2002).

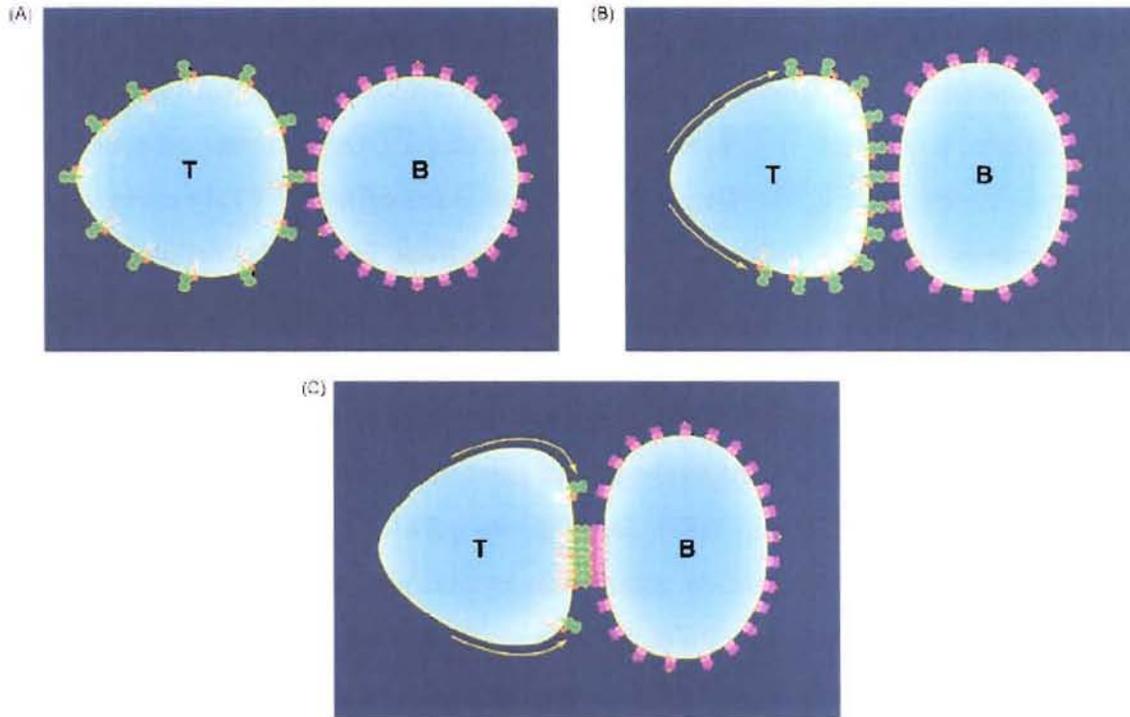
Un des mécanismes responsables de la diminution d'expression de CD3 pourrait être l'activation induite par la tumeur de peptidases intracellulaires dans les cellules T conduisant au clivage de diverses protéines dont les chaînes ζ (Whiteside, 2004). Un autre mécanisme pourrait être la sécrétion de facteurs solubles tels la zeta inhibitory protein qui supprime la chaîne ζ sans interférer avec les fonctions des tyrosines kinases lck et ZAP-70 (Whiteside, 2004). La diminution d'expression de CD3 ζ pourrait être également due à la stimulation antigénique chronique accompagnant la croissance tumorale. En effet, il a été montré que l'activation des cellules T par un antigène spécifique est accompagnée d'une diminution rapide de l'expression des chaînes ζ et ϵ de CD3. L'expression de ces deux chaînes de CD3 est ensuite restaurée durant la réponse immune normale. Lorsque le stimulus est chronique, ces molécules, dégradées dans les lysosomes, pourraient ne pas être renouvelées suffisamment rapidement pour permettre la réexpression des chaînes de CD3 à la surface des cellules T. Un autre mécanisme impliqué dans la diminution de CD3 ζ est médié par les intermédiaires réactifs de l'oxygène produits par les monocytes activés ou les granulocytes dans le micro-environnement tumoral. De plus, la chaîne ζ de CD3 contient des sites sensibles au clivage par les caspases (Whiteside, 2004 ; Whiteside, 1999).

Afin d'assurer leur survie et leur maintien au sein des organes lymphoïdes périphériques, les lymphocytes T ne peuvent adopter de comportement passif, ils doivent constamment intégrer des signaux de survie. Les cellules T mémoire ont notamment besoin d'intégrer des signaux via l'interaction entre leur TCR et les molécules du CMH afin de pouvoir se maintenir dans les compartiments périphériques (Legrand, 2002). Dans ce travail, il a été noté une diminution de l'intensité d'expression du TCR $\alpha\beta$ dans les tissus tumoraux. Or, la

reconnaissance efficace des antigènes sur les molécules du CMH et la constitution de la synapse immunologique nécessitent le rapprochement d'une centaine de molécules de TCR. En effet, le contact entre le lymphocyte et la cellule présentatrice d'antigène doit être étroit et durer plusieurs heures voire jours pour le développement efficace de cellules T effectrices. C'est la polarisation des molécules de TCR et leur clusterisation qui permet la formation de la synapse immunologique (Delon, 2000). En effet, la liaison entre le TCR et la molécule de CMH est de faible affinité, la dissociation est rapide lorsque les taux d'associations sont faibles. Ces faibles taux d'association montrent qu'une grande barrière d'énergie doit être franchie afin de produire une interaction stable et efficace. La fixation d'une molécule de TCR au CMH provoque un changement conformationnel de la molécule de TCR dans la région de contact avec la molécule de CMH. Les molécules de TCR sont alors mobilisées par la liaison au cytosquelette et se dirigent vers le centre des interactions cellule T-cellule présentatrice. Lorsque les molécules de TCR sont proches de la membrane de la cellule présentatrice, elles se fixent aux molécules de CMH afin de former la synapse immunologique. La fixation simultanée de nombreuses molécules de TCR induit « l'ajustement » de la conformation du TCR avec une surface de fixation du ligand flexible et stabilisée permettant l'engagement du ligand. Le peptide serait la molécule responsable de l'induction des changements conformationnels observés lors de la liaison des molécules de TCR aux complexes peptides-CMH (Krogsgaard, 2003) (Figure 60).

Figure 60 **Clusterisation active des molécules de TCR à l'interface entre les cellules T et les cellules présentatrices d'antigène (Baz, 2005).**

A : la cellule T reconnaît la cellule présentatrice via l'interaction TCR-CMH, B : grâce à la liaison au cytosquelette l'ensemble des molécules de TCR se dirigent vers le site d'interaction entre les deux cellules, C : constitution de la synapse immunologique.



La répartition topographique des sous-populations T CD4+ et CD8+ isolés des tissus tumoraux a été ici montrée comme étant différente de celle observée dans les tissus sains et chez les personnes ne souffrant pas de cancer. En effet, les tissus tumoraux contiennent plus de lymphocytes cytotoxiques, capables d'une interaction directe avec les cellules tumorales. Les cellules présentatrices d'antigène, et en particulier les cellules dendritiques, résident dans les tissus périphériques et ont pour rôle la capture de l'antigène. Lorsqu'elles ont capturé un antigène, elles migrent vers la zone T des ganglions où elles perdent leur capacité d'endocytose et de phagocytose au profit de la présentation antigénique en exprimant les peptides antigéniques dans des molécules de CMH. Dans les ganglions les cellules présentatrices

activent les cellules T CD8+ avec l'aide des cellules T CD4+. Les cellules T CD8+ activées et amplifiées dans le ganglion migrent ensuite dans la stroma réaction afin d'effectuer la lyse des cellules tumorales cibles (Baz, 2005).

En effet, les cellules T CD4+ ont pour rôles principaux l'aide à la génération de la réponse immune anticorps-dépendante en permettant la transformation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'anticorps et l'aide à l'activation et l'expansion des cellules T CD8+ (Gerloni, 2005). L'activation des cellules T CD8+ est insuffisante à elle seule pour produire une réponse immune anti-tumorale efficace. Les cellules cytotoxiques ont besoin des cellules T CD4+ pour produire une réponse soutenue, avoir une activation optimale (Knutson, 2005 ; Ostrand-Rosenberg, 2005). L'IL-2 produite par les cellules T CD4+ activées est nécessaire à la prolifération des cellules T CD8+. De plus, l'intervention des cellules T CD4+ est indispensable à la génération de cellules T mémoires pleinement effectives. En effet les cellules T mémoires générées en l'absence de cellules CD4+ prolifèrent peu et produisent de faibles taux de cytokines (Baz, 2005). Les cellules T CD4+ sont de plus capables d'agir indirectement sur la croissance tumorale en produisant une réponse de type hypersensibilité retardée attirant des cellules inflammatoires telles les macrophages, les granulocytes éosinophiles ou les cellules NK dans la stroma réaction (Gerloni, 2005). En effet, les cellules T activées se différencient en cellules Th1 et Th2 qui produisent de nombreuses cytokines recrutant des cellules effectrices anti-tumorales (Hung, 1998). Les cellules T CD4+ semblent également capables d'effectuer un lyse directe des cellules tumorales par sa sécrétion d'IFN γ qui a une activité cytotoxique contre les cellules tumorales en produisant des dérivés actifs de l'oxygène, en augmentant l'expression des molécules de CMH, en altérant l'apprêtement des antigènes endogènes et en induisant la production d'inhibiteurs de l'angiogenèse par les cellules tumorales (Gerloni, 2005). Cependant, les cellules T CD4+ pourraient également promouvoir la croissance tumorale en recrutant des neutrophiles qui sécrètent des métalloprotéinases favorisant la néoangiogenèse ainsi que la prolifération tumorale. De plus, dans certains cas, les cellules T CD4+, au lieu d'aider à l'activation des cellules T CD8+, suppriment la réponse CD8+ anti-tumorale, ce qui est montré chez des souris porteuses de tumeur chez qui la déplétion en cellules T CD4+ provoque une expansion rapide et systémique de cellules T CD8+ effectrices tumeur-spécifiques (Den Boer, 2005).

Un faible ratio CD4/CD8 dans les tissus tumoraux, les tissus sains et/ou dans le sang périphérique a été mis en évidence dans d'autres types de tumeurs comme par exemple dans le

cancer bronchique à petites cellules où il est associé à un mauvais pronostic (Nakamura, 2002) ou dans le gliome (Hussain, 2005).

De plus, il a été observé en cytométrie de flux une augmentation du pourcentage de cellules détectables exprimant CD4, après culture organotypique courte en milieu non tumoral, dans les ganglions. De même, le pourcentage de cellules détectables exprimant CD8 a augmenté dans les tumeurs après culture en milieu non tumoral. Cette réexpression va dans le sens d'une levée de la suppression immunitaire locale provoquée par la tumeur avec amélioration à la fois du pool des cellules T helper CD4+ ganglionnaires et amélioration du pool des cellules T cytotoxiques CD8+ de la tumeur. En effet, l'augmentation du nombre de cellules détectables exprimant CD4+ dans les ganglions permet une augmentation des capacités d'activation et de prolifération des cellules T CD8+ dans les ganglions. Ces cellules T cytotoxiques vont ensuite migrer vers la tumeur afin d'effectuer leur action cytotoxique contre les cellules portant l'antigène reconnu (Gerloni, 2005). De plus, l'augmentation du nombre de cellules détectables exprimant CD8 et CD4 après culture en milieu non-tumoral montre que le microenvironnement tumoral est bien un acteur de l'inhibition d'expression de ces molécules. Ceci montre de plus que la modulation du système immunitaire exercée par la tumeur est un processus réversible, au moins dans une certaine limite. Ces résultats vont dans le sens des travaux de Tomasi (2006) qui montre que beaucoup des mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire sont médiés par des événements épigénétiques et que ces événements sont réversibles.

Dans les tumeurs, la majorité des lymphocytes sont des cellules mémoires comme dans d'autres types de cancer (Whiteside, 2006 ; Pages, 2005). Le seuil de détection des signaux de survie, d'activation et de prolifération (antigène, molécules du CMH, cytokines) par les cellules T mémoire est plus bas que celui des cellules T naïves, permettant leur réactivation rapide lors d'un nouveau contact avec l'antigène (Golsby, 2000). La durée du signal requise pour l'activation des cellules T mémoires varie inversement à la force de la stimulation qui dépend à la fois du nombre de molécules de TCR et de leur affinité pour le complexe CMH-peptide ainsi que de la densité des complexes CMH-peptide à la surface de la cellule présentatrice. Les cellules mémoires présentent une plus grande distribution anatomique que les cellules naïves leur permettant d'effectuer une surveillance immunitaire plus efficace des tissus périphériques (Baz, 2005). Les cellules mémoires acquièrent aussi une activité cytotoxique ou de relargage de

cytokines plus rapidement que les cellules T naïves. La production de cytokines par les cellules T mémoires est également plus abondante (Zimmermann, 1999).

Les cellules T CD8⁺ mémoire effectrices montrent une activité cytolytique immédiate, des capacités d'expansion réduites et une migration préférentielle dans les tissus périphériques. Les cellules T CD8⁺ mémoire centrales, quant à elles, nécessitent une réactivation afin d'exercer des capacités cytolytiques. Elles prolifèrent en réponse à l'antigène et résident principalement dans les organes lymphoïdes (Baz, 2005). L'anergie des cellules T induite par les cellules tumorales affecte les cellules T naïves mais également, dans une moindre mesure, les cellules T mémoires. Les cellules tumorales semblent ainsi capables de paralyser la réponse des cellules T à tous les stades de leur différenciation (Flynn, 2003). Cet effet délétère du microenvironnement tumoral a été confirmé dans ce travail par les tests de culture organotypique de tissu tumoral dans un milieu de culture diluant les facteurs potentiellement anergisants. Les quelques heures de ces cultures ont suffi pour permettre une réexpression des molécules de la synapse sur les lymphocytes T intratumoraux, induisant non seulement une augmentation de la MFI mais également la détection de cellules plus nombreuses, identifiées comme « négatives » immédiatement après leur élution du tissu pulmonaire. Ces cellules exprimaient vraisemblablement initialement des taux de CD3, CD4 et CD8 membranaires ne permettant pas leur détection en cytométrie. Les différences observées entre les lymphocytes intratumoraux, du parenchyme sain et des ganglions vont dans le sens d'une altération globale des réponses immunitaires, avec toutefois des nuances comme la plus forte expression de CD8 dans les tumeurs, majorée après élimination du microenvironnement, et corrélable à leurs fonctions cytotoxiques. De plus, les moyennes de MFI de CD3, CD4 et CD8 des échantillons sanguins étaient significativement supérieures à celle des tissus sains et tumoraux et aucun biais d'utilisation du répertoire V β du TCR n'a été mis en évidence dans les échantillons sanguins. Ces deux résultats vont également dans le sens de l'existence d'une modulation tumorale locale des cellules T.

En immunohistologie, les molécules HLA de classe II-DR et DQ ainsi que la β 2 microglobuline sont fortement exprimées par les pneumocytes sains alors que les cellules tumorales expriment peu ces molécules et qu'elles persistent sur les pneumocytes sains résiduels proches de la tumeur. Dans d'autres types de cancers, les travaux de la littérature montrent que les cellules tumorales (comme celles des mélanomes par exemple) peuvent

diminuer l'expression des molécules CMH de classe I à leur surface, aboutissant à leur non reconnaissance par les lymphocytes T CD8+ (Perales, 2002 ; Castelli, 2002 ; Kataki, 2002, Vignaud, 1998). Les modifications d'expression des antigènes de classe I à la surface des cellules tumorales incluent une diminution des molécules HLA de classe I classiques et l'apparition d'antigènes de classe I non classiques (Seliger, 2002 ; Garcia-Lora, 2003 ; Madjd, 2005). Les variations d'expression des molécules de classe I classiques incluent une perte totale d'expression, une diminution d'expression ou la perte ou la diminution d'expression de certaines allospécificités. La perte totale d'expression des classe I est due à une perte d'hétérozygotie du gène de la $\beta 2$ microglobuline. Cette perte d'hétérozygotie est provoquée par l'instabilité génique accompagnant et provoquant le développement tumoral. La diminution d'expression de l'ensemble des molécules de classe I du CMH peut être due à des mécanismes tels que l'attachement défectueux de facteurs régulateurs à l'enhancer du gène de HLA classe I ou à une dérégulation des mécanismes d'apprêtement et de présentation des antigènes due à des altérations de l'expression et/ou de la fonction de divers composants de la voie de présentation antigénique par les molécules de CMH classe I. Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de la diminution sélective d'expression de certaines molécules de classe I, dont une perte d'hétérozygotie ne touchant pas l'ensemble des loci du CMH classe I ou la perte de facteurs de transcription liant des facteurs régulateurs spécifiques d'un locus HLA (Seliger, 2002).

Les antigènes de classe I non classiques comprennent entre autres les molécules HLA-G, HLA-F et HLA-E, elles sont caractérisées par une distribution tissulaire restreinte, une faible expression cellulaire et un polymorphisme limité. La molécule HLA-G est la plus étudiée, Les molécules HLA-G inhibent l'activité cytolytique des cellules T CD8+ tumeur-spécifiques et bloquent la cytotoxicité des cellules NK en liant les récepteurs inactivateurs KIR (Seliger, 2002). La molécule HLA-E module les fonctions des cellules NK (Marin, 2003).

Dans les lignées cellulaires tumorales, comme *in situ* dans les tumeurs examinées dans ce travail, il existe une répression de l'expression des molécules de classe II du CMH ce qui diminue fortement la présentation des antigènes. Cette diminution de l'expression de HLA-DR, comme des molécules de classe I du CMH, fait partie des mécanismes mis en place par les cellules tumorales pour échapper à la surveillance immune. Cette répression de HLA-DR est systématiquement présente dans les cancers bronchiques non-à petites cellules analysés. Cette observation est d'autant plus intéressante que le parenchyme pulmonaire et les cellules

épithéliales bronchiques sont parmi les rares tissus non immuns de l'organisme à exprimer spontanément ces molécules (Glanville, 1989).

L'expression des antigènes de classe II du CMH est plus problématique, en effet, dans des tumeurs comme le cancer du sein ou de l'ovaire on observe une expression des antigènes CMH classe II dans la tumeur alors qu'ils ne sont pas exprimés dans le tissu sain correspondant (McDermott, 2002 ; Nijman, 2001). Dans le cas du cancer du pancréas ces antigènes sont exprimés dans le tissu sain alors que leur expression diminue dans la tumeur (Ryschich, 2003). L'expression des molécules de CMH classe II est corrélée avec l'infiltration des cellules T et des cellules dendritiques. L'expression des molécules de classe II par les cellules tumorales est inductible par diverses cytokines, la plus efficace étant l'IFN γ . Or, dans diverses tumeurs il existe souvent un switch du pattern d'expression cytokinique qui passe de Th1 à Th2. Dans ce cas, l'absence de production de l'IFN γ peut empêcher l'expression de novo des molécules de classe II à la surface des cellules tumorales. Un des mécanismes pouvant expliquer une forte expression des molécules de classe II dans les tissus tumoraux de certains types de cancers serait que la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules dendritiques engendrerait la production d'IFN γ par ces dernières (McDermott, 2002). Il a été de plus suggéré que les cellules tumorales portant des molécules de classe II pourraient avoir une fonction de présentation des antigènes directe, sans passer par des cellules dendritiques, dans les tumeurs classe II positives. Cette étude a utilisé des souris chez qui ont été transfectées des cellules tumorales classe II positives. Ces souris étaient résistantes à l'invasion tumorale et l'interprétation de ce résultat était le développement de réponses immunes anti-tumorales (Armstrong, 1998).

Très peu d'études ont été réalisées sur les effets du microenvironnement tumoral sur les lymphocytes infiltrant la tumeur (ou TIL) dans les cancers bronchiques. Seule l'équipe d'Ortegel a montré que les cellules tumorales épithéliales semblent produire des cytokines majoritairement de type Th2 (Ortegel, 2002) alors que les TIL semblent exprimer des cytokines de type Th1, or les cytokines de type Th2 sont capables d'inhiber les effets des cytokines de type Th1 (Ortegel, 1999). Il a été d'autre part montré que les cellules tumorales de cancers du poumon sont capables d'inhiber la prolifération, la cytotoxicité et la production d'ARNm cytokinique par les cellules T (Huang, 1995 ; Yoshino, 1993). Par exemple, le TGF β , produit

par les cellules tumorales, est une molécule immunosuppressive capable d'inhiber la génération de cellules T cytotoxiques, mais pas leur fonction (Ranges, 1987). De plus, les lymphocytes T CD8+ infiltrant la tumeur produiraient moins d'INF γ qui est associé avec leur efficacité in vivo (Trojan, 2004). Le TGF β peut également promouvoir la croissance tumorale, dans certains types de cancers, par ses propriétés de stimulation de la migration et de l'invasion cellulaire ainsi que la promotion de l'angiogenèse. Le TGF β agirait de façon autocrine et/ou paracrine et en synergie avec des oncogènes transformés (Iyer, 2005 ; Wick, 2006 ; Arteaga, 2006). L'IL-6, a quant à elle, un rôle ambigu car elle est capable à la fois de promouvoir la croissance et/ou la différenciation des cellules T, des cellules B, des macrophages et des mégacaryocytes, de stimuler la production d'IL-2 et l'expression du récepteur à l'IL-2 par les cellules T mais également de promouvoir l'invasion tumorale. En effet, l'IL-6 augmente la mobilité des cellules tumorales par un effet autocrine et/ou paracrine. (Ashizawa, 2005). D'autres hypothèses impliquent la sécrétion de facteurs inhibiteurs solubles spécifiques de tumeurs, ou des molécules membranaires inhibitrices comme RCAS1 (Villunger, 1999). En effet, RCAS1 est un antigène exprimé à la surface des cellules tumorales dans les tumeurs agressives, il supprime la croissance des cellules immunes in vitro et induit l'apoptose des cellules T infiltrant la tumeur dans certaines tumeurs comme le gliome (Nakabayashi, 2006).

Les ARNm de plusieurs cytokines ont pu être détectés ici dans les tissus sains et/ou tumoraux ainsi que chez les patients présentant une forte stroma réaction et/ou une faible stroma réaction. Le TGF β n'était présent que dans des tumeurs et quasiment uniquement chez les patients présentant une forte stroma réaction associée à la tumeur. Le TNF α , exprimé dans 76% des tissus tumoraux testés était rare dans les tissus sains (24% d'expression). Dans les tumeurs, le TNF α , comme le TGF β , était préférentiellement exprimé chez les patients présentant une forte stroma réaction. Le TNF α est sécrété par diverses cellules du système immunitaire dont les lymphocytes T et B et les cellules NK ainsi que par les cellules endothéliales. Le TNF α a de nombreux effets notamment dans l'inflammation, le développement des centres germinatifs et l'hématopoïèse, la différenciation et l'activation des cellules T et des cellules B en particulier par la stimulation d'expression des protéines RAG, ou l'induction de l'apoptose, de nombreuses cellules, en particulier les cellules tumorales. L'induction de l'apoptose peut se faire par la stimulation des caspases ou par l'augmentation d'expression de FasL sur les cellules cibles (Locksley, 2001). La sécrétion de TNF α dans les

tissus tumoraux pourrait refléter une augmentation de la réponse immune anti-tumorale, accentuée par les effets cytotoxiques de cette cytokine ainsi que par ses effets d'activation et de différenciation des cellules immune et sa potentialisation de l'inflammation. En effet, le $TNF\alpha$, dans les cancers et en particulier dans le cancer du poumon, lorsqu'il se lie à ses récepteurs cellulaires à la surface des cellules tumorales, induit la production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène capables d'induire l'apoptose des cellules cibles. De plus, l'expression du $TNF\alpha$ augmente l'efficacité de la réponse immune anti-tumorale des cellules T, en particulier en augmentant la sécrétion de l'IL-2 indispensable à l'activation et à la prolifération des cellules T (Matanic, 2003).

L' $INF\gamma$, produit par les lymphocytes T et les cellules NK, peut avoir comme de nombreuses autres cytokines des effets opposés. Il augmente la prolifération et l'activité de diverses cellules et molécules du système immunitaire (macrophages, cytotoxicité anticorps dépendante, cytotoxicité NK naturelle, expression des molécules classe I et classe II du CMH sur les cellules présentatrices d'antigènes, expression de récepteurs à l'IL-2). Cependant, à d'autres concentrations, l' $INF\gamma$ peut également inhiber le développement à la fois de la réponse immune humorale et cellulaire (Coleman, 1987). La réalisation d'une PCR quantitative pour l'étude de l'expression des cytokines, et en particulier de l' $INF\gamma$, permettrait d'apporter de plus amples éléments de réponse quant aux rôles joués par cette cytokine dans le développement tumoral du cancer bronchique, aux vues des données précédemment citées. De l'ARNm de cette cytokine a été détecté ici chez pratiquement tous les patients, à la fois dans les tissus sains et les tissus tumoraux, principalement chez les patients présentant une faible stroma réaction pour les tissus sains et principalement chez les patients présentant cette fois une forte stroma réaction pour les tumeurs. Une étude de Trojan et collaborateurs (2004), utilisant une technique de PCR quantitative afin de déterminer les niveaux d'expression de l' $INF\gamma$ dans le cancer bronchique non-à petites cellules, montre que les cellules T CD8+ produisant de l' $INF\gamma$ sont principalement localisées à l'intérieur des foyers tumoraux, alors que les cellules T CD8+ actives sont principalement celles situées en périphérie. Ceci peut être du à la fois à une diminution d'expression de l' $INF\gamma$ et à la sécrétion de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 et le $TGF\beta$. De plus, le $TNF\alpha$ et l' $INF\gamma$ pourraient agir de façon synergique afin d'induire la mort cellulaire par apoptose des cellules tumorales. La combinaison $TNF\alpha$ et $INF\gamma$ permettrait d'induire plus de types de caspases que

l'expression de chaque cytokine séparément, les autres mécanismes de cette synergie n'étant pas identifiés (Lee, 2002).

L'IL-10 était plus fréquemment sécrétée dans les tissus tumoraux présentant une stroma réaction importante. Elle est produite entre autres par les lymphocytes T et B et les monocytes. Or l'IL-10 est une cytokine immunosuppressive, elle inhibe la production de diverses cytokines ainsi que la prolifération des lymphocytes T, en particulier les lymphocytes Th1, et l'activation des macrophages et des cellules dendritiques. Les effets de l'IL-10 sont opposés à ceux de l'IFN γ . L'inhibition de l'activation des cellules T est principalement réalisée par le blocage de l'induction de la production d'IL-2 par l'IL-10. (Paul, 1998 ; Hatanaka, 2000). L'IL-10 inhibe la production de TNF α et d'IFN γ par les lymphocytes T activés. L'induction de la production d'IL-10 par les cellules tumorales semble corrélée avec un mauvais pronostic pour le cancer bronchique non-à petites cellules. Ceci va dans le sens d'un échappement de la tumeur au système immunitaire : la tumeur se rend invisible du système immunitaire qui « baisse sa garde », l'IL-10 exerçant un rétrocontrôle négatif sur le développement de la réponse immunitaire anti-tumorale (Hatanaka, 2000).

L'IL-6 est exprimée de façon égale dans les tissus et les tumeurs ainsi que chez les patients présentant une forte et une faible stroma réaction, ce qui est en accord avec ses multiples rôles ambigus dans la croissance tumorale discutés précédemment. RANTES est principalement exprimé dans les tumeurs, en particulier chez les patients présentant une faible stroma réaction. RANTES est sécrété par les cellules T CD8+, les plaquettes, les cellules épithéliales et les fibroblastes, en réponse à divers médiateurs de l'inflammation. RANTES a un effet mitogène sur les cellules T conduisant ces cellules à l'apoptose, ce qui explique que cette cytokine soit exprimée chez les patients présentant une faible stroma réaction (Payne, 2002). GRO α et MCP-1 sont principalement exprimés dans les tumeurs, sans différence en fonction de l'importance de la stroma réaction. GRO α promeut l'angiogenèse et le chimiotactisme des neutrophiles et son expression dans les tumeurs peut augmenter le pouvoir de dissémination des cellules tumorales, ce qui est montré en particulier pour le mélanome (Payne, 2002). MCP-1 a un effet chimiotactique sur les monocytes et les cellules NK, sa non expression est liée à une réponse immune déficiente et à la progression tumorale dans le cancer du sein (Payne, 2002). ENA-78 est un facteur angiogénique de même que ANG. Ces deux facteurs sont principalement exprimés dans les tumeurs, ENA-78 étant plus exprimé

chez les patients présentant une forte stroma réaction à l'inverse de ANG. L'expression de ces cytokines est reliée à la croissance tumorale et à sa dissémination (Wente, 2006).

L'ensemble des résultats de RT-PCR montre l'expression de diverses cytokines dans les tissus sains et tumoraux, ces cytokines ayant souvent des effets multiples et antagonistes sur l'activation des acteurs du système immunitaire ainsi que sur la croissance tumorale. Ceci témoigne de la complexité de la stratégie tumorale visant à leurrer le système immunitaire sur son identité.

**CONCLUSION-
PERSPECTIVES**

Ce travail avait pour objet l'étude de la réponse immunitaire locale de la stroma réaction du cancer bronchique non-à petites cellules et de sa modulation tumeur-dépendante. La clonalité potentielle des lymphocytes T des tissus sains, tumoraux et ganglionnaire a été analysée à l'aide de deux techniques complémentaires. L'étude phénotypique des tissus sains, tumoraux et ganglionnaires a été réalisée permettant de déterminer les caractéristiques d'activation et d'interaction des cellules immunes et épithéliales des différents compartiments pulmonaires. Afin de compléter cette étude, l'analyse de l'expression de diverses cytokines impliquées dans la régulation de la réponse immune et de la croissance tumorale dans les tissus sains et tumoraux a été entreprise.

Les résultats obtenus montrent qu'il existe une oligoclonalité des lymphocytes T de la stroma réaction des cancers bronchiques non à petites cellules. L'oligoclonalité des lymphocytes T a également été mise en évidence dans les ganglions et de façon plus surprenante dans les tissus sains chez les fumeurs suggérant que ces clones pourraient être spécifiques de lésions très précoces pré-tumorales liées au tabac. De plus, une partie des clones observés dans le tissu tumoral étaient également présents dans les ganglions régionaux, suggérant la circulation de ces cellules T entre la tumeur et le tissu lymphoïde correspondant. Le clone V β 13.1 semble spécifique des carcinomes épidermoïdes en ce sens qu'il est absent des tissus sains des mêmes patients alors que deux clones gamma semblent spécifiques des adénocarcinomes et un des carcinomes épidermoïdes. L'étude du répertoire V β met en évidence des TCR fonctionnels exprimés à la surface des cellules, l'amplification du gène V-gamma, toujours réarrangé mais généralement non fonctionnel, reflète plutôt, lorsqu'elle met en évidence une restriction de répertoire, l'existence de lymphocytes T dérivés d'une cellule initiale unique, donc une prolifération locale. Le clone observé V β 13.1 dans les carcinomes épidermoïdes pourrait donc être spécifique d'un antigène tumoral et être recruté au site tumoral en raison de cette spécificité. Ces deux caractéristiques, de recrutement et de prolifération locale, sont confortées par la mise en évidence à la surface des cellules T présentes dans les tissus tumoraux des isoformes CD45RA et CD45RO.

La stroma réaction des cancers bronchiques non-à petites cellules est importante mais variable, elle est constituée de lymphocytes T CD3+ cependant, l'expression de CD3 et des corécepteurs CD4 et CD8 est significativement moins intense dans les tumeurs par comparaison

des tissus sains et des ganglions. Une diminution d'expression de CD3 est associée à de nombreuses défaillances fonctionnelles des lymphocytes T. Il a de plus été noté une diminution de l'intensité d'expression du TCR $\alpha\beta$ dans les tissus tumoraux. Or, la reconnaissance efficace des antigènes sur les molécules du CMH et la constitution de la synapse immunologique nécessite le rapprochement d'une centaine de molécules de TCR. Parallèlement, les molécules HLA-DR et HLA-DQ de classe II ainsi que la β 2 microglobuline de classe I sont fortement exprimées par les pneumocytes sains alors que les cellules tumorales expriment peu ces molécules et qu'elles persistent sur les pneumocytes sains résiduels proches de la tumeur. La diminution d'expression des molécules de CMH classe I à la surface des cellules tumorales aboutit à leur non reconnaissance par les lymphocytes T CD8+. De plus, la diminution d'expression des molécules de CMH classe II à la surface des cellules tumorales aboutit à leur non reconnaissance par les cellules T CD4+ et les cellules présentatrices d'antigènes ce qui annule la potentialisation de la réponse T cytolytique.

Diverses cytokines ayant des effets antagonistes sont produites dans le tissu tumoral en particulier le TGF β , l'IL-10, RANTES, ENA-78, MCP-1 et GRO α qui apportent une aide à la croissance et/ou à la dissémination tumorale en inhibant la prolifération et la différenciation des cellules T et en favorisant l'angiogenèse. Le TNF α et l'IFN γ produits dans la tumeur ont quant à eux un effet de potentialisation de la réponse immune anti-tumorale. Cette production de cytokines ayant des rôles antagonistes dans la tumeur confirme la complexité de la stratégie tumorale visant à leurrer le système immunitaire sur son identité. De plus, la faible reconnaissance de l'antigène par les cellules T induite par la diminution d'expression des molécules présentatrices du CMH sur les cellules tumorales ainsi que la diminution d'expression des complexes TCR-CD3 permettent aux cellules malignes d'échapper au système immunitaire. L'ensemble de ces résultats suggère que la tumeur génère un microenvironnement immunosuppresseur.

Certains clones sont exprimés dans le tissu sain et absents de la tumeur, ce qui suggère que de telles cellules seraient capables de contenir le développement tumoral dans une certaine mesure. Il serait intéressant d'analyser les mécanismes possibles, induits par la tumeur afin de supprimer ces lymphocytes T tumeurs-spécifiques à sa proximité. Un de ces mécanismes pourrait être l'induction de l'apoptose de ces cellules T par la sécrétion de cytokines immunosuppressives. Le séquençage de l'ADN des clones de lymphocytes T portant un

réarrangement V γ du TCR spécifique des tumeurs ainsi que de ceux spécifiques des adénocarcinomes et des carcinomes épidermoïdes pourrait constituer la base d'une immunothérapie spécifique visant à enrichir les lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) en cellules T capables de reconnaître des antigènes associés aux tumeurs. Il serait également intéressant de quantifier les cytokines produites dans le microenvironnement tumoral ainsi que dans les tissus sains et les ganglions afin de déterminer le degré d'implication de chacune de ces cytokines dans la modulation de la réponse immune dans la cancer bronchique non-à petites cellules. Les cytokines utilisées dans cette étude ont été choisies d'après un travail de doctorat portant sur l'identification des cytokines exprimées dans les surnageants tumoraux de patients atteints d'un cancer bronchique non-à petites celles. L'identification des cytokines spécifiquement exprimées par les lymphocytes infiltrant les tumeurs permettrait donc de compléter cette étude. Les capacités de réexpression des molécules de la synapse immunologique par les lymphocytes tissulaires, lorsqu'ils ne sont plus exposés à un microenvironnement délétère laisse supposer que leur anergie pourrait être levée. Ces observations pourraient être la base de travaux visant à permettre l'élaboration d'immunothérapies spécifiques.

BIBLIOGRAPHIE

Abou-Elella A, Shafer MT, Wan XY, Velanker M, Weisenburger DD, Nathwani BN, Gascoyne RD, Greiner TC, Chan W.C.

Lymphomas with follicular and monocytoid B-cell components : Evidence for a common clonal origin from follicle center cells.

Am. J. Clin. Pathol. 2000 ;114 :516-22.

Allan CP, Turtle CJ, Mainwaring PN, Pyke C, Hart DN.

The immune response to breast cancer, and the case for DC immunotherapy.

Cytotherapy. 2004;6(2):154-63.

Allison T, Winter C, Fournié JJ, Bonneville M, Garboczi D.

Structure of a human $\gamma \delta$ T-cell antigen receptor.

Nature. 2001;411:820-24.

Andres PG, Howland KC, Dresnek D, Edmondson S, Abbas AK, Krummel MF.

CD28 signals in the immature immunological synapse.

J Immunol. 2004;172(10):5880-6.

Armstrong TD, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S.

MHC class II-transfected tumor cells directly present antigen to tumor-specific CD4⁺ T lymphocytes.

J Immunol. 1998;160(2):661-6.

Arteaga CL.

Inhibition of TGFbeta signaling in cancer therapy.

Current Opinion in Genetics and Development 2006;16:30-7.

Ashizawa T, Okada R, Suzuki Y, Takagi M, Yamazaki T, Sumi T, Aoki T, Ohnuma S, Aoki T.

Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) in the spread of gastric cancer: role of IL-6 as a prognostic factor.

Gastric Cancer 2005;8:124-31.

Baclesse.

Angiogenèse.

Cours Baclesse, janvier 2006.

Disponible sur : <http://www.baclesse.fr/cours/fondamentale/c12-angiogenese/angio-0.htm>

Baier PK, Wimmenauer S, Hirsch T, Von Specht BU, Von Kleist S, Keller H, Farthmann E.H.

Analysis of the T cell receptor variability of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinomas.

Tumour Biol. 1998;19:205-12.

Baldwin TA, Sandau MM, Jameson SC, Hogquist KA.

The timing of TCR alpha expression critically influences T cell development and selection.

J Exp Med. 2005;202(1):111-21.

Baz A, Jackson DC, Kienzle N, Kelso A.

Memory cytolytic T-lymphocytes: induction, regulation and implications for vaccine design.

Expert Rev Vaccines. 2005;4(5):711-23.

Beckhove P, Feuerer M, Dolenc M, Schuetz F, Choi C, Sommerfeldt N, Schwendemann J, Ehlert K, Altevogt P, Bastert G, Schirmacher V, Umansky V.

Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors.

J Clin Invest. 2004;114(1):67-76.

Béné M.C., Campos L., Faure G., Garand R., Maynadie M.

Immunophénotypage des leucocytes.

Paris : Biotem Editions, 1998, 461p.

Benz C, Reusch U, Walter M, Brune W, Atalay R.

Efficient downregulation of major histocompatibility complex class I molecules in human epithelial cells infected with cytomegalovirus.

Journal of general virology 2001;82:2061-70.

Berg J, Aase S, Soland TH, Gabrielsen AM, Svendsen MV, Lien JT, Hauss G.
The value of cytology in the diagnostics of lung cancer.
APMIS. 2005;113(3):208-12.

Berman JS.

Lymphocytes in the lung : should we continue to exalt only BALT ?
Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 1990;3:101-2.

Billello KS, Murin S, Matthay RA.

Epidemiology, etiology, and prevention of lung cancer.
Clin Chest Med. 2002;23(1):1-25.

Bingisser RM, Holt PG.

Immunomodulating mechanisms in the lower respiratory tract : nitric oxide mediated interactions between alveolar macrophages, epithelial cells, and T-cells.
Swiss Med. Wkly. 2001;131:171-9.

Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y.

The new World Health Organization classification of lung tumours.
Eur Respir J. 2001;18(6):1059-68.

Brooks DR, Austin JH, Heelan RT, Ginsberg MS, Shin V, Olson SH, Muscat JE, Stellman SD.

Influence of type of cigarette on peripheral versus central lung cancer.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005;14(3):576-81.

Burastero SE, Borgonovo B, Gaffi D, Frittoli E, Wack A, Rossi GA, Crimi E.

The repertoire of T-lymphocytes recovered by bronchoalveolar lavage from healthy nonsmokers.
Eur. Respir. J. 1996;9:319-27.

Castelli C, Maeurer MJ.

The T-cell response in patients with cancer.

Adv Cancer Res. 2002;86:149-93.

Cersosimo RJ.

Lung cancer: a review.

Am J Health Syst Pharm. 2002;59(7):611-42.

Cheroutre H, Madakamutil L.

Mucosal effector memory T cells: the other side of the coin.

Cell Mol Life Sci. 2005;62(23):2853-66.

Coleman RM, Lombard MF, Sicard RE, Rencricca NJ.

Fundamental Immunology

Dubuque, Iowa, USA : Wm. C. Brown Publishers, 1987, 120-121.

Cordel N, Lenormand B, Courville P, Lauret P, Joly P.

Réarrangement des gènes du récepteur des lymphocytes T cutanés par la technique de PCR-DGGE pour le diagnostic étiologique des érythrodermies.

Ann. Dermatol. Venereol. 2001;128:220-223.

Coronella JA, Telleman P, Kingsbury GA, Truong TD, Hays S, Junghans RP.

Evidence for an antigen-driven humoral immune response in medullary ductal breast cancer.

Cancer Res. 2001;61(21):7889-99.

Cours de médecine UHP Nancy I

Cancérogenèse bronchique et rétinoïdes

Faculté de médecine UHP Nancy I

Disponible sur : <http://www.medecine.uhp->

[nancy.fr/pages/autres_formations/cours0506/cancer_bronchique.pdf](http://www.medecine.uhp-nancy.fr/pages/autres_formations/cours0506/cancer_bronchique.pdf).

Coux O, Piechaczyk M.

Le système ubiquitine/protéasome : un ensemble (de) complexe(s) pour dégrader les protéines.

médecine/sciences 2000;16:623-9.

Creusot RJ, Mitchison NA, Terazzini NM.

The immunological synapse.

Mol Immunol. 2002;38(12-13):997-1002.

Cunningham AC, Kirby JA.

Regulation and function of adhesion molecule expression by human alveolar epithelial cells.

Immunology 1995;86(2) :279-86.

Dasgupta P, Kinkade R, Joshi B, Decook C, Haura E, Chellappan S.

Nicotine inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic drugs by up-regulating XIAP and surviving.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(16):6332-7.

Delon J, Germain RN.

Information transfer at the immunological synapse.

Current Biology 2000;10:R923-33.

Den Boer AT, van Mierlo GJ, Franssen MF, Melief CJ, Offringa R, Toes RE.

CD4+ T cells are able to promote tumor growth through inhibition of tumor-specific CD8+ T-cell responses in tumor-bearing hosts.

Cancer Res. 2005;65(15):6984-9.

Doll R.

Mortality from lung cancer in asbestos workers.

Br J Ind Med. 1955;12(2):81-6.

Doll R, Hill AB.

Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report.

Br Med J. 1950;2(4682):739-48.

Dustin ML.

Coordination of T cell activation and migration through formation of the immunological synapse.

Ann N Y Acad Sci. 2003;987:51-9.

Echchakir H, Asselin-Paturel C, Dorothee G, Vergnon I, Grunnenwald D, Chouaib S, Mami-Chouaib F.

Analysis of T-cell-receptor β -chain-gene usage in peripheral-blood and tumor-infiltrating lymphocytes from human non-small-cell lung carcinomas.

Int. J. Cancer 1999;81:205-13.

Edelman J, Meyerson HJ.

Diminished CD3 expression is useful for detecting and enumerating Sezary cells.

Am. J. Clin. Pathol. 2000;114:467-77.

Faveeuw C, Di Mauro ME, Price AA, Ager A.

Roles of alpha(4) integrins/VCAM-1 and LFA-1/ICAM-1 in the binding and transendothelial migration of T lymphocytes and T lymphoblasts across high endothelial venules.

Int Immunol. 2000;12(3):241-51.

Fierabracci P, Pinchera A, Campani D, Pollina LE, Giustarini E, Giani C.

Association between breast cancer and autoimmune thyroid disorders: no increase of lymphocytic infiltrates in breast malignant tissues.

J Endocrinol Invest. 2006;29(3):248-51.

Flug F, Pelicci P.G, Bonetti F, Knowles DM, Dalla-Favera R.

T-cell receptor gene rearrangements as markers of lineage and clonality in T-cell neoplasms.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985;82:3460-64.

Flynn S, Stockinger B.

Tumor and CD4 T-cell interactions: tumor escape as result of reciprocal inactivation.
Blood. 2003;101(11):4472-8.

Fong KM, Minna JD.

Molecular biology of lung cancer: clinical implications.
Clin Chest Med. 2002;23(1):83-101.

Foti M, Phelouzat MA, Holm A, Rasmusson B, Carpentier JL.

p56Lck anchors CD4 to distinct microdomains on microvilli.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002;99:2008-13.

Foukas PG, Tsilivakos V, Zacharatos P, Mariatos G, Moschos S, Syrianou A, Asimacopoulos P, Bramis J, Fotiadis C, Kittas C, Gorgoulis VG.

Expression of HLA-DR is reduced in tumor infiltrating immune cells (TIICs) and regional lymph nodes of non-small-cell lung carcinomas. A putative mechanism of tumor-induced immunosuppression?
Anticancer research 2001;21:2609-16.

Fondation québécoise du cancer.

Causes et mécanismes des cancers, 2006.

Disponible sur : <http://www.fqc.qc.ca/encyclotexte.asp?id=52>.

Franciosi S, Choi HB, Kim SU, McLarnon JG.

IL-8 enhancement of amyloid-beta (Abeta 1-42)-induced expression and production of pro-inflammatory cytokines and COX-2 in cultured human microglia.
J Neuroimmunol. 2005;159(1-2):66-74.

Friedman RS, Jacobelli J, Krummel MF.

Mechanisms of T cell motility and arrest: deciphering the relationship between intra- and extracellular determinants.
Semin Immunol. 2005;17(6):387-99.

Furukawa K, Kato H, Konaka C, Okunaka T, Usuda J, Ebihara Y.

Locally recurrent central-type early stage lung cancer < 1.0 cm in diameter after complete remission by photodynamic therapy.

Chest. 2005;128(5):3269-75.

Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F.

MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape.

J Cell Physiol. 2003;195(3):346-55.

Gerloni M, Zanetti M.

CD4 T cells in tumor immunity.

Springer Semin Immunopathol. 2005;27(1):37-48.

Glanville AR, Tazelaar HD, Theodore J, Imoto E, Rouse RV, Baldwin JC, Robin E.D.

The distribution of MHC class I and II antigens on bronchial epithelium.

Am. Rev. Respir. Dis. 1989;139:330-334.

Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA.

Immunologie, le cours de Janis Kuby

New York : W.H. Freeman, 2000, 660 p.

Gouyer V, Conti M, Devos P, Zerimech F, Copin MC, Creme E, Wurtz A, Porte H, Huet G.

Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 is an independent predictor of prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma who undergo resection with curative intent.

Cancer. 2005;103(8):1676-84.

Greiner TC, Raffeld M, Lutz C, Dick F, Jaffe ES.

Analysis of T cell receptor-gamma gene rearrangements by denaturing gradient gel electrophoresis of GC-clamped polymerase chain reaction products. Correlation with tumor-specific sequences.

Am J Pathol. 1995;146(1):46-55.

Hasturk S, Kemp B, Kalapurakal SK, Kurie JM, Hong WK, Lee JS.
Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in bronchial epithelium and nonsmall cell lung carcinoma.
Cancer. 2002;94(4):1023-31.

Hatanaka H, Abe Y, Kamiya T, Morino F, Nagata J, Tokunaga T, Oshika Y, Suemizu H, Kijima H, Tsuchida T, Yamazaki H, Inoue H, Nakamura M, Ueyama Y.
Clinical implications of interleukin (IL)-10 induced by non-small-cell lung cancer.
Ann Oncol. 2000;11(7):815-9.

Hayday A, Gibbons D.
Regulated T-cell development: a victim of multiple conspiracies.
Immunology 2001;104:8-10.

Heron JF.
Cancérologie générale.
Pr Heron JF de l'Université de Caen, 13/08/2005.
Disponible sur : <http://www.oncoprof.net/Generale2000/index.html>

Hirao T, Nelson HH, Ashok TD, Wain JC, Mark EJ, Christiani DC, Wiencke JK, Kelsey KT.
Tobacco smoke-induced DNA damage and an early age of smoking initiation induce chromosome loss at 3p21 in lung cancer.
Cancer Res. 2001;61(2):612-5.

Hoffman PC, Mauer AM, Vokes EE.
Lung cancer.
Lancet. 2000;355(9202):479-85.
Huang J, Kishimoto Y, Sugio K, Virmani A, Mc Intire DD, Minna JD, Gazdar AF.
Allele specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma.
JAMA 1995;273:558-63.

Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H.
The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response.
J Exp Med. 1998;188(12):2357-68.

Hussain SF, Heimberger AB.
Immunotherapy for human glioma: innovative approaches and recent results.
Expert Rev Anticancer Ther. 2005;5(5):777-90.

INVS

Mortalité par cancer du poumon en France métropolitaine. Analyse de tendance et projection de 1975 à 2014.

Institut de Veille Sanitaire (INVS), octobre 2005.

Disponible sur : http://www.invs.sante.fr/publications/2005/cancer_poumon

Ishigami S, Natsugoe S, Miyazono F, Tokuda K, Nakajo A, Matsumoto M, Okumura H, Nakashima S, Hokita S, Maruyama I, Aikou T.
CD3 zeta expression of regional lymph node and peripheral blood lymphocytes in gastric cancer.
Anticancer Res. 2004;24:2123-26.

Iyer S, Wang ZG, Akhtari M, Zhao W, Seth P.
Targeting TGFbeta signaling for cancer therapy.
Cancer Biol Ther. 2005;4(3):261-6.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M.
Immuno biology, the immune system in health and disease, 5th edition
New York et Londres : Garland Publishing Inc 2001

Jarnicki AG, Fitzpatrick DR, Robinson BW, Bielefeldt-Ohmann H.
Altered CD3 chain and cytokine gene expression in tumor infiltrating T lymphocytes during the development of mesothelioma.
Cancer Lett. 1996;103(1):1-9.

Jones CM, Lake RA, Wijeyekoon JB, Mitchell DM, du Bois RM, O'Hehir RE.
Oligoclonal V gene usage by T lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid from sarcoidosis patients.

Am J Respir Cell Mol Biol. 1996;14(5):470-7.

Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D.

VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche.
Nature. 2005;438(7069):820-7.

Kirii Y, Magarian-Blander J, Alter MD, Kotera Y, Finn OJ.

Functional and molecular analysis of T cell receptors used by pancreatic-and breast tumor-(mucin-) specific cytotoxic T cells.

J. Immunother. 1998;21:188-97.

Kim JY, Kim D, Choi I, Yang JS, Lee DS, Lee JR, Kang K, Kim S, Hwang WS, Lee JS, Ahn C.

MHC expression in a human adult stem cell line and its down-regulation by hCMV US gene transfection.

Int J Biochem Cell Biol 2005;37:69-78.

Knutson KL, Disis ML.

Augmenting T helper cell immunity in cancer.

Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord. 2005 Dec;5(4):365-71.

Konig R.

Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR.

Curr Opin Immunol. 2002;14(1):75-83.

Korn S, Wiewrodt R, Walz YC, Becker K, Mayer E, Krummenauer F, Buhl R. Characterization of the interstitial lung and peripheral blood T cell receptor repertoire in cigarette smokers.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2005;32(2):142-8.

Kreuzer M, Gerken M, Kreienbrock L, Wellmann J, Wichmann HE.

Lung cancer in lifetime nonsmoking men - results of a case-control study in Germany.

Br J Cancer. 2001;84(1):134-40.

Krogsgaard M, Huppa JB, Purbhoo MA, Davis MM.

Linking molecular and cellular events in T-cell activation and synapse formation.

Semin Immunol. 2003;15(6):307-15.

Kuby J.

Immunology, 4th Edition.

New York : W.H. Freeman, 2000.

Kufer P, Zetti F, Borschert K, Lutterbüse R, Kischel R, Riethmüller G.

Minimal costimulatory requirements for T cell priming and TH1 differentiation: Activation of naive human T lymphocytes by tumor cells armed with bifunctional antibody constructs.

Cancer Immunity 2001;1:10-32.

Kuo SH, Chang DB, Lee YC, Luh KT.

Tumor-infiltrating lymphocytes in non-small cell lung cancer are activated T lymphocytes.

Respirology 1998;3:55-59.

Le Calvez F, Mukeria A, Hunt JD, Kelm O, Hung RJ, Tanjore P, Brennan P, Boffetta P, Zaridze DG, Hainaut P.

TP53 and KRAS mutation load and types in lung cancers in relation to tobacco smoke: distinct patterns in never, former, and current smokers.

Cancer Res. 2005;65(12):5076-83.

Lee MS.

Cytokine synergism in apoptosis: its role in diabetes and cancer.

J Biochem Mol Biol. 2002;35(1):54-60.

Lee YW, Eum SY, Nath A, Toborek M.

Estrogen-mediated protection against HIV Tat protein-induced inflammatory pathways in human vascular endothelial cells.

Cardiovasc Res. 2004;63(1):139-48.

Lefranc MP.

Appropriation par la Recherche des Technologies de l'IST, 2006.

Disponible sur : http://artist.inist.fr/article.php3?id_article=213.

Legrand Nicolas.

Sélection centrale, survie et sélection périphérique des lymphocytes T $\alpha\alpha$ CD8+

Th : Immunologie : Paris VI, 2002, 264p.

Lemonnier François.

Cours de virologie fondamentale.

Paris, DEA Jussieu-Institut Pasteur, 2001.

Disponible sur : <http://virologie.free.fr/00-plan/Plan.htm>

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ.

The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology.

Cell. 2001;104(4):487-501.

MacDonald IC, Groom AC, Chambers AF.

Cancer spread and micrometastasis development: quantitative approaches for in vivo models.

Bioessays. 2002;24(10):885-93.

Madjd Z, Spendlove I, Pinder SE, Ellis IO, Durrant LG.

Total loss of MHC class I is an independent indicator of good prognosis in breast cancer.

Int J Cancer. 2005;117(2):248-55.

Marin R, Ruiz-Cabello F, Pedrinaci S, Mendez R, Jimenez P, Geraghty DE, Garrido F.
Analysis of HLA-E expression in human tumors.
Immunogenetics. 2003;54(11):767-75.

Martinet Y, Brambilla E, Martin JP, Martinet N, Vignaud JM.
Les bases biologiques de la prévention du cancer du poumon.
Médecine Sciences, 1997;13:1465-71.

Massin Frédéric.

Expression de tétraspanines et d'intégrines $\beta 1$, et immunomodulation dans le cancer du poumon.

Th : Biologie cellulaire : Nancy I, 2004, 156p.

Matakidou A, Eisen T, Fleischmann C, Bridle H, Houlston RS.

Evaluation of xeroderma pigmentosum XPA, XPC, XPD, XPF, XPB, XPG and DDB2 genes in familial early-onset lung cancer predisposition.

Int J Cancer. 2006; [Epub ahead of print].

Matanic D, Beg-Zec Z, Stojanovic D, Matakoric N, Flego V, Milevoj-Ribic F.

Cytokines in patients with lung cancer.

Scand J Immunol. 2003;57(2):173-8.

McDermott R, Beuvon F, Pauly M, Pallud C, Vincent-Salomon A, Mosseri V, Pouillart P, Scholl SM.

Tumor antigens and antigen-presenting capacity in breast cancer;

Pathobiology 2002;70:324-32.

McLoud TC.

Imaging techniques for diagnosis and staging of lung cancer.

Clin Chest Med. 2002;23(1):123-36.

Melioli G, Ratto G, Guastella M, Meta M, Biassoni R, Semino C, Casartelli G, Pasquetti W, Catrullo A, Moretta L.

Isolation and in vitro expansion of lymphocytes infiltrating non-small cell lung carcinoma : functional and molecular characterisation for their use in adoptive immunotherapy.

Europ. J. Cancer 1994;30:97-102.

Menon AG, Fleuren GJ, Alphenaar EA, Jonges LE, Janssen van Rhijn CM, Ensink NG, Putter H, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Kuppen PJ.

A basal membrane-like structure surrounding tumour nodules may prevent intraepithelial leucocyte infiltration in colorectal cancer.

Cancer Immunol Immunother. 2003;52(2):121-6.

Merlot Elodie.

Modulation de la production de cytokines par l'environnement social et susceptibilité aux infections.

Th : Sciences animales : Paris, 2003, 228p.

Merrill RM.

Measuring the projected public health impact of lung cancer through lifetime and age-conditional risk estimates.

Ann Epidemiol. 2000;10(2):88-96.

Merrill RM, Lyon JL.

Cancer incidence among Mormons and non-Mormons in Utah (United States) 1995-1999.

Prev Med. 2005;40(5):535-41.

Meta M, Ponte M, Guastella M, Semino C, Pietra G, Ratto GB, Melioli G.

Detection of oligoclonal T lymphocytes in lymph nodes draining from advanced non-small-cell lung cancer.

Cancer Immunol Immunother. 1995;40(4):235-40.

Milleron B.

Cancer bronchique.

Paris : Laboratoires Sandoz, 1995, 258p.

Minna JD.

Nicotine exposure and bronchial epithelial cell nicotinic acetylcholine receptor expression in the pathogenesis of lung cancer.

J Clin Invest. 2003;111(1):31-3.

Moller B, Kukoc-Zivojnov N, Kessler U, Rehart S, Kaltwasser JP, Hoelzer D, Kalina U, Ottmann OG.

Expression of interleukin-18 and its monokine-directed function in rheumatoid arthritis.

Rheumatology (Oxford). 2001;40(3):302-9.

Morimoto C, Schlossman SF.

P. Rambotti Lecture. Human naive and memory T cells revisited: new markers (CD31 and CD27) that help define CD4+ T cell subsets.

Clin Exp Rheumatol. 1993;11(3):241-7.

Mountain CF.

Staging classification of lung cancer. A critical evaluation.

Clin Chest Med. 2002;23(1):103-21.

Muller-Hagen G, Beinert T, Sommer A.

Aspects of lung cancer gene expression profiling.

Curr Opin Drug Discov Devel. 2004;7(3):290-303.

Murayama J, Yoshizawa Y, Sato T, Ishikawa H, Ohtsuka M, Inoue T, Toyoda H.

A compartmentalized bias for T-cell receptor V beta usage in summer-type hypersensitivity pneumonitis.

Int Arch Allergy Immunol. 1995;107(4):581-6.

Nakabayashi H, Nakashima M, Hara M, Toyonaga S, Yamada SM, Park KC, Shimizu K.
Clinico-pathological significance of RCAS1 expression in gliomas: A potential mechanism of tumor immune escape.
Cancer Lett. 2006; [Epub ahead of print]

Nakagomi M, Petersson M, Magnusson I, Juhlin C, Matsuda M, Mellstedt H, Taupin JL, Vivier E, Anderson P, Kiessling R.
Decreased expression of the signal-transducing zeta chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma.
Cancer Research 1993;53:5610-12.

Nakamura H, Saji H, Ogata A, Hosaka M, Hagiwara M, Kawasaki N, Konaka C, Kato H.
Immunologic parameters as significant prognostic factors in lung cancer.
Lung Cancer. 2002 Aug;37(2):161-9.

Nakamura H, Saji H, Ogata A, Hosaka M, Hagiwara M, Kawasaki N, Kato H.
Correlation between encoded protein overexpression and copy number of the HER2 gene with survival in non-small cell lung cancer.
Int J Cancer. 2003;103(1):61-6.

Nijman HW, van Diest PJ, Poort-Keesom RJ, von Mensdorff-Pouilly S, Verstraeten RA, Kummer A, Meijer CJ, Melief CJ, Hilgers J, Kenemans P.
T cell infiltration and MHC I and II expression in the presence of tumor antigens: An immunohistochemical study in patients with serous epithelial ovarian cancer.
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2001;94(1):114-20.

Noble A.
Molecular signals and genetic reprogramming in peripheral T-cell differentiation.
Immunology 2000;101:289-99.

Ohtani H.

Pathophysiologic significance of host reactions in human cancer tissue : desmoplasia and tumor immunity.

Tohoku J. Exp. Med. 1999;187:193-202.

Ohtani H.

Stromal reaction in cancer tissue : pathophysiologic significance of the expression of matrix-degrading enzymes in relation to matrix turnover and immune/inflammatory reactions.

Pathol. Int. 1998;48:1-9.

Ortega JW, Staren ED, Faber LP, Warren WH, Braun DP.

Modulation of tumor-infiltrating lymphocyte cytolytic activity against human non-small cell lung cancer.

Lung Cancer 2002;36:17-25.

Ortega JW, Staren ED, Faber LP, Warren WH, Braun DP.

Cytokine biosynthesis by tumor-infiltrating T lymphocytes from human non-small cell lung carcinoma.

Cancer. Immuno. Immunother. 1999;48:627-34.

Osada H, Takahashi T.

Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer.

Oncogene. 2002;21(48):7421-34.

Ostrand-Rosenberg S.

CD4⁺ T lymphocytes: a critical component of antitumor immunity.

Cancer Invest. 2005;23(5):413-9.

Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J.

Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer.

N Engl J Med. 2005;353(25):2654-66.

Panigrahy D, Singer S, Shen LQ, Butterfield CE, Freedman DA, Chen EJ, Moses MA, Kilroy S, Duensing S, Fletcher C, Fletcher JA, Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J, Kaipainen A.

PPARgamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis.

J Clin Invest. 2002;110(7):923-32.

Pauk N, Kubik A, Zatloukal P, Krepela E.

Lung cancer in women.

Lung Cancer. 2005;48(1):1-9.

Paul WE.

Fundamental Immunology, fourth edition.

Philadelphie, New-York, USA : Lippincott-Raven Publishers, 1998, 750-800.

Pavlov N, Hatzi E, Bassaglia Y, Frendo JL, Brion DE, Badet J.

Angiogenin distribution in human term placenta, and expression by cultured trophoblastic cells.

Angiogenesis. 2003;6(4):317-30.

Payne AS, Cornelius LA.

The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis.

J Invest Dermatol. 2002;118(6):915-22.

Pepper MS.

Angiogenèse et morphogenèse de l'arbre vasculaire : de la biologie cellulaire à la clinique.

Médecine/Sciences 2000;16:1378-86.

Peoples GE, Davey MP, Goedegebuure PS, Schoof DD, Eberlein TJ.

T cell receptor V beta 2 and V beta 6 mediate tumor-specific cytotoxicity by tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian cancer.

J. Immunol. 1993;151:5472-80.

Perales MA, Blachere NE, Engelhorn ME, Ferrone CR, Gold JS, Gregor PD, Noffz G, Wolchok JD, Houghton AN.

Strategies to overcome immune ignorance and tolerance.

Cancer Biology 2002;12:63-71.

Platsoucas CD, Fincke JE, Pappas J, Jung WJ, Heckel M, Scharfing R, Magira E, Monos D, Freedman RS.

Immune responses to human tumors : development of tumor vaccines.

Anitcancer Res. 2003;23:1969-96.

PNNS

Programme National Nutrition Santé-PNNS 2001-2005

Programme National Nutrition Santé, janvier 2001.

Disponible sur : http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/34_010131.htm

Poccia F, Agrati C, Ippolito G, Colizzi V, Malkovsky M.

Natural T cell immunity to intracellular pathogens and nonpeptidic immunoregulatory drugs.

Curr Mol Med. 2001;1(1):137-51.

Porcelli S, Brenner MB, Band H.

Biology of the human gamma delta T-cell receptor.

Immunol Rev. 1991;120:137-83.

Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV.

In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene.

Eur J Immunogenet. 1999;26(1):1-3.

Rabinowich J, Banks M, Reichert TE, Logan TF, Kirkwood JM, Whiteside TL.
Expression and activity of signaling molecules in T lymphocytes obtained from patients with metastatic melanoma before and after interleukin 2 therapy.
Clinical Cancer Research 1996;8:1263-74.

Ranges GE, Figari IS, Espevick T, Palladino MA Jr.
Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha.
J. Exp. Med. 1987;166:991-8.

Reichert TE, Strauss L, Wagner EM, Gooding W, Whiteside TL.
Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma.
Clin Cancer Res. 2002;8(10):3137-45.

Reichert TE, Scheuer C, Day R, Wagner W, Whiteside TL.
The number of intratumoral dendritic cells and ζ -chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma.
Cancer 2001;91:2136-47.

Révillard Jean-Pierre.
Immunologie, 4^{ème} édition.
Bruxelles : De Boeck et Larcier, 2001, 595p.

Rioux Nathalie.
Etudes précliniques de prévention de la carcinogénèse pulmonaire par les anti-inflammatoires non-stéroïdiens et les inhibiteurs de lipooxygénases.
Th : pharmacie : Nancy I : 2000, 242 p.

Rossant L, Rossant-Lumbroso J.
Dossier cancer du poumon
Disponible sur : http://www.doctissimo.fr/html/dossiers/cancer_poumon.htm

Rowen L, Koop BF, Hood L.

The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus.
Science. 1996;272(5269):1755-62.

Ruano-Ravina A, Figueiras A, Barreiro-Carracedo MA, Barros-Dios J.

Occupation and smoking as risk factors for lung cancer: a population-based case-control study.

Am J Ind Med. 2003;43(2):149-55.

Rudack C, Jorg S, Sachse F.

Biologically active neutrophil chemokine pattern in tonsillitis.

Clin Exp Immunol. 2004;135(3):511-8.

Ryschich E, Autschbach F, Eisold S, Klar E, Buchler MW, Schmidt J.

Expression of HLA classI/II antigens and T cell immune response in human neuroendocrine tumors of the pancreas.

Tissue Antigens 2003;62:48-54.

Salvi S, Holgate S.

Could the airway epithelium play an important role in mucosal immunoglobulin A production?

Clin. Exp. Allergy 1999;29:1597-1605.

Sambrook J., Fritsch EF, Maniatis T.

Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd edition.

New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Santin AD, Ravaggi A, Bellone S, Pecorelli S, Cannon M, Parham GP, Hermonat PL.

Tumor-infiltrating lymphocytes contain higher numbers of type 1 cytokine expressors and DR+ T cells compared with lymphocytes from tumor draining lymph nodes and peripheral blood in patients with cancer of the uterine cervix.

Gynecol Oncol. 2001;11(3):424-32.

Schneider R, Schmitt F, Frochot C, Fort Y, Lourette N, Guillemin F, Muller JF, Barberi-Heyob M. Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy. *Bioorg Med Chem.* 2005;13(8):2799-808.

Schule J, Bergkvist L, Hakansson L, Gustafsson B, Hakansson A. Down-regulation of the CD3-zeta chain in sentinel node biopsies from breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 2002;74:33-40.

Schwabe RF, Bataller R, Brenner DA. Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;285(5):G949-58.

Schwartz AG, Ruckdeschel JC. Familial lung cancer: genetic susceptibility and relationship to chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(1):16-22.

Seddiki N, Santner-Nanan B, Tangye SG, Alexander SI, Solomon M, Lee S, Nanan R, Fazekas de St Groth B. Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life. *Blood* 2006;107:2830-38.

Seliger B, Cabrera T, Garrido F, Ferrone S. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Cancer Biology* 2002;12:3-13.

Shen Lianjun

Molecular mechanisms of cytotoxic T lymphocyte recognition and activation.

Th : Medical microbiology and immunology : Edmonton, Alberta, Canada : 1997, 208p.

Shibuya TY, Nugyen N, McLaren CE, Li KT, Wei WZ, Kim S, Yoo GH, Rogowski A, Ensley J, Sakr W.

Clinical significance of poor CD3 response in head and neck cancer.

Clinical cancer research 2002;8:745-51.

Shimizudani N, Murata H, Keino H, Kojo S, Nakamura H, Morishima Y, Sakamoto T, Ohtsuka M, Sekisawa K, Sumida M, Sumida T, Matsuoka T.

Conserved CDR 3 region of T cell receptor BV gene in lymphocytes from bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis.

Clin Exp Immunol. 2002;129(1):140-9.

Shimizudani N, Murata H, Kojo S, Adachi Y, Keino H, Tsuchida F, Sumida M, Kawamata M, Sumida T, Matsuoka T.

Analysis of T cell receptor V β gene expression and clonality in bronchoalveolar fluid lymphocytes from a patient with chronic eosinophilic pneumonitis.

Lung 2001;179:31-41.

Sikora J, Zeromski J.

Expression of TCR-zeta chain and apoptosis in subpopulations of tumor-associated lymphocytes (TALs) from malignant pleural effusions.

Folia Histochem Cytobiol. 2002;40(4):347-51.

Stabile LP, Davis AL, Gubish CT, Hopkins TM, Luketich JD, Christie N, Finkelstein S, Siegfried JM.

Human non-small cell lung tumors and cells derived from normal lung express both estrogen receptor alpha and beta and show biological responses to estrogen.

Cancer Res. 2002;62(7):2141-50.

Sumen C, Dustin ML, Davis MM.

T cell receptor antagonism interferes with MHC clustering and integrin patterning during immunological synapse formation.

J Cell Biol. 2004;166(4):579-90.

Takahashi T, Kono K, Amemiya H, Iizuka H, Fujii H, Matsumoto Y.
Elevated caspase-3 activity in peripheral blood T cells coexists with increased degree of T-cell apoptosis and down regulation of TCR zeta molecules in patients with gastric cancer.
Clinical Cancer Research 2001;7:74-80.

Tanoue LT.
Cigarette smoking and women's respiratory health.
Clin Chest Med. 2000;21(1):47-65.

Tartour E, Latour S, Mathiot C, Thiounn N, Mosseri V, Joyeux I, D'enghien CD, Lee R, Debre B, Fridman WH.
Variable expression of CD3-zeta chain in tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) derived from renal-cell carcinoma : relationship with TIL phenotype and function.
Int. J. Cancer 1995;63:205-12.

Taylor DD, Edwards RP, Case CR, Gercel-Taylor C.
Modulation of CD3-zeta as a marker of clinical response to IL-12 therapy in ovarian cancer patients.
Gynecol. Oncol. 2004;94:54-60.

Theodorou I, Bigorgne C, Delfau MH, Lahet C, Cochet G, Vidaud M, Raphael M, Gaulard P, Farcet JP.
VJ rearrangements of the TCR γ locus in peripheral T-cell lymphomas : analysis by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis.
J. Pathol. 1996;178, 303-310.

Tomasi TB, Magner WJ, Khan AN. Related Articles, Links
Epigenetic regulation of immune escape genes in cancer.
Cancer Immunol Immunother. 2006 May 6; [Epub ahead of print]

Torelli GF, Paolini R, Tatrelli C, Soriani A, Vitale A, Guarini A, Santoni A, Foa R.
Defective expression of the T cell receptor-CD3 zeta chain in T-cell acute lymphoblastic leukaemia.
British Journal of Haematology 2003;120:201-208.

Travis WD.
Pathology of lung cancer.
Clin Chest Med., 2002;23(1):65-81.

Tripathy NK, Chauhan SK, Nityanand S.
Cytokine mRNA repertoire of peripheral blood mononuclear cells in Takayasu's arteritis.
Clin Exp Immunol. 2004;138(2):369-74.

Trojan A, Urosevic M, Dummer R, Giger R, Weder W, Stahel RA.
Immune activation status of CD8+ T cells infiltrating non-small cell lung cancer.
Lung Cancer 2004;44:143-7.

Trojan A, Tun-kyi A, Odermatt B, Nestle FO, Stahel R.
Functional detection of epithelial cell adhesion molecule specific cytotoxic T lymphocytes in patients with lung cancer and in healthy donors.
Lung Cancer 2002;36:151-8.

Tutin C.
Dossier cancer du poumon
Disponible sur : http://www.doctissimo.fr/html/dossiers/cancer_poumon.htm

Usui Y, Kohsaka H, Eishi Y, Saito I, Marumo F, Miyasaka N.
Shared amino acid motifs in T-cell receptor beta junctional regions of bronchoalveolar T cells in patients with pulmonary sarcoidosis.
Am J Respir Crit Care Med. 1996;154(1):50-6.

Valitutti S, Lanzavecchia A.

Serial triggering of TCRs: a basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition.
Immunol. Today 1997;18:299-304.

Van Den Eynde B, Van Der Bruggen D.

T cell defined tumor antigens.
Curr. Opin. Immunol. 1997;9:684-93.

Verschuren MC, Wolvers-Tettero IL, Breit TM, Van dongen JJ.

T-cell receptor V δ -J α rearrangements in human thymocytes : the role of V δ -J α rearrangements in T-cell receptor- δ gene deletion.
Immunology 1998;93:208-12.

Viale M, Ferrini S, Serrano S, Serrano D, Ardizzoni A, Nicolin A.

Peripheral blood and tumor infiltrating lymphocytes in non-small cell lung cancer : analysis at the population and clonal level.
Tumori 1990;76:488-94.

Vignaud JM, Marie B, Picard E, Nabil K, Siat J, Galateau-Salle F, Borrelly J, Martinet Y, Martinet N.

Clinical and biological basis of lung cancer prevention.
Basel : Birkhäuser Verlag Editions, 1998.

Villunger A, Strasser A.

The great escape : Is immune evasion required for tumor progression ?
Nature Medecine 1999;5:874-5.

Schleinitz N, Hamidou M, Vely F, Paul P, Figarella-Branger D, Kaplanski G, Dignat-George F, Vivier E, Harle JR.

NK cells: new insights on physiology and clinical implication in diseases.
Rev Med Interne. 2005; [Epub ahead of print]

Von Bernstorff W, Voss M, Freichel S, Schmid A, Vogel I, Johnk C, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H.

Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients.

Clin Cancer Res. 2001;7(3 Suppl):925s-32s.

Wente MN, Keane MP, Burdick MD, Friess H, Buchler MW, Ceyhan GO, Reber HA, Strieter RM, Hines OJ.

Blockade of the chemokine receptor CXCR2 inhibits pancreatic cancer cell-induced angiogenesis.

Cancer Lett. 2006; [Epub ahead of print].

Werlen G, Palmer E.

The TCR signalosome: a dynamic structure with expanding complexity.

Curr. Opin. Immunol. 2002;14:299-305.

Wetzel SA, McKeithan TW, Parker DC.

Peptide-specific intercellular transfer of MHC class II to CD4⁺ T cells directly from the immunological synapse upon cellular dissociation.

J Immunol. 2005;174(1):80-9.

Wheater PR, Burkitt GH, Daniels VG.

Histologie fonctionnelle, 2nd Edition.

Paris : Medsi/McGraw-Hill Editions, 1987, 351p.

Whiteside TL.

Down-regulation of zeta-chain expression in T cells: a biomarker of prognosis in cancer?

Cancer Immunol Immunother. 2004;53(10):865-78.

Whiteside TL.

Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention.

Semin Cancer Biol. 2006;16(1):3-15.

Whiteside TL.

Signaling defects in T lymphocytes of patients with malignancy.

Cancer Immunol Immunother. 1999;48(7):346-52.

Wick W, Naumann U, Weller M.

Transforming growth factor-beta: a molecular target for the future therapy of glioblastoma.

Curr. Pharm. Des. 2006;12(3):341-9.

Williams MD, Sandler AB.

The epidemiology of lung cancer.

Cancer Treat Res. 2001;105:31-52.

Woo EY, Yeh H, Chu CS, Schlienger K, Carrol RG, Riley JL, Kaiser LR, June CH.

Cutting edge : Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation.

J. Immunol. 2002;168:4272-76.

World Health Organization (WHO).

Tobacco Alert, Special Issue, 1996.

Disponible sur : <http://www.who.int>

World Health Organization (WHO).

The millenium development goals and tobacco control, 2004.

Disponible sur : http://www.who.int/tobacco/publications/mdg_final_for_web.pdf

Wu JD, Higgins LM, Steinle A, Cosman D, Haugk K, Plymate SR.

Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer.

J Clin Invest. 2004;114(4):560-8.

Xiang J, Huang H, Liu Y.

A new dynamic model of CD8+ T effector cell responses via CD4+ T helper-antigen-presenting cells.

J Immunol. 2005;174(12):7497-505.

Yokota J, Kohno T.

Molecular footprints of human lung cancer progression.

Cancer Sci. 2004;95(3):197-204.

Yoshino I, Fukuyama S, Kameyama T, Shikada Y, Oda S, Maehara Y, Sugimachi K.

Detection of loss of heterozygosity by high-resolution fluorescent system in non-small cell lung cancer: association of loss of heterozygosity with smoking and tumor progression.

Chest. 2003;123(2):545-50.

Yoshino I, Yano T, Murata M, Miyamoto M, Ishida T, Sugimachi K, Kimura G, Nomoto K.

Phenotype of lymphocytes infiltrating non-small cell lung cancer tissues and its variations with histological types of cancer.

Lung Cancer 1993;10:13-19.

Zamoyska R.

CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses?

Curr. Opin. Immunol. 1998;10:82-87.

Zhou S, Glowacki J, Yates KE.

Comparison of TGF-beta/BMP pathways signaled by demineralized bone powder and BMP-2 in human dermal fibroblasts.

J Bone Miner Res. 2004;19(10):1732-41.

Zimmermann VS, Benigni F, Mondino A.

Immune surveillance and anti-tumor immune responses: an anatomical perspective.

Immunol Lett. 2005;98(1):1-8..

Zimmermann C, Prevost-Blondel A, Blaser C, Pircher H.

Kinetics of the response of naive and memory CD8 T cells to antigen: similarities and differences.

Eur J Immunol. 1999;29(1):284-90.

Zitvogel L, Faure F.

L'immunité antitumorale : des concepts à l'immunothérapie active spécifique.

Médecine/sciences 1999;15:939-49.

ARTICLE

Comparative T-cell oligoclonality in lung, tumor and lymph nodes in human non-small cell lung cancer

SOPHIE DERNIAME¹, JEAN-MICHEL VIGNAUD², GILBERT C. FAURE¹,
MARIE C. BÉNÉ¹ and FRÉDÉRIC MASSIN¹

¹Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine et CHU de Nancy, BP184, 54500 Vandoeuvre les Nancy;

²Laboratoire d'Anatomie Pathologique, CHU de Nancy 29 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 54000 Nancy, France

Received August 30, 2004; Accepted October 29, 2004

Abstract. In lung cancer as in other malignancies, tumor formation induces the development of local and systemic antitumoral immune responses. The tumor itself becomes surrounded by a local stroma reaction containing inflammatory cells, a large part of which being tumor infiltrating T-lymphocytes. This study was designed to investigate the potential clonality of these T-cells in non-small cell lung cancer. Two complementary methods were used: exploration of the V β TCR repertoire usage in flow cytometry and analysis of the V γ TCR repertoire in multiplex PCR and gradient gel electrophoresis. These techniques were applied respectively to eluted fresh lymphocytes and extracted DNA from healthy lung tissue, tumor and lymph nodes from 44 patients. There was a good correlation between the two techniques used. An oligoclonal repertoire restriction was noted in most of the cases and in the three types of tissues studied suggesting the presence of tumor-specific clones. Moreover, VB14 appeared to be the most frequent specificity used whatever the tissue considered, while VB13.1 appeared to be selectively used in the stroma reaction of epidermoid lung carcinomas. A restricted TCR γ band was also present in these tumors, and two more bands of TCR γ were selectively present in adenocarcinomas. The demonstration of both α - β and γ - δ TCR restriction suggests both the recruitment of specific T-cells and their local proliferation within the tumoral tissue. The same feature in healthy lung tissue indicates that it might already be the site of specific anti-tumoral T-cell reactivity. In conclusion, this study reports on the presence of oligoclonal T-cell responses in most cases of non-small cell lung cancer. The comparison of

tumor, healthy tissue and lymph nodes showed some degree of patient-dependent similarities suggestive of tumor specificity.

Introduction

The immune system constantly exerts a surveillance role in order to eradicate potentially tumoral transformed cells (1). This has long been demonstrated in animal models or human observations of high cancer incidence in immunocompromised individuals (2). Several mechanisms have been demonstrated to be responsible for this immunological control, including anti-tumoral antigens antibodies, cytotoxic through ADCC, natural killer cell responses related to the deregulation of MHC class I on tumor cells, and tumor-antigen specific cytotoxic T lymphocytes (1,3-6). The development of such anti-tumoral immune responses implies the participation of all actors and machinery of specific immunity, including cell proliferation and the generation of both effector and memory cells (4). Once cancer is clinically obvious, it may be because these mechanisms have been overwhelmed or because the tumor cells found a way to escape the immune system (5,7,8). In the former case, traces of an active anti-tumoral immune response may be found in the form of T-cell clones, bearing the same $\alpha\beta$ -TCR and/or carrying the same TCR γ rearrangement amplified during cell proliferation (1). Conversely, if tumor expansion results from immune escape, there may remain no anti-tumoral T-cells in the stroma reaction at the time of tumor resection (5).

In lung cancer the malignant tissue is partially infiltrated and surrounded by a local stroma reaction as in many other tumors such as breast (9,10), colorectal (11), prostatic (12), ovarian (13), gastric (14), colon (15), bladder (16) and skin cancer (17). The stroma reaction is a non-tumoral connective tissue which provides nutrition and support to tumoral tissue and is constantly remodeling. The stroma reaction is constituted of extracellular matrix, neoangiogenesis and inflammatory cells (18). Characterization of these inflammatory cells in lung cancer has shown that they were in large part T lymphocytes (19-21), as in other tumors (16,17) with a few macrophages and NK cells. Tumor infiltrating T-cells (TIL) have been demonstrated to be specific of tumor antigens in some instances (22-25) yet little is known about the specificity of T-cells in the stroma reaction of lung cancer (26).

Correspondence to: Professor Marie C. Béné, Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine, BP184, 54500 Vandoeuvre les Nancy, France

E-mail: bene@medecine.uhp-nancy.fr

Key words: lung cancer, immune responses to cancer, oligoclonality, TCR, flow cytometry, multiplex PCR

They might be part of the normal lymphocytic population of the lung tissue, or anti-tumoral cells, overwhelmed by the tumor cells, yet displaying TCR characteristics suggestive of their specificity, i.e., clonality.

To examine whether restricted anti-tumoral T-cell responses remained in non-small cell lung cancer patients we used two complementary approaches of TCR restriction investigation concomitantly in tumoral tissues, normal lung tissue and lymph nodes from 44 patients.

Materials and methods

Patients. The population studied comprised 44 patients, 38 males (mean age 61 ± 10 years old) and 6 females (mean age 59 ± 10 years old). Seventeen patients had been diagnosed with adenocarcinoma, 23 with epidermoid carcinoma and 4 with large cells carcinoma. All were eligible for surgery as first therapy.

Tissue samples. Lung tissue samples used in these studies were obtained immediately after curative surgery. Three types of samples were provided by the pathologist after macroscopic examination of surgical material, within hours after the completion of surgery. These samples were respectively i) tumor tissue; ii) apparently normal lung tissue cut-out as far as possible from the tumor and iii) an intrapulmonary lymph node. All samples were placed in saline at room temperature and were processed within six hours of surgery. Part of each sample was used for elution of lymphocytes from fresh tissue. The remnant was snap-frozen in liquid nitrogen then stored at -80°C until further use. When lymph nodes were too small, they were preferentially snap-frozen and not eluted.

Lymphocyte suspensions. For each sample, the part reserved for lymphocyte elution was placed in Hank's buffer (Sigma, St. Louis, MO) in a Petri dish, minced with scissors, then gently shredded using the MediMachine (Dako, Glostrup, Denmark). The cell eluate was sucked out of the Medicon cell (Dako) using an insulin-type 1 ml syringe and placed in about 10 ml of Hank's medium. This solution was gently layered over a Ficoll-Hypaque gradient (Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norway) and centrifuged for 30 min at 400 g at room temperature. The lymphocyte layer was then collected, washed once in Hank's medium and resuspended for use in flow cytometry. Suspensions were adjusted at $10^6/\text{ml}$.

Flow cytometry. The proportion of T-cell subsets in the purified lymphocyte suspension was assessed in flow cytometry using a four color panel of TetraChrome[®] CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) monoclonal antibodies (MoAb). The expression pattern of TCR V β genes on eluted lymphocytes was performed in a flow cytometry technique using the IOTest[®]Beta Mark TCR V β Repertoire Kit (Beckman Coulter). This reagent kit contains 8 mixtures of 3 MoAb specific each for one V β segment. In each of the 8 vials, one of the MoAb is conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC), another to phycoerythrin (PE) and the third to both FITC and PE. Two-color biparametric analysis thus allows to evaluate the proportions of cells labeled with each of the 3 antibodies in each test. The

24 MoAbs provided in the reagent set account for more than 70% of the normal human V β TCR repertoire of peripheral lymphocytes (27).

Aliquots (50 μl) of all cell suspensions were incubated with 5 μl aliquots of TetraChrome[®] or of the 8 MoAb combinations for 30 min at 4°C , washed once in Hank's buffer then resuspended/fixed in 300 μl of 0.1% paraformaldehyde (Sigma) in phosphate buffered saline (PBS).

All samples were then processed in flow cytometry using an EPICS-XL4CMCL (Beckman Coulter) with lymphocyte gating on a forward/side scattergram. Data were expressed as percentages of labeled cells within the lymphocyte population.

TCR γ amplification. All T-cells expressing an $\alpha\beta$ TCR have previously rearranged their $\gamma\delta$ TCR in the course of intrathymic maturation. Most of these rearrangements are unproductive, yet can be detected within the DNA. Demonstration of a restricted TCR γ repertoire in a lymphocyte population suggests that one or several clones proliferated locally from one or several common ancestor T-cells.

In order to examine the TCR γ repertoire of T-cells within the sampled tissues, a small fraction of the frozen material was thawed in STE buffer [Saline-Tris-EDTA; NaCl, 0.2 mM, Tris-HCl, pH 8.0, 10 μM (Merck, Eurolab Polylabo, Créteil, France), EDTA, 0.2 μM (TITRIPLEX[®] III, Merck)] containing 105 mg/l of proteinase K (Merck) and 0.5% of sodium dodecyl sulfate (SDS RECTAPUR[®], Prolabo, Paris, France) for 12 h at 56°C . DNA was then phenol-extracted using the APPLIGENE[®] kit (Prolabo). The amount of DNA recovered from each sample was assessed in spectrophotometry (Beckman DU[®] 640, Beckman Instruments[®], Gagny, France) and adjusted at 100 ng/ μl .

Extracted DNA was then amplified by a multiplex polymerase chain reaction (PCR) using 8 primers supplemented with a GC clamp (Genset Oligos, Paris, France) allowing amplification of the V and J TCR γ repertoires, as reported previously.

PCRs were performed in the following conditions: 2.6 ng extracted DNA, 5 μl reaction buffer, 2.5 mM magnesium chloride, 30 U/ml Goldstar Red[™] Taq polymerase (Eurogentec, Liège, Belgium), 4 mM dNTPs (Master Mix, Eurogentec) and primers. The latter were used at the following concentrations: 1.61 μM V1G, 2.22 μM V9G, 1.83 μM V10G, 2.65 μM V11G, 2.51 μM J1, 1.34 μM JP, 1.89 μM JP1B, 1.84 μM JP2B. Forty cycles of amplification were performed for each sample, using a Gene Amp[®] PCR system 9700 Thermocycler (Perkin Elmer Biosystems, Courtaboeuf, France) under the conditions reported by Theodorou *et al* (28). For each PCR, three controls were processed: one without DNA, a positive one (DNA from a Sezary T lymphoma) and a negative one (B-lineage lymphoma DNA). Two checks of denaturing gradient gel electrophoresis (DCode[™] Control Kit for DGGE/CDGE/TTGE, Bio-Rad) were also used, respectively a PCR amplification of a human wild-type genomic DNA fragment and the same fragment containing mutation of a G into A in exon 8 of the p53 (Ras) gene.

Separation of the amplicons was then performed in denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) or temporal temperature gel electrophoresis (TTGE). Briefly, for the samples of 21 patients DGGE was used as follows. A 6.5%

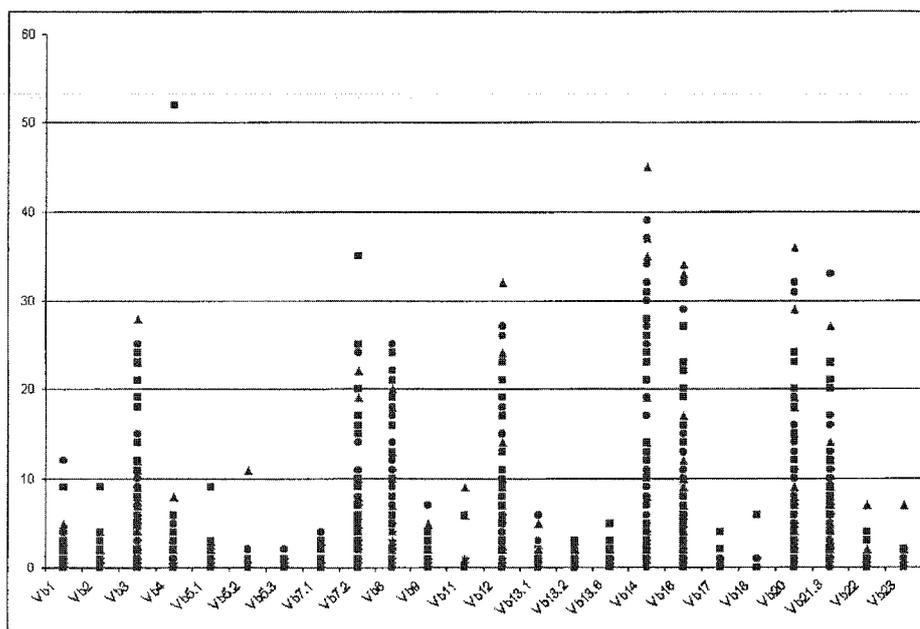


Figure 1. Exploration of TCR $\alpha\beta$ clonality. V β usage was assessed in flow cytometry. Data are expressed as percentage of expression of each V β respectively on cells from lymph nodes (\blacktriangle), clinically healthy lung tissue (\blacksquare) and tumoral lung tissue (\bullet).

polyacrylamide gel was prepared so as to contain a 10-60% linear denaturing gradient, using the Gradient Delivery System Model 475 (Bio-Rad, Hercules, CA). The 100% denaturation solution consisted in urea (Prolabo) at 425 g/l and 40% formamide (Prolabo) in 3.125% TAE (Tris Acetic EDTA buffer, Bio-Rad) supplemented with 0.065% Temed (Bio-Rad) and 0.525% ammonium persulfate (Merck). The gradient was formed by progressive dilution of the urea solution in H₂O. After polymerization, each gel was loaded with 20 μ l aliquots of amplification products supplemented with 3.2 μ l of bromophenol and xylene cyanol blue (0.25%) in 40% sucrose. Marcel™ (Appligene, Prolabo) molecular weight markers were loaded in parallel. Migration was then allowed to proceed at 56°C for 5-6 h in TAE, at a constant voltage of 110 V, using the DCode™ Universal Mutation System (Bio-Rad).

The samples of 23 patients were analyzed in TTGE, using a temperature gradient, and not a denaturing gradient, to separate the DNA. Briefly, a 6.5% polyacrylamide (Bio-Rad) gel was prepared in 1.25% TAE (Bio-Rad), supplemented with 0.065% Temed (Bio-Rad) and 0.525% ammonium persulfate (Merck). The polymerisation, loading, migration and staining were performed in the same conditions as for DGGE and with the same controls and molecular weight markers. The gradient was formed by a progressive decrease of the migration temperature from 61°C to 51°C over 4 h (2.5°C/h).

After completion of the migration, gels were silver-stained as follows. Gels were fixed by trichloroacetic acid (Prolabo) at 200 g/l, washed in a 50% ethanol, 10% acetic acid (Merck) solution then in a 10% ethanol, 5% acetic acid solution. The gels were then sensitized by 25% glutaraldehyde (Sigma) and washed again in the 50% ethanol 10% acetic acid solution and in H₂O. Next, staining was achieved with silver nitrate (Prolabo) at 5 g/l, followed by one wash in H₂O and revelation

by a 0.016% sodium carbonate (Prolabo) and formaldehyde (Sigma) at 750 μ l/l solution. Color development was stopped by an acetic acid 5% solution and the gels were preserved in a glycerol (Prolabo) 5%, acetic acid 50% solution. The gels were finally dried at hot temperature under vacuum in the Drygel Jr (Hoefer Scientific Instrument, Pharmacia, Uppsala, Sweden).

Bands were scanned using the Bio Rad GS-710 Calibrated Imaging Densitometer (Bio-Rad) and analyzed using the Quantity One Quantitation Software (Bio-Rad).

Statistics. Statistical analysis was applied to the identification of T-cell subsets, using the Student's t-test.

Results

Characterisation of T lymphocytes. In all cases, only CD3⁺ T-cells were eluted from the fresh lung tissue samples, and $\alpha\beta$ TCR studies are thus representative of the intratissue population.

Although CD4⁺ cells were as expected predominant in lymph nodes with a mean \pm SE CD4/CD8 ratio of 4 \pm 1.6, the proportions were significantly reversed in lung tissue. Indeed, CD8⁺ cells were the major population both in healthy lung tissue (mean \pm SE CD4/CD8 ratio 0.88 \pm 0.17, $p < 0.001$) as well as in tumor tissue (mean \pm SE CD4/CD8 ratio 0.58 \pm 0.07, $p < 0.001$).

V β TCR repertoire. Two-color flow cytometry allowed to appreciate usage of the 24 V β TCR segments for which MoAbs were available. Oligoclonality was considered each time a V β TCR segment was observed on $>5\%$ of the lymphocyte population studied. All specificities were detected at least once. Data are summarized in Fig. 1.

Table I. Concomitant presence of VB clones in individual patients.^a

	Lymph nodes tumors and healthy lung tissues (n=27)	Lymph nodes and tumors (n=27)	Lymph nodes and healthy lung tissues (n=27)	Tumors and healthy lung tissues (n=44)
VB3	7	13	7	17
VB7.2	5	8	5	14
VB8	9	13	9	21
VB12	8	13	8	16
VB14	12	16	13	19
VB16	7	15	7	18
VB20	9	15	9	20
VB21.3	8	13	8	20

^aData are expressed as the number of cases where the same VB specificity was observed as a clone in more than one of the three tissues tested.

Twenty-seven lymph node samples were large enough to allow lymphocyte elution. VB14 was the most frequently used specificity in these lymph nodes followed by VB12, VB16 and VB20, then VB3, VB8 and VB21.3. There was one clone in 3 cases, more than one in 22 cases, and no VB T-cell restriction was noted in 2 cases.

Among the 44 samples of apparently healthy lung tissue studied, VB14 again appeared to be the most frequently used segment, followed by VB3, VB8, VB16, VB20 and VB21.3. Some significant oligoclonality was also observed for VB7.2 and VB12. Again, there was one clone in 4 cases, more than one in 24 cases, and no VB T-cell restriction was noted in 16 cases.

In the 44 tumor samples studied, VB14 was again the most frequently used specificity, followed by VB16, VB20 and VB21.3, then VB3, VB8, VB12 and VB7.2. There was one clone in 4 cases, more than one in 33 cases, and no VB T-cell restriction was noted in 7 cases.

Interestingly, although a few (<5%) VB11⁺ and VB18⁺ cells were observed in some healthy tissues (VB11, 6/44; VB18, 5/44) and lymph nodes (VB11, 5/27; VB18, 5/27), these specificities were never observed on intra-tumoral lymphocytes.

In summary, oligoclonal populations could be observed in the three types of tissue samples studied. Moreover, several TCR β specificities were observed only in the tumor tissue of a given patient, with an apparent selectivity depending on the type of tumor, i.e., VB13.1 (10/23) and VB13.2 (7/23) in epidermoid carcinoma, VB5.2 (5/17) and VB7.2 (6/17) in adenocarcinoma or VB3, VB16 and VB20 (1/4) in large cell carcinoma, yet again without attaining the 5% threshold in all cases.

Overall, VB13.1 (23/44) and VB13.2 (14/44) appeared to be the most tumor-specific, while VB4 (11/44) and VB22 (11/44) were more frequently observed in apparently healthy lung tissue. VB14 was clearly predominant in the three types of tissues.

Table I shows the frequency of concomitant expression of the VB clones observed in the three types of tissues for each patient. This discloses that clones present in tumoral tissue

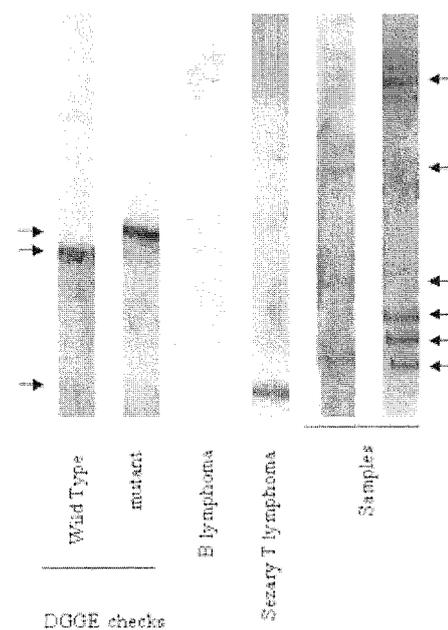


Figure 2. DGGE controls and typical examples of oligoclonality in lung tissue.

were also often present in the corresponding lymph node, while the correlation was much weaker with apparently healthy lung tissue.

TCR γ repertoire restriction. DGGE/TTGE allows to discriminate between DNA fragments of similar size differing by one base pair thus polyclonal populations of T-cells carrying different TCR γ rearrangements will yield a smear after silver staining of a DGGE/TTGE gel, while clones will yield the amplification of exactly similar fragments migrating in the same position and resulting in a band. Thus a monoclonal T-cell population will yield one band, while an oligoclonal population will yield several bands (Fig. 2).

All tissues from the 44 patients studied (44 lymph nodes, 44 healthy lung tissues and 44 tumoral tissues) were submitted

Table II. Exploration of TCR γ clonality.^a

Band no.	Healthy lung tissues (n=44)	Tumors (n=44)	Lymph nodes (n=44)
	Positive cases	Positive cases	Positive cases
1	9	12	8
2	14	16	9
3	13	13	11
4	10	12	13
5	8	10	11
6	10	9	8
7	10	13	9
8	11	13	13
9	2	7	5
10	12	15	13
11	7	13	9
12	9	13	13
13	6	16	16
14	11	10	11
15	10	12	13
16	9	8	8
17	4	5	8
18	9	8	7
19	18	15	19

^aV γ rearrangement was assessed by multiplex PCR followed by DGGE/TGGE. Clones were defined by the presence of a well defined band. Data are expressed as number of positive cases, i.e., displaying a given band in the different tissues tested.

to γ TCR multiplex amplification and DGGE/TTGE. This allowed to observe repertoire restriction and oligoclonality, characterized by 19 different size bands numbered from 1 to 19 in decreasing relative size. All controls were satisfactory, i.e., a single band in the sezary T lymphoma and no band for the B-cell lymphoma (Fig. 2).

Among the 132 tissue samples studied, 3 presented neither band nor smear, suggesting the absence of T-cells in the sample, and 23 presented a smear related to a polyclonal non-restricted T-cell population. This 26-sample group contained 10 of the tumor samples. Table II shows the number of cases displaying one or several bands in the different tissues.

In lymph nodes, band 19 was the most frequent. Bands 13, 4, 8, 10, 12 and 15 were also very frequent, slightly more than bands 3, 5 and 14, 2, 7 and 11. There was one band in 2 samples, and more than one in 19.

Band 19 also was the most frequent in healthy lung tissue, followed by bands 2, 3 and 10. Other bands were less represented. There was one band in 3 samples, and more than one in 29.

Conversely, in tumor tissue, bands 2, 13, 10 and 19 were the most frequent, followed by bands 3, 7, 8, 11 and 12. Several bands: 13 (8/23), 11 (4/23) and 10, 12, 15 (3/23) appeared to be specific for epidermoid carcinomas since they were present in tumoral tissue but absent from healthy tissue of the same patients. Similarly, bands 2 (7/17) and 7 (5/17) appeared to be specific for adenocarcinoma while large cells carcinoma displayed band 10 (2/4), absent from the corresponding healthy tissue. Tumor-specific bands apparently were bands 13 (16 cases) and 11 (13 cases). There were one band in 2 samples, and more than one in 35.

Tumor tissues presented the largest diversity of bands, followed by lymph nodes and healthy lung tissues. Band 19 was the most frequent, especially in the two latter tissues, while band 13 was most frequently observed in tumors and lymph nodes. Bands 6, 14, 16 and 18 were similarly represented in all tissues.

Comparison of the three samples, patient by patient, allowed to demonstrate the presence of the same band or bands in all tissues in 11 cases, and in both tumor and lymph node in 16 cases.

Comparison of both techniques. Tissue by tissue comparison of the presence or absence of V β and V γ restriction allowed to observe a similar degree of clonality in 85% of informative cases in tumors. Similar data were observed in 87.5% of the cases for healthy lung tissue and 91.3% for lymph nodes.

Discussion

In this study, two complementary approaches were used to investigate the potential oligoclonality of T-cell infiltration in non-small cell lung cancer in a large series of 132 tissue samples (healthy lung parenchyma, tumor and lymph node) from 44 patients. Repertoire restriction was observed in 34 of the 44 tumors tested, both within V β usage and at the TCR γ level. This suggests that in 10 cases, tumor escape was successful and no more tumor-specific T-cells remained in the tissue. In the other cases, such T-cells were present and some V β specificities even appeared to be selectively present in a given type of tumor, i.e., a V β clone and a V γ clone in epidermoid carcinomas, two V γ clones in adenocarcinomas. These data suggest both the recruitment of T-cells with a given specificity and their proliferation *in situ* in the tumoral microenvironment.

Some of the clones observed in tumoral tissue were also present in regional lymph nodes, suggesting the circulation of these T-cells between the tumor and the relevant lymphoid tissue.

Moreover, the CD4/CD8 ratio was found to be reversed compared to the normal situation in both tumor tissue and healthy lung tissue. This suggests that the cells recruited and/or activated in lung tissue are preferentially cytotoxic T-cells possibly involved in direct lysis of tumoral cells. This also indicates that anti-tumoral immune reactions already develop in clinically healthy lung tissue, as discussed below.

Indeed, some degree of oligoclonality was also noted within apparently healthy lung tissue. In 12 cases, these clones were different from those observed in the corresponding tumor tissue, while similar clones were observed in 16 cases. T-cell

specificities present in healthy lung tissue but absent from tumors could represent efficient tumor-specific cells, controlling tumor proliferation within still healthy tissue. Such cells might have apoptosed through tumor-escape mechanisms when they are no longer detectable in tumors (29,30). Conversely, T-cell specificities present in both normal and tumoral tissue may again indicate T-cell trafficking within the lung.

In the other hand, V β usage restriction suggests either the recruitment of cells with a tumor-specific TCR, or their local proliferation, or both. Such usage restriction has been reported in other tumor tissues than lung cancer (31-33). In patients with non-small cell lung carcinoma, Echchakir *et al* (34) have reported that clones VB12, VB16, VB17, VB20 and VB21, depending on the patients, were mostly expressed in tumors rather than in the peripheral blood. These specificities were also frequently observed in our series of three types of tissues.

However, here, VB14 appeared to be the most frequent specificity used, whatever the tissue considered. No such predominance of VB14 has been described in other cancers. It has been only reported in a few patients with autoimmune disorders (35). VB14 usage could therefore be specific of lung tissue in smokers.

VB13.1 appeared to be somewhat selectively used in the stroma reaction of epidermoid lung carcinomas, while it was absent from healthy lung tissue of the same patients. This might suggest that T-cells using this V β segment display specificity towards a tumor-specific antigen. VB13.1 oligoclonality was indeed reported in the literature in other types of tumors such as ovarian (36), breast (32) and pancreatic cancers (32,37).

The presence of TCR γ segments of the same size and sequence, yielding bands after multiplex PCR and DGGE/TTGE, is strongly suggestive of the presence of a clone derived from a common ancestor (38). This type of oligoclonality accounts for local proliferation. This technique was initially developed for the analysis of clonality in T-cell lymphoma (28,39). This sensitive tool has however seldom been applied to solid tumors such as non-small cell lung carcinomas, most reported studies having used Southern blotting (40-43).

Here, two clones (TCR γ bands 2 and 7) appeared to proliferate specifically in adenocarcinomas while band 13 seemed to be associated to epidermoid carcinomas.

Interestingly, some degree of oligoclonality was also noted within apparently healthy lung tissue. In 12 cases, these clones were different from those observed in the corresponding tumor tissue. T-cell specificities present in healthy lung tissue but absent from tumors could represent efficient tumor-specific cells, controlling tumor proliferation within still healthy tissue. Such cells might have apoptosed through tumor-escape mechanisms when they are no longer detectable in tumors.

The few studies reporting TCR repertoire analysis in lung cancer have mostly compared intra-tumoral cells with peripheral blood T-cells (34), but not with apparently healthy tissue or lymph nodes from the same surgical specimen as we did here. It is of interest to note the excellent correlation we observed between our two approaches of TCR usage restriction. This supports the fact that targeted T-cell

responses develop in lung cancer, first in apparently healthy lung tissue, then in the tumor itself, yet that in about 25% of the patients, tumor escape is associated with the absence of specific T-cells.

These data are encouraging for subsequent approaches aiming at identifying the antigens recognized by such clones. It is of interest that some specificities, expressed in lung tissue devoid of tumoral cells are absent from the tumor itself. This suggests that such cells are able to contain tumor development to some extent, yet are induced to apoptose once malignant cells achieve escape from the immune system.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the French Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et des Technologies to EA3443, from the French Ligue contre le Cancer and by the prix Wittner, both to Sophie Derniame.

References

1. Straten PT, Schrama D, Andersen MH and Becker JC: T-cell clonotypes in cancer. *J Translat Med* 2: 1-11, 2004.
2. Effros RB: Replicative senescence of CD8 T cells: potential effects on cancer immune surveillance and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 53: 925-933, 2004.
3. Rook AH, McGinnis KS, Richardson SK, *et al*: The use of cytokines, fusion proteins and antibodies to treat cutaneous T-cell lymphoma. *Dermatol Ther* 16: 331-336, 2003.
4. Gabrilovich D and Pisarev V: Tumor escape from immune response: mechanisms and targets of activity. *Curr Drug Targets* 4: 525-536, 2003.
5. Garcia-Lora A, Algarra I, Collado A and Garrido F: Tumor immunology, vaccination and escape strategies. *Eur J Immunogenet* 30: 177-183, 2003.
6. Trapani JA and Sutton VR: Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. *Curr Opin Immunol* 15: 533-543, 2003.
7. Terabe M, Park JM and Berzofsky JA: Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth. *Cancer Immunol Immunother* 53: 79-85, 2004.
8. Wojtowicz-Praga S: Reversal of tumor-induced immunosuppression by TGF- β inhibitors. *Invest New Drugs* 21: 21-32, 2003.
9. Ben-Hur H, Cohen O, Schneider D, *et al*: The role of lymphocytes and macrophages in human breast tumorigenesis: an immunohistochemical and morphometric study. *Anticancer Res* 22: 1231-1238, 2002.
10. Tomes L, Emberley E, Niu Y, *et al*: Necrosis and hypoxia in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 81: 61-69, 2003.
11. Tutton MG, George ML, Eccles SA, Burton S, Ian Swift R and Muti Abulafi A: Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumor expression in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 107: 541-550, 2003.
12. Yeung F and Chung LW: Molecular basis of co-targeting prostate tumor and stroma. *J Cell Biochem* 38 (Suppl): 65-72, 2002.
13. Zhang L, Yang N, Conejo-Garcia JR, *et al*: Expression of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 9: 264-272, 2003.
14. Ohno S, Tachibana M, Fujii T, Ueda S, Kubota H and Nagasue N: Role of stromal collagen in immunomodulation and prognosis of advanced gastric carcinoma. *Int J Cancer* 97: 770-774, 2002.
15. Ohtani H: Pathophysiologic significance of host reactions in human cancer tissue: desmoplasia and tumor immunity. *Tohoku J Exp Med* 187: 193-202, 1999.
16. Tsujihashi H, Matsuda H, Uejima S, Akiyama T and Kurita T: Immunoresponse of tissue infiltrating lymphocytes in bladder tumors. *J Urol* 141: 1467-1470, 1989.
17. Hernberg M, Turunen JP, Muhonen T and Pyrhonen S: Tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma receiving chemoimmunotherapy. *J Immunother* 20: 488-495, 1997.

18. Vignaud JM, Marie B, Picard E, *et al*: Tumor stroma formation in lung cancer. In: Clinical and Biological Basis of Lung Cancer Prevention. Martinet Y, Hirsch FR, Martinet N, Vignaud JM and Mulshine JL (eds.) Birkhäuser Verlag, Basel, pp75-93, 1998.
19. Kuo SH, Chang DB, Lee YC and Luh KT: Tumor-infiltrating lymphocytes in non-small cell lung cancer are activated T lymphocytes. *Respirology* 3: 55-59, 1998.
20. Viale M, Ferrini S, Serrano S, Serrano D, Ardizzoni A and Nicolin A: Peripheral blood and tumor infiltrating lymphocytes in non-small cell lung cancer: analysis at the population and clonal level. *Tumori* 76: 488-494, 1990.
21. Salgaller ML: The development of immunotherapies for non-small cell lung cancer. *Exp Opin Biol Ther* 2: 265-278, 2002.
22. Tsuda N, Nonaka Y, Shichijos S, *et al*: UDP-Gal: betaGlcNAc beta1, 3-galactosyltransferase, polypeptide 3 (GALT3) is a tumor antigen recognised by HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes from patients with brain tumor. *Br J Cancer* 87: 1006-1012, 2002.
23. Benlalam H, Labarriere N, Linard B, *et al*: Comprehensive analysis of the frequency of recognition of melanoma-associated antigen (MAA) by CD8 melanoma infiltrating lymphocytes (TIL): implications for immunotherapy. *Eur J Immunol* 31: 2007-2015, 2001.
24. Robbins PF, El-Gami M, Li YF, Zeng G, Dudley M and Rosenberg SA: Multiple HLA class II-restricted melanocyte differentiation antigens are recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a patient with melanoma. *J Immunol* 169: 6036-6047, 2002.
25. Saeterdal I, BJORHEIM J, LISLERUD K, *et al*: Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13255-13260, 2001.
26. Mami-Chouaib F, Echchakir H, Dorothee G, Vergnon I and Chouaib S: Antitumor cytotoxic T-lymphocyte response in human lung carcinoma: identification of a tumor-associated antigen. *Immunol Rev* 188: 114-121, 2002.
27. Kolopp-Sarda MN, Renoult E, Gregoire MJ, Bene MC, Kessler M and Faure GC: Increased usage of TCR V-beta8 in kidney transplant recipients with aberrant immune reconstitution and clinical complications. *Transplantation* 67: 1441-1446, 1999.
28. Theodorou I, Bigorgne C, Delfau MH, *et al*: VJ rearrangements of the TCR γ locus in peripheral T-cell lymphomas: analysis by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J Pathol* 178: 303-310, 1996.
29. Batra RK, Lin Y, Sharma S, Dohadwala M, Luo J, Pold M and Dubinett SM: Non-small cell lung cancer-derived soluble mediators enhance apoptosis in activated T lymphocytes through an I kappa B kinase-dependent mechanism. *Cancer Res* 63: 642-646, 2003.
30. Mitani K, Nishioka Y, Yamabe K, Ogawa H, Miki T, Yanagawa H and Sone S: Soluble Fas in malignant pleural effusion and its expression in lung cancer cells. *Cancer Sci* 94: 302-307, 2003.
31. Baier PK, Wimmenauer S, Hirsch T, von Specht BU, von Kleist S, Keller H and Farthmann EH: Analysis of the T cell receptor variability of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinomas. *Tumour Biol* 19: 205-212, 1998.
32. Kirii Y, Magarian-Blander J, Alter MD, Kotera Y and Finn OJ: Functional and molecular analysis of T cell receptors used by pancreatic-and breast tumor-(mucin-) specific cytotoxic T cells. *J Immunother* 21: 188-197, 1998.
33. Halapi E: Oligoclonal T cells in human cancer. *Med Oncol* 15: 203-211, 1998.
34. Echchakir H, Asselin-Paturel C, Dorothee G, Grunnenwal, D, Chouaib S and Mami-Chouaib F: Analysis of T-cell-receptor β -chain-gene usage in peripheral-blood and tumor-infiltrating lymphocytes from human non-small cell lung carcinomas. *Int J Cancer* 81: 205-213, 1999.
35. Yamamoto T, Katayama I and Nishioka K: Analysis of T cell receptor V beta repertoires of annular erythema associated with Sjogren's syndrome. *Eur J Dermatol* 8: 248-251, 1998.
36. Peoples GE, Davey MP, Goedegebuure PS, Schoof DD and Eberlein TJ: T cell receptor V beta 2 and V beta 6 mediate tumor-specific cytotoxicity by tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *J Immunol* 151: 5472-5480, 1993.
37. Mukherjee P, Ginardi AR, Tinder TL, Sterner CJ and Gendler SJ: MUC1-specific cytotoxic T lymphocytes eradicate tumors when adoptively transferred *in vivo*. *Clin Cancer Res* 7: 848s-855s, 2001.
38. Delfau-Larue MH, Dalac S, Lepage E, Petrella T, Wechsler J, Farcet JP and Bagot M: Prognostic significance of a polymerase chain reaction-detectable dominant T-lymphocyte clone in cutaneous lesions of patients with mycosis fungoides. *Blood* 92: 3376-3380, 1998.
39. Nagasawa T, Nakatsuka S, Miwa H, Kanno H, Itami S, Yoshikawa K and Aozasa K: Analysis of T cell antigen receptor gamma chain gene rearrangement by polymerase chain reaction in combination with denaturing gradient gel electrophoresis in the differential diagnosis of cutaneous T-lymphoproliferative diseases. *J Dermatol* 27: 238-243, 2000.
40. Yoshino I, Yano T, Yoshikai Y, Murata M, Sugimachi K, Kimura G and Nomoto K: Oligoclonal T lymphocytes infiltrating human lung cancer tissues. *Int J Cancer* 47: 654-658, 1991.
41. Nitta T, Sato K, Okumura K and Steinman L: An analysis of T-cell receptor variable-region genes in tumor-infiltrating lymphocytes within malignant tumors. *Int J Cancer* 49: 545-550, 1991.
42. Mathoulin MP, Xerri L, Jacquemier J, Adelaide J, Parc P and Hassoun J: Unrestricted T-cell receptor V-region gene repertoire in tumor-infiltrating lymphocytes from human breast carcinomas. *Cancer* 72: 506-510, 1993.
43. Imahayashi S, So T, Sugaya M, *et al*: Establishment of an immortalized T-cell line from lung cancer tissue: phenotypic and functional analyses. *Int J Clin Oncol* 7: 38-44, 2002.

RESUME

Le cancer bronchique occupe le premier rang des cancers les plus fréquents dans le monde et le taux de survie à cinq ans est faible, notamment en raison d'un diagnostic souvent tardif. Le tabagisme, en augmentation notamment chez les femmes, est de loin la principale cause de cette pathologie. Le développement des cellules tumorales provoque une réaction stromale tissulaire contenant des cellules inflammatoires dont la majorité sont des lymphocytes infiltrant la tumeur.

Dans cette étude, quatre approches complémentaires ont été utilisées afin d'analyser les caractéristiques des lymphocytes T, notamment la recherche d'une clonalité potentielle, dans la stroma réaction des cancers bronchiques non-à petites cellules, et d'étudier la modulation tumeur-dépendante du système immunitaire : l'immunophénotypage du répertoire V β du TCR par cytométrie de flux et l'électrophorèse en gel de gradient dénaturant (DGGE/TTGE) séparant les différents segments VJ du gène γ du TCR amplifiés par PCR, l'exploration phénotypique des tissus sains, tumoraux et ganglionnaires en immunofluorescence sur coupes à la congélation, et l'amplification par RT-PCR de l'ARN de diverses cytokines.

Les résultats obtenus montrent qu'il existe une oligoclonalité des lymphocytes T dans les tissus sains, tumoraux et ganglionnaires. Un clone V β 13.1 semble spécifique des carcinomes épidermoïdes en ce sens qu'il est absent des tissus sains des mêmes patients alors que deux clones gamma semblent spécifiques des adénocarcinomes et un des carcinomes épidermoïdes. De plus, la stroma réaction des cancers bronchiques non-à petites cellules est importante mais variable, l'expression de CD3/TCR est significativement moins intense dans les tumeurs par comparaison aux tissus sains et aux ganglions. De même, les molécules HLA-DR et HLA-DQ ainsi que la β 2 microglobuline sont fortement exprimées par les pneumocytes sains alors que les cellules tumorales expriment peu ces molécules. Diverses cytokines ayant des effets antagonistes sont produites dans le tissu tumoral en particulier le TGF β et l'IL-10 qui favorisent la croissance tumorale et le TNF α et l'IFN γ qui ont un effet de potentialisation de la réponse immunitaire anti-tumorale.

En conclusion, les clones détectés dans les tissus sains pourraient être spécifiques de lésions très précoces pré-tumorales liées au tabac. Il semble exister des clones spécifiques des tumeurs et des types tumoraux. Cependant, au stade avancé de la cancérogenèse bronchique que représentent ces tumeurs accessibles à la chirurgie, la surveillance immunitaire a été mise en échec par un certain nombre de mécanismes et en particulier la diminution d'expression des molécules impliquées dans la synapse immunologique (CD3/TCR et peptide/CMH) ainsi que la sécrétion de diverses cytokines ayant des effets antagonistes.

MOTS CLES : cancer, cytokines, échappement, immunosuppression, oligoclonalité, poumon, TCR

RESUME

Lung cancer is the most frequent type of cancer in the world, with an overall survival of about 5 years, mostly because of an often delayed diagnosis. Smoking, which is especially increasing in females, is clearly the major cause of this pathology. The proliferation of tumor cells induces an inflammatory stromal reaction comprising numerous tumor-infiltrating lymphocytes.

In this study, four complementary approaches have been used to examine the characteristics, notably clonality, of T cells from the stroma reaction of non small cell lung cancer and study the tumor-dependent modulation of the immune system : TCR V β repertoire usage in flow cytometry, TCR γ gene clonal rearrangements in denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE/TTGE) separating PCR-amplified VJ segments, tumor and healthy lung tissue infiltration as well as lymph nodes characteristics in immunohistology and cytokine production by RNA RT-PCR.

The results obtained have demonstrated the oligoclonality of T-cells in the three types of tissues tested. A V β 13.1 clone appeared to be specific of epidermoid carcinoma, since it was not observed in healthy lung tissue from the same patients. Similarly, two TCR γ clones appeared to be restricted to adenocarcinoma and one to epidermoid carcinoma. Moreover, the stroma reaction of non small lung cancer appeared to be important although variable, and the expression of the CD3/TCR complex was clearly down regulated in tumors compared to healthy tissue or lymph nodes. Similarly, HLA-DR, HLA-DQ and β 2 microglobuline, strongly expressed on healthy pneumocytes were nearly absent from tumor cells. Several cytokines with antagonistic effects were detected as produced within tumoral tissue, especially TGF β and IL-10, which favour tumor growth and TNF α and IFN γ which conversely potentialize the anti-tumoral immune response.

In conclusion, the clones identified in healthy lung tissue could be specific of early pre-tumoral lesions induced by tobacco smoke, and some of the clones appear to be tumor-specific. However, at the advanced stage of carcinogenesis that these surgically-removed tumors represent, the immune system has been defeated by several mechanisms, including a decrease of the expression of partners of the immunological synapse (CD3/TCR and peptide/MHC) and the production of antagonistic cytokines.

KEY WORDS : cancer, cytokines, immune escape, immunosuppression, oligoclonality, lung, TCR