

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE 1
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE - SANTE

Présentée par

Dhafer MRIZAK

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 1

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Spécialité : Immunologie

EVALUATION D'UNE STRATEGIE D'IMMUNOTHERAPIE PEPTIDIQUE ANTI-VIRALE DANS LE
CARCINOME DU NASOPHARYNX ASSOCIE AU VIRUS D'EPSTEIN BARR :
DE L'EXPERIMENTATION *IN VITRO* A LA PROPOSITION DE NOUVEAUX ESSAIS THERAPEUTIQUES

Soutenue le Vendredi 13 Décembre 2013

Devant le Jury composé de

Pr Michel SALZET	Président du Jury
Dr Evelyne MANET	Rapporteur
Dr Nathalie CHAPUT	Rapporteur
Dr Clotilde THERY	Examineur
Pr Néjib MRIZAK	Examineur
Dr Nadira DELHEM	Directeur de Thèse
Pr Saâd SAGUEM	Co-Directeur de thèse

Laboratoire d'Immunorégulation des Cancers Viro-Induits
CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille

« *Pour bâtir haut, il faut creuser profond* »

« *La mère des sciences est labeur* »

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

Monsieur le Professeur Michel Salzet,

Je suis très honoré que vous ayez accepté de présider ce jury. Recevez ici l'expression de mes plus vifs remerciements et de mon profond respect.

Madame le Docteur Evelyne Manet,

Vous avez accepté avec enthousiasme d'être le rapporteur de ce travail. Je vous remercie vivement de l'intérêt porté à ma thèse, et vous prie de trouver ici la marque de ma reconnaissance.

Madame le Docteur Nathalie Chaput,

Je vous suis très reconnaissant de l'intérêt que vous avez donné à ce travail de thèse en acceptant d'emblé d'en être rapporteur. Que cette thèse soit le témoignage de ma très sincère reconnaissance.

Madame le Docteur Clotilde Théry,

Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté d'être examinateur de mon travail de thèse. Que ce manuscrit atteste de la profonde estime dans laquelle je vous place.

Monsieur le Professeur Néjib Mrizak,

Je vous remercie vivement d'avoir accepté de devenir d'être examinateur de mon travail de thèse. Que cette thèse soit une preuve de ma sincère reconnaissance.

Madame le Docteur Nadira Delhem,

Je vous remercie très sincèrement de m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de votre équipe de recherche. Je vous remercie pour la bienveillance avec laquelle vous avez toujours su juger mon travail. Merci mille fois de votre confiance à mon égard, de votre bienveillance toute particulière, et de l'enthousiasme tant humain que scientifique qui m'ont porté tout au long de ces années.

Monsieur le Professeur Saâd Saguem,

Je vous remercie de m'offrir l'honneur de siéger dans mon jury de thèse. Merci de votre confiance, de votre bienveillance, et de l'apport tant humain que scientifique qui m'ont porté tout au long de ces années.

Aux membres du laboratoire,

Très chère Nadira, je tenais en tout premier lieu à te remercier de nouveau. Les mots seraient insuffisants pour te décrire à quel point je te suis reconnaissant, pour tout ce que tu as fais pour moi, et ça a commencé, avant mon arrivée au laboratoire, au moment du montage du dossier de la bourse de thèse auprès du CNRS. Tu m'as guidé tout au long de la thèse et tu as su m'offrir ton temps, ton expérience, ton aide, ton amitié, ta protection. Ton envie, ta persévérance, ainsi que ton assurance ont été les moteurs les plus importants durant ces années de travail. Ta confiance en moi, ta capacité à rassurer et la force avec laquelle tu avance sans relâche m'ont porté vers l'avant et m'ont permis de persévérer pendant les moments les plus difficiles. Ton soutien pour moi a été sans faille et de tout instant et je t'en remercie mille fois. Merci pour ta générosité, pour ta présence, tes encouragements, et je souhaite de tout cœur garder cette amitié solide. Je voudrais également exprimer la profonde admiration que j'ai pour toi ainsi que ma fierté d'avoir accompli ma thèse sous ta direction. Je voudrais enfin te remercier pour ton cœur immense et te demander de rester comme tu es. Cette thèse n'aurait jamais eu lieu sans toi.

Très cher Olivier, merci pour tout, les mots manquent pour décrire les moments qu'on a passés ensemble. Tu m'as pris en charge dès mon arrivée, tu as su m'aider à m'intégrer au laboratoire et tu m'as formé à l'immunologie, domaine dans lequel j'étais que débutant. Tu m'as toujours accompagné, su répondre à mes questions et être mon confident. J'ai appris de ta façon de faire et ça m'a beaucoup aidé à progresser. J'ai vécu avec toi cette expérience si riche humainement et scientifiquement qui est la thèse. Je te remercie mille fois pour l'amitié que tu as su m'offrir et que j'espère de tout cœur la garder pour toujours. Je n'oublierai certainement jamais ces années passées à tes côtés au bureau, ces années qui ont passées si vite... Je te suis reconnaissant pour toutes les belles choses que tu m'as apportées, pour ta générosité à mon égard ainsi que ta bonne humeur. Merci infiniment. Amitié pour la vie.

Cher Pr Yvan de Launoit, Yvan, je te remercie sincèrement de m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de ton laboratoire de recherche et de jouir ainsi d'une atmosphère de recherche de très grande qualité.. Tu as toujours été là pour me conseiller et orienter dans l'avancement de la thèse. Nos échanges au cours de nos réunions et tes points d'informations

sur les côtés plus « politique » et administratif de la science, ont été très importants pour moi. Je voudrais ici te réitérer tout mon respect et ma considération.

Nathalie, ton départ pour rejoindre ton nouveau poste a laissé un vide incontestable. J'ai un profond respect pour la passion et la rigueur que tu mets dans chacune des choses que tu entreprends. Merci pour ta très grande disponibilité et tes nombreux conseils. Merci aussi pour ta bonne humeur de chaque instant... amitié.

Véronique, même si ton temps était occupé ailleurs dans tes fonctions d'administration et d'animation scientifique au sein du Cancéropole Nord-Ouest. Tu as toujours eu un œil avisé sur mon projet. Enfin, comment oublier le gouter de Noël au coin du feu. Merci.

Emmanuel (Bolo), même si ton temps était occupé en grande partie par tes activités de chirurgien transplantateur, tu as souvent su te libérer pour participer à nos réunions et discussions scientifiques. Merci de m'avoir guidé dans ma présentation au congrès de l'AFEF. Bonne continuation et bonne chance pour tes projets futurs.

Laurissa, dans cette grande famille maintenant, tu es arrivé au laboratoire et tu as su t'intégrer rapidement. Merci pour ta disponibilité, ta générosité et ton grand cœur. Tu m'as toujours surpris par ta spontanéité, reste comme tu es et garde cette innocence en toi. Merci pour tout et bonne continuation pour ta thèse.

Gautier, je voudrais te remercier pour tes conseils pertinents et ton aide précieuse. Ton expertise dans le domaine d'EBV m'a été très utile. Je te souhaite une bonne continuation dans ton postdoc et une bonne chance pour la suite de ta carrière.

Rami tu es le dernier arrivé dans le monde des Treg. Je suis ravi de te compter parmi mes collègues. J'admire chez toi la rapidité avec laquelle tu t'es adapté à ta nouvelle vie Lilloise. Je ne peux rien te souhaiter de mieux qu'une belle thèse.

Céline, t'étais là quand je suis arrivé au laboratoire, tu m'as bien accueilli et conseillé. Je te remercie de m'avoir également aidé dans mes démarches administratives. Aujourd'hui t'es occupée dans tes nouvelles fonctions d'administration et d'animation scientifique, des fonctions que tu as toujours souhaitées exercer. Je te souhaite une bonne continuation et encore merci.

Pedro, tu es arrivé d'Espagne pour un stage Erasmus et tu as beaucoup contribué à l'avancement du volé immuno thérapie. Je te remercie pour ton sérieux et ton aide.

Madjda, t'es parmi nous pour ton master recherche et pourquoi pas plus? Les débuts sont souvent difficiles, mais je suis certain que tu sauras évoluer rapidement pour atteindre ton objectif qui est de réaliser une thèse. Je te souhaite bonne chance et bonne continuation.

Je remercie notre cher collaborateur, le Dr **Pierre Busson**, pour tout ce qu'il a apporté à ce travail, pour ses conseils si précieux, sa disponibilité et son efficacité. Sa contribution au travail a été d'une très haute importance. Je vous exprime ici ma plus haute considération.

A tous les membres du laboratoire du Dr Busson à l'IGR, notamment **Clément** avec qui j'ai eu l'occasion d'échanger et obtenir de précieux conseils.

Je remercie également **Han**, qui m'a été d'une très grande aide. Je te remercie pour ta très grande disponibilité et ta grande générosité. Je vous remercie énormément et je vous souhaite un excellent départ à la retraite.

Je voudrais remercier nos chers collaborateurs parisiens ; **Yvon, Filo, Lynda, Samia et Khaldoun** ; pour leur accueil toujours chaleureux et enjoués, leurs précieux conseils scientifiques.

A mes collègues anciens-doctorants aujourd'hui Docteurs, j'espère n'en oublier personne, **Tian, Guillaume, Emeric, Alioune, Nicolas, Jonathan, Audrey, Laurent, Gaylord**... Je voudrais vous remercier pour votre disponibilité, vos conseils et les discussions intéressantes. Je vous souhaite un excellent avenir avec beaucoup de bonnes choses.

A mes collègues doctorants, j'espère n'en oublier personne, **Rémi, Marion, Joe, Carine, Sarah, Loïc, Racha, Claire**... Merci pour votre disponibilité et votre bonne volonté.

Je n'oublie pas non plus de remercier l'ensemble des **stagiaires** qui sont passés au laboratoire, tous les stagiaires en **BTS** Biotechnologies, en particulier **Romain, Niels, Wandrille, Benoît**... Merci pour votre sérieux et votre contribution à ce travail.

Je tiens également à remercier l'ensemble de l'équipe administrative de l'IBL, et en particulier **Nicole** et **Marie-Christine** toujours disponibles et d'une grande aide au quotidien. Merci mille fois.

A ma chère famille, A mes chers amis,

A mes très chers parents, mon père Néli, ma mère Houa, que puis-je dire pour vous remercier? Les mots seraient insuffisants pour vous remercier. Vous avez toujours été à mes côtés pour me soutenir dans toutes les étapes, encore plus depuis que je suis en France. Malgré la distance vous avez su me protéger, vous avez toujours tout fait pour mon bien-être. Je voudrais vous dire tout simplement que je vous aime plus que tout et que je vous dédie cette thèse.

A ma très chère épouse Eya, tu as été à mes côtés durant toutes les étapes de la thèse. Je ne pourrais jamais te remercier assez pour ta patience, ton soutien et ton amour. Tu as toujours pris soin de moi pendant toute cette période et pendant les moments les plus difficiles. Je te dédie cette thèse et je t'exprime ici tout mon amour.

A ma sœur Chaima, A mon frère Jihed, je voudrais vous remercier de votre amour et de votre soutien inconditionnel. Je vous dédie cette thèse et je vous souhaite le meilleur ainsi qu'une belle réussite future. Votre tour approche mes futurs docteurs et j'en suis extrêmement fier.

A ma grand-mère Khaddouja, tu nous as quittés sans que je puisse te dire au revoir. Tu me manques énormément ma chère. Paix à ton âme.

A ma grand-mère Aroussia, je te dédie cette thèse chère grand-mère et je te souhaite de tout cœur une longue vie à nos côtés.

A mon oncle Façal, A sa femme Raoudha et à toute sa petite famille. Je voudrais vous remercier de tout ce que vous avez fait pour moi. Je vous en serai reconnaissant pour la vie.

A tonton Habib, sa femme Radhia, son fils Issam et sa femme Ingrid ainsi que Yassine et Anis, je ne vous remercierais jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi, je vous en suis très reconnaissant. Vous êtes aujourd'hui ma deuxième famille et j'en suis fier.

A tous mes chers cousins et cousines, mes chers oncles et tantes, je vous dédie également cette thèse.

A mes chers amis Tarek, Zied, Néjib, Majdi, Rochdi, Djo, Hédi, Akram, Fourti, Noman... Je sais que j'ai oublié beaucoup parmi vous, Je vous remercie tous et je vous dédie cette thèse.

TABLE DES MATIERES

Table des Matières

I. VIRUS D'EPSTEIN BARR ET PATHOLOGIES ASSOCIEES	8
A. GENERALITES	9
1. HISTORIQUE	9
2. TAXONOMIE	10
3. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES	11
4. STRUCTURE DU VIRION	11
5. ORGANISATION DU GENOME VIRAL	12
6. CYCLE LYTIQUE	15
B. LATENCES VIRALES	17
1. DIFFERENTS PROGRAMMES DE LATENCE	17
2. DESCRIPTION DES DIFFERENTS PRODUITS DE GENES DE LA LATENCE II	20
a) EBNA1	20
b) LMP1	22
c) LMP2	23
d) ARN viraux EBER et BART	25
C. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION PAR EBV	27
1. CIBLES CELLULAIRES CLASSIQUES DU VIRUS	27
a) Lymphocytes B	27
b) Cellules épithéliales	28
2. ETAPES CELLULAIRES DE L'INFECTION	29
3. ENTREE DE EBV DANS L'HOTE	31
4. PATHOLOGIES ASSOCIEES A EBV	34
II. REPONSE IMMUNITAIRE DIRIGEE CONTRE EBV	36
A. REPONSE HUMORALE	36
1. REPONSE HUMORALE A L'INFECTION PRIMAIRE	36
2. REPONSE HUMORALE DURANT LA PHASE DE LATENCE	38
B. REPONSE IMMUNE CELLULAIRE	39
1. REPONSE IMMUNE CELLULAIRE INNEE	39
2. REPONSE IMMUNE CELLULAIRE ADAPTATIVE	40
a) Réponse cellulaire T-CD8+	40
b) Réponse cellulaire T-CD4+	44
III. MECANISMES D'ECHAPPEMENT AU SYSTEME IMMUNITAIRE DANS LES PATHOLOGIES ASSOCIEES A EBV	48
A. MECANISMES D'ECHAPPEMENT D'EBV AU SYSTEME IMMUNITAIRE	48
1. STRATEGIES MOLECULAIRES IMPLIQUANT LES PROTEINES DE LATENCES	48
2. STRATEGIES MOLECULAIRES IMPLIQUANT LES PROTEINES DU CYCLE LYTIQUE	52
B. MECANISMES D'ECHAPPEMENT DES CELLULES TUMORALES AU SYSTEME IMMUNITAIRE	54
1. ALTERATION DE L'EXPRESSION DES MOLECULES DU CMH	55
2. VARIATION OU PERTE D'EXPRESSION DES ANTIGENES DE SURFACE	56
3. INHIBITION DE L'APOPTOSE INDUITE PAR LES LYMPHOCYTES T SPECIFIQUES	57
a) Inhibition directe	58
b) Inhibition indirecte	60

4.	DEFAULT D'ACTIVATION LYMPHOCYTAIRE	62
5.	PRODUCTION DE MOLECULES IMMUNOSUPPRESSIVES	63
6.	RECRUTEMENT ET ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T REGULATEURS	66
7.	SECRETION DES EXOSOMES	66
C.	LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS DANS L'ÉCHAPPEMENT A LA REPONSE IMMUNITAIRE	67
1.	LYMPHOCYTES T REGULATEURS: GENERALITES	67
2.	DEFINITION DES LYMPHOCYTES T CD4+CD25+	67
a)	Caractérisation phénotypique	68
b)	Mécanismes de suppression	71
3.	ACTIVITE CYTOTOXIQUE DES T REGULATEURS	75
4.	T REGULATEURS ET ECHAPPEMENT TUMORAL AU SYSTEME IMMUNITAIRE	76
5.	THERAPIES CIBLANT LES T REGULATEURS DANS LES CANCERS	79
6.	T REGULATEURS ET INFECTION PAR EBV	81
D.	EXOSOMES ET ECHAPPEMENT AU SYSTEME IMMUNITAIRE	84
1.	EXOSOMES: GENERALITES	84
a)	Découverte	84
b)	Biogenèse	85
2.	CONTENU PROTEIQUE DES EXOSOMES	88
3.	ROLE DES EXOSOMES	90
a)	Rôle dans la réponse immune	90
b)	Rôle en thérapie anti-tumorale et vaccination	92
c)	Rôle anti-inflammatoire	93
d)	Rôle dans la pathogenèse virale	93
e)	Rôle des exosomes tumoraux	94
IV.	<u>GALECTINES</u>	<u>98</u>
A.	STRUCTURE ET SPECIFICITE	98
B.	LOCALISATION CELLULAIRE ET DISTRIBUTION TISSULAIRE DES GALECTINES	100
C.	FONCTIONS DES GALECTINES	102
D.	GALECTINE-9	105
V.	<u>CARCINOME DU NASOPHARYNX</u>	<u>107</u>
A.	DESCRIPTION	107
B.	EPIDEMIOLOGIE	108
C.	ETIOLOGIE	109
1.	FACTEURS ETIOLOGIQUES NON VIRAUX	110
a)	Facteurs génétiques	110
b)	Facteurs environnementaux	111
2.	FACTEUR ETIOLOGIQUE VIRAL	111
D.	MICROENVIRONNEMENT TUMORAL	114
E.	TRAITEMENTS	115
1.	TRAITEMENTS CONVENTIONNELS	115
2.	STRATEGIES D'IMMUNOTHERAPIE	115
VI.	<u>OBJECTIFS DE LA THESE</u>	<u>120</u>
VII.	<u>RESULTATS</u>	<u>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</u>

ARTICLE 1	122
ARTICLE 2	127
ARTICLE 3	131

VIII. DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

X. ANNEXES	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

ARTICLE 4	192
ARTICLE 5	195
ARTICLE 6	197
ARTICLE 7	200
BREVET D'INVENTION	202
LISTE DES PUBLICATIONS	203
LISTE DES COMMUNICATIONS	204

XI. NOUVEAU CHAPITRE DE LA THESE	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

Liste des Illustrations

Figure 1: Particules virales trouvées dans les lignées de LB en 1964.	9
Figure 2: Organisation et évolution de la famille des Herpèsvirus humains.	10
Figure 3 : Structure du virus d'Epstein-Barr. Schéma et photographie de microscopie électronique.	12
Figure 4: Organisation du génome d'EBV.	13
Figure 5: Cycle lytique, assemblage et sortie du virion.	16
Figure 6: Profil d'expression des gènes viraux au cours des différents types de latence..	18
Figure 7 : Effets d'EBNA1 sur la survie cellulaire.	21
Figure 8: La protéine LMP1 d'EBV.....	22
Figure 9 : Les protéines LMP2 d'EBV.....	23
Figure 10 : Photographie de LCL en culture.....	27
Figure 11 : Modèle d'infection par EBV.	28
Figure 12: Etapes cellulaires de l'infection par l'EBV.....	30
Figure 13: Modèle de l'infection <i>in vivo</i> par EBV.	32
Figure 14: L'infection par EBV mime les étapes de la maturation physiologique des lymphocytes B <i>in vivo</i>	33
Figure 15: Paramètres de l'équilibre EBV-hôte durant les différentes phases de l'infection	38
Figure 16: Changements temporels de la réponse cellulaire au cours de l'infection virale....	43
Figure 17: Modèle de différenciation des lymphocytes T CD4 mémoires en fonction du type d'antigène.....	45
Figure 18 : Représentation schématique de l'immunodominance relative des protéines d'EBV.	47
Figure 19 : Stratégies d'échappement développées par les tumeurs.	54
Figure 20 : Mécanismes d'altération de l'expression des molécules du CMH I.	55

Figure 21: Concept d'immunodominance..	57
Figure 22 : Voie de signalisation de Fas et ses inhibitions..	58
Figure 23 : La mort des cellules T induite par FasL.	61
Figure 24 : Inhibition de la réponse anti-tumorale par le TGF- β	64
Figure 25 : Mécanismes de régulation de la réponse immune médiée par les Treg.....	71
Figure 26 : Cytotoxicité des T régulateurs.	75
Figure 27 : Origine des cellules T régulatrices dans le microenvironnement tumoral.....	77
Figure 28 : Mécanismes suppressifs des Treg dans le microenvironnement tumoral.	79
Figure 29: Le rôle de la machinerie ESCRT dans la biogenèse des exosomes..	86
Figure 30 : Représentation schématique de la libération des exosomes dans le milieu extracellulaire.....	87
Figure 31 : Rôles de Rab27 dans le trafic vésiculaire.....	88
Figure 32 : Distribution du contenu protéique des exosomes..	89
Figure 33: Fonctions immunitaires des exosomes tumoraux.....	97
Figure 34 : Exemples d'actions biologiques des galectines.	104
Figure 35 : Les isoformes de la galectine-9.....	106
Figure 36 : Incidence des carcinomes nasopharyngés dans le monde chez les individus de sexe masculin .	109
Figure 37 : Hypothèse d'action des exosomes et des peptides EBV sur les cellules immunitaires tumorales et périphériques dans le CNP.	Erreur ! Signet non défini.

Liste des Tableaux

Tableau I. Récapitulatif des différentes latences virales et pathologies associées.....	19
Tableau II. Récapitulatif des protéines virales de la latence II et de leurs fonctions.	26
Tableau III. Pathologies associées à l'EBV	35
Tableau IV. Alignement de séquence peptidiques de la région immunorégulatrice prototype des rétrovirus avec celle d'EBV.	51
Tableau V. Liste des 25 protéines les plus fréquemment identifiées dans les exosomes ainsi que leur classement fonctionnel.....	90
Tableau VI. Structure et classification des galectines humaines.....	98
Tableau VII. Répartition tissulaire des galectines.....	102
Tableau VIII. Distribution des types histologiques du CNP en Amérique du nord et au sud de la Chine.....	108
Tableau IX. Historique des essais cliniques d'immunothérapie contre les CNP.	117

Abbreviations

ACH	Acetylcholinesterase	IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	IDO	Indolamine 2,3-DiOxygenase
ADP	Adénosine Di Phosphate	IEA	Immediate Early Antigen
AICD	Apoptosis Induced Cell Death	IFN	InterFeroN
ARN	Acide RiboNucléique	Ig	Immunoglobulin
ATP	Adénosine Tri Phosphate	IL	InterLeukine
BARF	Biologically Appropriate Raw Food	IR	Internal Repeat
Bcl2	B Cell Lymphoma 2	IPEX	Immune dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy-X-linked syndrom
BCR	B Cell Receptor	JNK	c-Jun NH2-terminal Kinase
CCR	Chemokine Receptor	KSHV	Kaposi's Sarcoma associated Herpes Virus
CD	Cluster of Differentiation	kDa	kilo Dalton
CDs	Cellules Dendritiques	LAG-3	Lymphocyte-Activation <i>Gene</i> 3
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques	LB	Lymphome de Burkitt
CCC	Covalently Closed Circle	LCL	Lignées Cellulaires Lymphoblastoïdes
CEA	CarcinoEmbryonic Antigen	LCMV	Lymphocytic Choriomeningitis Virus
GCR11	Glucocorticoid Receptor type II	LFA	Leucocyte Function Associated molecule
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité	LTNP	Long-Term Non-Progressors
CMV	CytoMégaloVirus	LT	Lymphocyte T
CNP	Carcinome du Nasopharynx	MART-1	Melanoma Antigen Recognized by T- celles-1
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène	MEC	Matrice Extra-Cellulaire
CRD	Carbohydrate-Recognition Domain	MI	Mononucléose Infectieuse
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte	MVB	Multi Vesicular Body
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4	NO	Nitric Oxyde
DcR	Decoy Receptor	NF-kB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
DED	Death Effector Domain	NK	Natural Killer
DISC	Death-Inducing Signaling Complex	OMS	Organisation Mondiale de la Santé
EA	Early Antigen	PGE2	ProstaGlandine E2
EBV	Epstein Barr Virus	PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
EBER	EBV Encoded RNA	PCR	Polymerase Chain Reaction
EBNA	EBV Nuclear Antigen	PI3K	Phospholinoside 3-Kinase
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	PKR	Protein Kinase double stranded RNA-activated
FoxP3	Forkhead Box P3	ROS	Reactive Oxygen Species
GA	Glycine Alanine repeats	TAA	Tumor Associated Antigens
GITR	Glucocorticoid-Induced TNFR-related protein	TCR	T Cell Receptor
GST	Glutathion-S-Transferase	TGF	Tumor Growth Factor
GPI	GlycoPhosphatIdylinositol	Tim	T cell Immunoglobulin Mucin domain
HBLV	Human B-Lymphotropic Virus	TNF	Tumor Necrosis Factor
HCMV	Human Cyto Megalo Virus	TNF-R	Tumor Necrosis Factor Receptor
HLA	Human Leukocyte Antigen	Treg	Lymphocyte T régulateur naturel CD4+CD25+
HHV	Human Herpes Virus	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
HSP	Heat Shock Protein	XLAAD	X-Linked Autoimmunity-Allergic Dysregulation
HSV	Herpes Simplex Virus		
ICAM	Inter-Cellular Adhesion Molecule		

INTRODUCTION

I. Virus d'Epstein Barr et pathologies associées

A. Généralités

1. Historique

En 1958, Denis Burkitt (1911-1993), chirurgien anglais, décrit une tumeur du maxillaire supérieur chez les enfants africains en rapport avec une prolifération de lymphocytes B. Ce lymphome, dit de Burkitt (LB), représente alors la tumeur la plus fréquente chez ces enfants dans certaines régions d'Afrique de l'Est. C'est en 1961, en assistant à une conférence de Denis Burkitt sur ce lymphome africain qui se répartit selon des facteurs géographiques et climatiques faisant suspecter une influence virale, qu'Anthony Epstein décide de rechercher ce possible virus. En 1964, l'établissement de lignées cellulaires à partir d'explants de LB permet à Epstein, Achong et Barr d'identifier des particules de type herpèsvirus par microscopie électronique dans ces lignées cultivées *in vitro* (Sun, Burton et al. 2002) (figure 1).

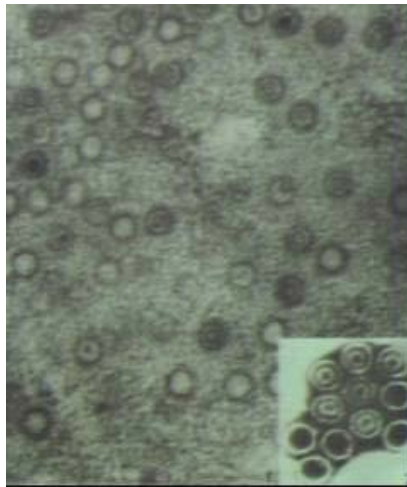


Figure 1: Particules virales trouvées dans les lignées de LB en 1964.
(Rickinson AB, Henle Lecture, EBV Symposium 2004, Regensburg).

En 1968, des études séro-épidémiologiques ont démontré qu'EBV infecte plus de 95% de la population et qu'il constitue l'agent étiologique d'une maladie anciennement connue, la mononucléose infectieuse (Henle, Henle et al. 1968). A partir de 1970, on détecte le génome viral dans les cellules malignes de LB et de carcinomes indifférenciés du nasopharynx (CNP), ce qui confirme l'association de ce virus à des cancers chez l'homme (Henle and Henle 1970). Sa capacité à immortaliser les lymphocytes B *in vitro* en lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL) et à provoquer des lymphomes chez le primate est alors

démontrée et conforte EBV dans son rôle d'agent oncogène chez l'homme. Depuis lors, EBV a été impliqué dans de nombreuses pathologies bénignes ou malignes d'origine épithéliale ou lymphoïde. En 1984, EBV est le premier virus humain dont le génome est entièrement séquencé (Baer, Bankier et al. 1984).

2. Taxonomie

EBV (ou HHV-4, pour Human HerpesVirus 4) appartient à la famille des Herpesviridae humains qui compte, à l'heure actuelle 8 membres. Il fait partie de la sous-famille des Gamma Herpesviridae et du genre Lymphocryptovirus.

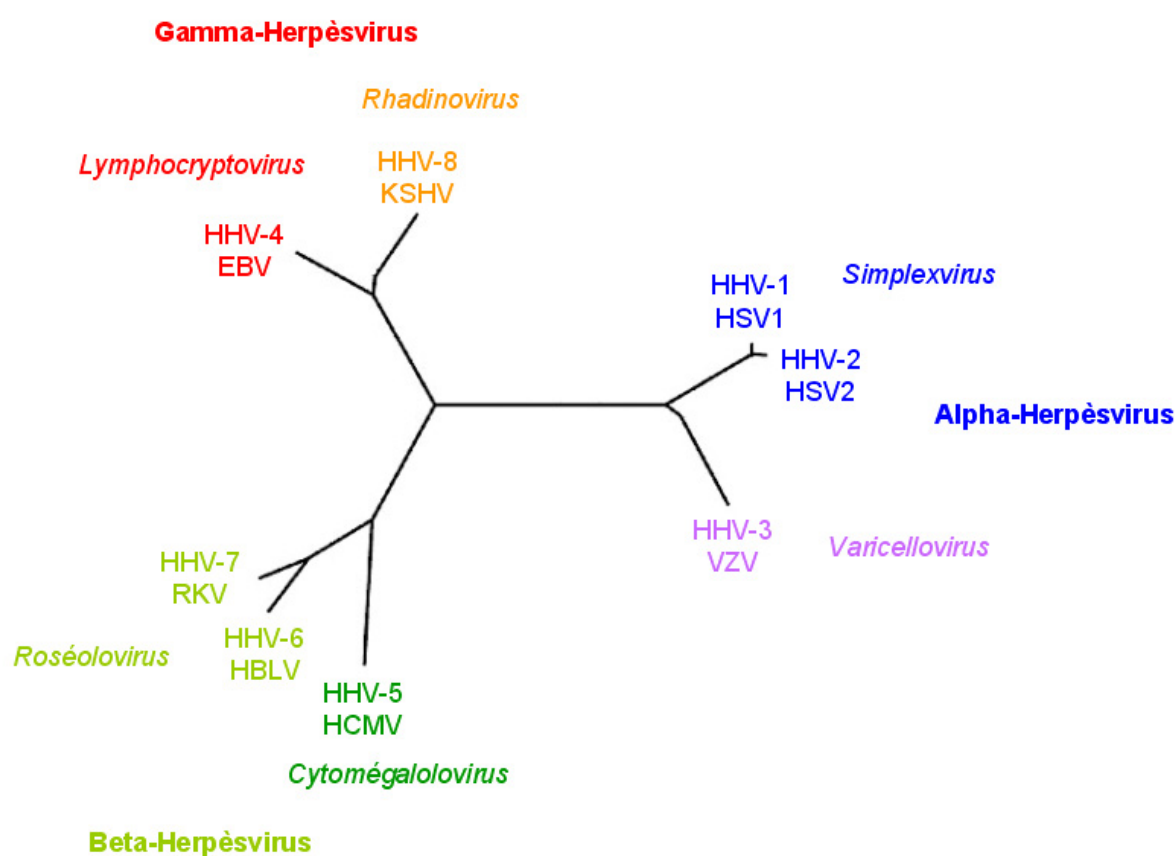


Figure 2: Organisation et évolution de la famille des Herpèsvirus humains. Chaque virus possède un nom standard (HHV-n) et un nom "usuel" donné lors de sa découverte. HHV : Human Herpes Virus ; HSV : Herpes Simplex Virus ; VZV : Varicella-Zoster Virus ; EBV : Epstein-Barr Virus ; HCMV : Human Cyto Megalo Virus ; HBLV : Human B-Lymphotropic Virus ; RKV : RK patient Virus ; KSHV : Kaposi's Sarcoma associated Herpes Virus. (Antman and Chang 2000).

Les différentes souches d'EBV peuvent être classées en 2 types (EBV-1 et EBV-2) sur la base du polymorphisme de leurs gènes EBNA2 (EBV Nuclear Antigen 2), 3A, 3B et 3C. Des études de séroprévalence ont montré que la souche EBV-1 est majoritaire dans les pays

occidentaux, alors que la souche EBV-2 ne prévaut que dans certaines zones d'Afrique Equatoriale et de Nouvelle-Guinée (Macswen and Crawford 2003). De plus, une microhétérogénéité supplémentaire existe parmi ces deux souches, notamment dans les régions répétées du génome viral, donnant ainsi de nombreux isolats différents.

3. Données épidémiologiques

EBV est présent dans plus de 95 % de la population adulte. Le virus est véhiculé durant toute la vie, par l'intermédiaire d'une infection latente des lymphocytes B et d'une production virale dans la salive. La majorité des primo-infections touchent les enfants et sont généralement asymptomatiques. Cependant, lorsque la primo-infection a lieu plus tard, chez l'adolescent ou l'adulte jeune - comme c'est le cas dans les pays développés - elle induit une infection généralement bénigne, la mononucléose infectieuse. Il s'agit d'une maladie lymphoproliférative B généralisée et transitoire, qui se traduit sur le plan immunologique par une augmentation du nombre de lymphocytes B infectés par EBV dans le sang périphérique et par une expansion oligoclonale massive de lymphocytes T CD8+ dirigés contre EBV.

La transmission du virus se fait généralement par contact avec les sécrétions oropharyngées qui contiennent les particules virales infectieuses. La transmission est également possible après transplantation d'organe ou greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) par les lymphocytes B infectés par EBV présents dans le sang des donneurs. Cette infection constitue un facteur de risque de syndrome lymphoprolifératif post-transplantation. Toutefois, à la différence des lymphomes survenant après greffe de CSH (cellules souches hématopoïétiques), les cellules tumorales des lymphomes post-transplantation d'organe dérivent en général des cellules B du receveur (Orazi, Hromas et al. 1997; Paya, Fung et al. 1999).

4. Structure du virion

Le virion d'EBV (figure 3) possède une structure commune à tous les Herpes virus, à savoir, du centre vers la périphérie :

Un nucléoïde qui contient l'ADN génomique viral de 172 kpb sous forme linéaire double brin. L'existence d'un cœur protéique fibrillaire autour duquel serait enroulé l'ADN viral est largement remise en cause pour de nombreux herpèsvirus comme HSV1, HCMV, KSHV (Lin, Li et al. 2003).

La capside qui est de forme icosaédrique (20 faces et 12 sommets) mesure 100-120 nm de diamètre et comporte 162 capsomères (150 hexamères et 12 pentamères).

Le tégument qui est composé de nombreuses protéines virales et cellulaires. Ce tégument n'a pas de structure particulière, même si quelques structures fibrillaires peuvent y être retrouvées.

L'enveloppe constituée d'un double feuillet lipidique dérivé des membranes de la cellule hôte au niveau desquelles le virus a exprimé ses antigènes de membrane. L'expression des glycoprotéines d'enveloppe, qui appartiennent aux antigènes de membrane, confère au virion un aspect "spiculé". C'est grâce à l'une d'entre-elles, la gp350/220 que le virus se fixe aux cellules hôtes via son récepteur CD21 (ou CR2, récepteur d'un composant du complément).

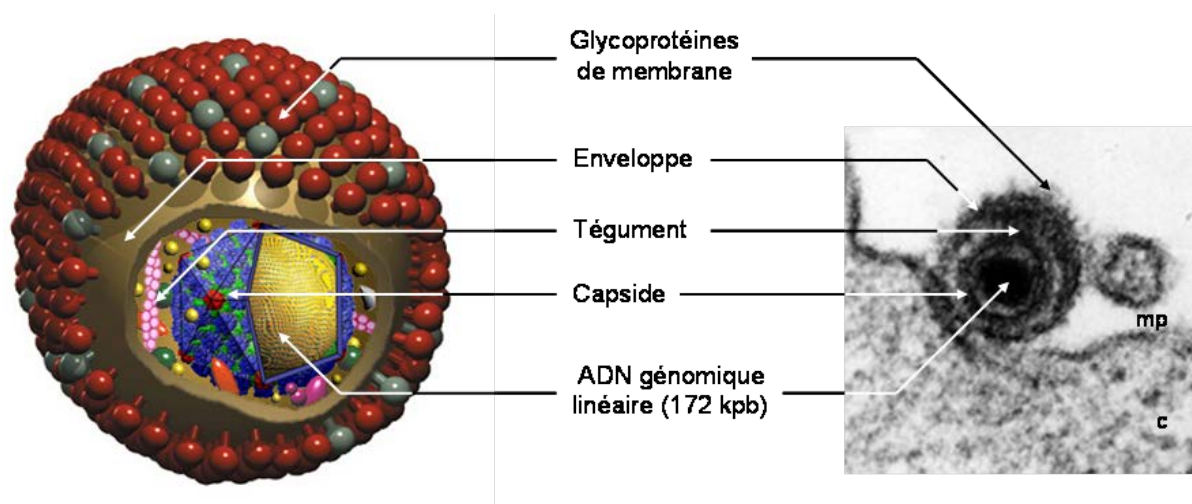


Figure 3 : Structure du virus d'Epstein-Barr. Schéma et photographie de microscopie électronique. c: cytoplasme de la cellule hôte; mp: membrane plasmique. (Schéma adapté de <http://www.biografix.de> et <http://www.vir.gla.ac.uk/staff/rixonfj/wholcaptext.shtml> et photographie obtenue sur <http://www.sciencenews.org/articles/20020803/bob10.asp>, d'après Hutt-Fletcher LM, "Epstein-Barr virus and immunomodulation" in "Effects of Microbes on the Immune System", 1999).

5. Organisation du génome viral

Le génome d'EBV est constitué d'un ADN bicaténaire de 172 kpb. Il est organisé de façon semblable à celui des autres lymphocryptovirus (figure 4). Il comporte en effet des séquences terminales répétées (TR) d'environ 500 pb en tandem direct à ses deux extrémités, ainsi qu'une importante zone de répétition interne (*Internal Repeat 1* ou *IR1*).

séparant le génome en deux régions uniques longue et courte (respectivement, Long Unique region ou U_L et Short Unique region ou U_S).

Le nombre des TR varie de 4 à 12. Ces séquences terminales permettent notamment au virus de circulariser son génome lors de l'infection. L'ADN viral forme alors un CCC (Covalently Closed Circle) et est nommé épisode. Sous cette forme, étroitement liée à la chromatine cellulaire, EBV peut maintenir son génome de façon stable dans les cellules infectées sans avoir à l'intégrer au génome de l'hôte.

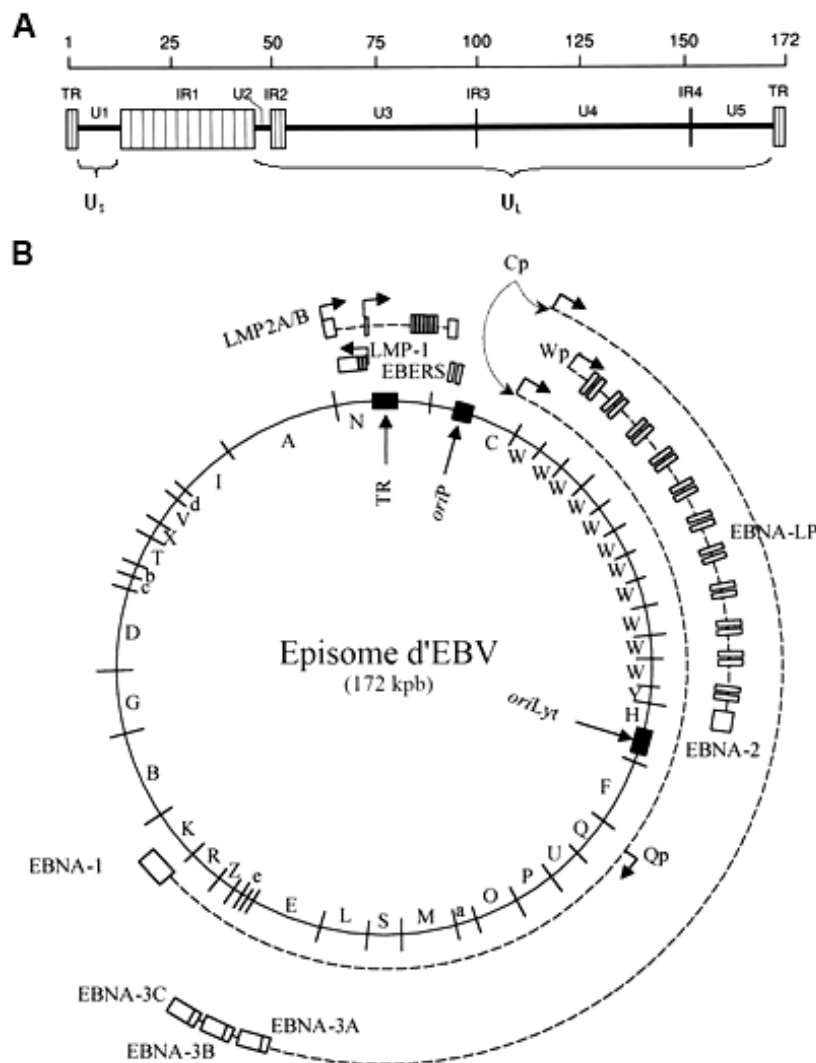


Figure 4: Organisation du génome d'EBV sous forme linéaire (A) et épisomale (B). La forme linéaire du génome est retrouvée dans les particules virales alors que la forme circularisée (épisode) est présente dans les cellules infectées. Seuls les gènes exprimés lors des différents programmes de latence sont représentés. Les transcrits primaires sont figurés en lignes hachées et les exons sont représentés par des boîtes blanches. IR : Internal Repeat ; U : Unique region ; oriP : Plasmidic replication origin (en phase de latence) ; oriLyt : Lytic replication origin ; Cp, Wp, Qp : respectivement promoteurs situés dans les régions BamHI C, W et Q. Les lettres à l'intérieur de l'épisode indiquent le nom du fragment obtenu après digestion du génome viral par l'enzyme BamHI. (Young and Murray 2003).

L'IR1 est quant à elle constituée de 7 à 12 répétitions en tandem de séquences mesurant environ 3 kpb chacune. Les zones U_S et U_L qu'elle délimite mesurent respectivement environ 15 et 150 kpb. Au sein de l' U_L , d'autres répétitions en tandem ont été décrites : IR2, 3 et 4. Des répétitions en tandem de modules de 125 pb et 103 pb ont été respectivement observées pour l'IR2 et l'IR4. L'IR3 est une séquence où trois triplets GGG, GCA et GGA sont réitérés sur 700 pb. Ainsi, la région U_L comporte 4 zones uniques appelées U2 à U5 (U1 servant à décrire U_S). Enfin, deux séquences identiques mesurant 1 kb ont été localisées à 2 endroits différents du génome viral, l'une au contact d'IR2 (séquence D_L) et l'autre au contact d'IR4 (séquence D_R). C'est dans ces séquences que se trouvent les origines de réplication lytique du virus (ori lyt). On retrouve également une origine de réplication latente (Ori p) située au niveau de U1.

Le génome a été entièrement séquencé et l'analyse de la séquence a permis d'identifier plus de 108 cadres ouverts de lecture (*ORF, Open Reading Frame*). Les ORF, les gènes, les sites de régulation ou de transcription sont fréquemment référencés par rapport à des fragments du génome obtenus après digestion par l'enzyme de restriction BamHI. Chaque fragment est nommé par une lettre (voir les lettres situées à l'intérieur de l'épisome sur la figure 4B). Le sens de lecture a été arbitrairement fixé ainsi : sur le génome linéaire, de U1 vers U5 représente le sens R (Rightward) et de U5 vers U1, le sens L (Leftward). Ainsi, par exemple, le gène codant la protéine LMP1 (Latent Membrane Protein 1) est parfois appelé BNLF1 parce qu'il se trouve sur le fragment BamHI N, qu'il est transcrit dans le sens L et qu'il s'agit du premier ORF (F1).

Il existe entre les différents isolats d'EBV un polymorphisme au niveau du nombre des séquences en tandem dans les TR_S . Un polymorphisme s'observe également au niveau des IR_S et de plusieurs gènes dont *BYRF1* (codant la protéine EBNA2), *BZLF1* (codant la protéine Zta) et *BNLF1* (codant la protéine LMP1, Latent Membrane Protein 1).

Comme tous les herpèsvirus, EBV a un cycle de vie qui se décompose en deux étapes: (i) la phase lytique ou productive, et (ii) la phase de latence. La première phase permet la production et la diffusion de particules virales et la seconde maintient à long terme le virus dans l'hôte. Chez l'hôte, EBV est majoritairement retrouvé à l'état latent. Un jeu unique de gènes de latence confère à EBV ses propriétés oncogènes et ses capacités à induire l'immortalisation des lymphocytes B in vitro.

6. Cycle lytique

La fréquence avec laquelle les lymphocytes B infectés de façon latente deviennent permissifs à la réplication virale peut être influencée par des conditions de culture spécifiques. Spontanément, seules 2 à 10 % des cellules présentes dans les LCL (lymphoblastoid cell line), des cellules B immortalisées par EBV, entrent en cycle lytique. On peut augmenter ce taux en traitant les cultures cellulaires avec divers agents chimiques (esters de phorbol, butyrate de sodium ou 5-azacytidine) ou biologiques (anti-immunoglobulines de surface, TGF- β ou vecteur exprimant la protéine EB1/BZLF1/Zta/ZEBRA - Z Epstein-Barr Replication Activator). Cette faible propension à activer le cycle lytique vient du fait que les protéines exprimées lors de la latence s'opposent à l'entrée dans le cycle lytique. La protéine LMP1 est particulièrement impliquée dans cette inhibition du cycle lytique. Elle active en effet la voie de signalisation NF κ B. Or, le niveau d'expression du facteur de transcription NF κ B joue un rôle majeur pour le passage de la latence au cycle lytique en bloquant à la fois l'expression et l'activité de la protéine Zta (Brown, Song et al. 2003). Cependant, une étude semble aller à l'encontre d'un tel rôle inhibiteur de LMP1 (Ahsan, Kanda et al. 2005). Les auteurs montrent en effet que LMP1, dont l'expression est également induite lors du cycle lytique, est essentielle au relargage des particules virales en fin de cycle lytique. Néanmoins, il semble que cela soit indépendant d'une signalisation classique induite par LMP1 car c'est surtout la forme lytique de LMP1, incapable d'activer cette signalisation, qui permet de palier l'absence de LMP1 pour le relargage des virions.

La protéine **Zta**, que code le gène BZLF1, est le commutateur induisant le passage de la latence au cycle lytique. Quand Zta peut s'exprimer, elle induit sa propre expression mais également celle des facteurs de transcription Rta et Mta, que codent les gènes BRLF1 et BMLF1, respectivement. De plus, elle inhibe ses propres inhibiteurs, les facteurs de la famille NF κ B (Dreyfus, Nagasawa et al. 1999).

L'expression des protéines Zta, Rta et Mta, qui sont les antigènes précoces immédiats (IEA: Immediate Early Antigen) du cycle lytique, va permettre l'expression d'autres antigènes précoces (EA: Early Antigen) qui vont constituer le pool de protéines nécessaires à la formation du complexe de réplication virale et à la biosynthèse des antigènes tardifs que sont les antigènes de capsid VCA (Viral Capsid Antigen) et d'enveloppe MA (Membrane Antigen).

Pendant le cycle lytique, les cellules permissives subissent un changement cytotologique qui se traduit par la formation d'une inclusion intranucléaire, une "margination" de la chromatine nucléaire, l'assemblage des capsides à l'intérieur du noyau près de la membrane nucléaire, le bourgeonnement du virus au travers de la membrane nucléaire et la formation de vésicules cytoplasmiques (figure 5). En culture, le cycle lytique se déroule sur une période de 16 à 24 heures (Marechal and Piolot 2000).

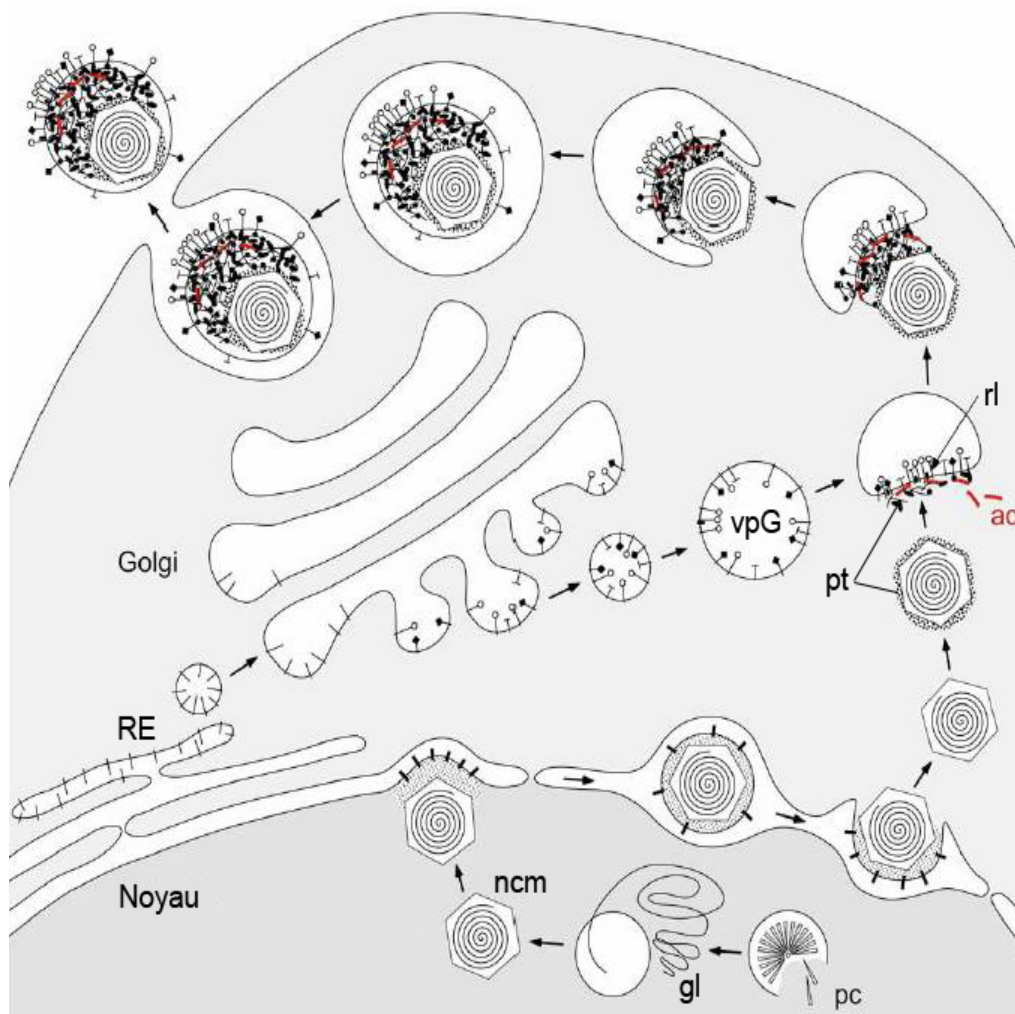


Figure 5: Cycle lytique, assemblage et sortie du virion. Les précurseurs de capsides (pc) s'assemblent dans le noyau. L'ADN viral (gl : génome linéaire) est alors empaqueté formant alors les nucléocapsides matures (ncm) qui sortent du noyau par enveloppement à la membrane nucléaire interne et désenveloppement à la membrane nucléaire externe. Les glycoprotéines virales s'accumulent dans des vésicules post-Golgi (vpG). L'enveloppement secondaire est déclenché par l'interaction de la nucléocapside et/ou des protéines du tégument (pt) avec les domaines intracytosoliques des glycoprotéines regroupées à un emplacement spécialisé (impliquant peut-être des radeaux lipidiques - rl). Des protéines du tégument (pt) sont recrutées sur un échafaudage se prolongeant entre la capside et la membrane dans un processus pouvant impliquer les microfilaments d'actine (ac). La nucléocapside et son tégument sont finalement internalisés dans la vpG. Finalement, les virions sont relargués dans l'espace extracellulaire par fusion de la membrane externe de la vpG avec la membrane plasmique. (Grunewald, Desai et al. 2003).

Il est possible, *in vitro*, d'immortaliser des lymphocytes B par EBV et d'obtenir des LCL. Ces dernières sont très peu permissives à la réplication virale (cycle lytique) et le virus s'y maintient dans un état dit «de latence ».

B. Latences virales

Le statut de latence virale repose sur deux phénomènes très interdépendants. Le premier phénomène est la répression du cycle lytique et le maintien du génome viral en situation intranucléaire sous forme épisomale circularisée. Le deuxième phénomène, essentiel au maintien de la latence virale, est l'expression des gènes dits « de latence ». Ces gènes ont des fonctions diverses, et les produits de certains d'entre eux auront la propriété d'immortaliser les lymphocytes B infectés. Par rapport au nombre total de gènes présents dans le génome d'EBV, il y a peu de gènes de latence. On compte 11 gènes de latence, regroupés en 3 principales familles :

- les gènes qui codent les 6 protéines EBNA
- les gènes qui codent les 3 protéines LMP
- les gènes qui codent les petits ARN EBER (EBV encoded RNA) et BART (BamHI-A region without rightward transcripts).

L'expression des protéines de latence contribue aux propriétés d'immortalisation et/ou de transformation d'EBV en influençant la machinerie cellulaire afin de contrôler la croissance et/ou la survie des cellules infectées.

1. Différents programmes de latence

Le profil d'expression des gènes de latence n'est pas identique dans tous les contextes cellulaires d'infection par EBV. On distingue ainsi 4 types (0, I, II, III) de latence en fonction des différents gènes qui sont exprimés (figure 6). Il faut noter que les ARN EBER 1 et 2 s'expriment dans chacune des latences. Quant aux ARN BART, ils sont exprimés au moins en partie lors des latences I, II et III mais, aucune donnée, n'existe sur leur statut durant la latence 0.

Le tableau I récapitule les différentes latences virales et les pathologies qui y sont associées.

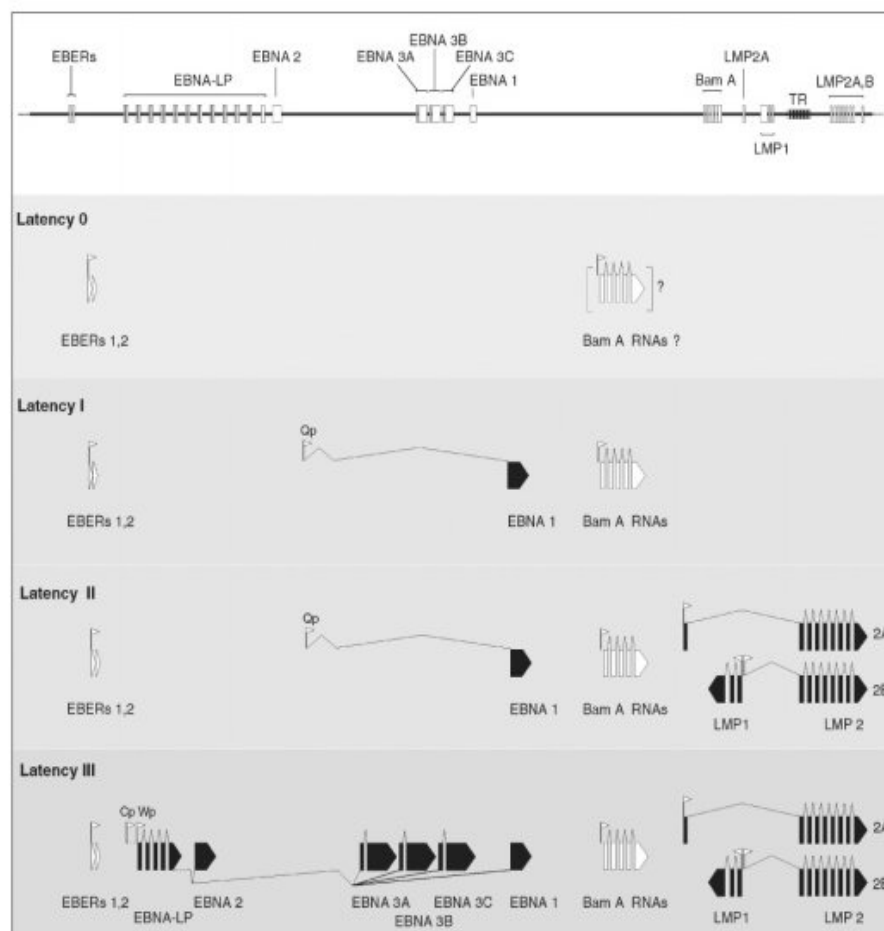


Figure 6: Profil d'expression des gènes viraux au cours des différents types de latence. Les transcrits sont représentés selon leur orientation les uns par rapport aux autres, avec les promoteurs (fanions) et les profils d'épissage comme représentés ; les exons sont illustrés pour les ARN non-codants (en blanc, incluant les BARTs dont la capacité codante n'est pas encore résolue) et pour les ARN messagers (en noir). Les positions actuelles de ces exons sont représentées sur une carte linéaire du génome viral. Il est à noter que le génome est circularisé dans les cellules en phases de latence via la fusion de s Terminal Repeats (TR), et que les transcrits de LMP2 sont épissés au-delà de cette région des TR fusionnés. (*Fields of Virology*, 5^{ème} Edition, 2007).

La **latence de type I** est celle que l'on trouve dans le LB. Elle se caractérise par la seule présence de la protéine EBNA1 et un phénotype cellulaire particulier. Les cellules expriment en effet à leur surface les marqueurs CD10 et CD77, et peu ou pas d'antigènes d'activation cellulaire et de molécules d'adhésion (Gregory, Rowe et al. 1990).

La **latence de type II** (appelée aussi programme par défaut) est caractéristique du carcinome du nasopharynx (CNP), de la maladie de Hodgkin et de certains lymphomes T/NK, et se caractérise par l'expression des protéines EBNA1, LMP1, LMP2A et LMP2B.

La **latence de type III** (appelée aussi programme de croissance) se retrouve dans les LCL transformées *in vitro* par EBV et dans les lymphoproliférations des sujets

immunodéprimés. Elle s'accompagne de l'expression des 9 protéines de latence EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, EBNA-LP, LMP1, LMP2A et LMP2B.

Tableau I. Récapitulatif des différentes latences virales et pathologies associées.

Type de latence	Profil d'expression des gènes de latence	Pathologies associées
Type 0	EBER1/2, BARTs, $\pm$ LMP2a et $\pm$ EBNA1	- Lymphocytes B quiescents
Type I	EBER1/2, BARTs, EBNA1	- Lymphocytes B quiescents
Type II	EBER1/2, BARTs, EBNA1, LMP1, LMP2a et LMP2b	- Carcinome du nasopharynx -Lymphome NK/T -Maladie de Hodgkin
Type III	EBER1/2, BARTs, EBNA1, EBNA2, EBNA3A, 3B, 3C, EBNA1P, LMP1, LMP2a et LMP2b	- Syndromes lymphoprolifératifs des sujets immunodéprimés

Ces trois types de latence sont typiquement retrouvés dans certaines pathologies malignes associées à EBV (Tableau I). Cependant, en dehors de toute pathologie tumorale, ces trois programmes de latence semblent être caractéristiques des différentes étapes franchies par le virus lors d'une infection asymptomatique (figures 12 et 13). Ainsi, chez les personnes infectées de façon persistante et asymptomatique, le réservoir viral majeur est une partie des lymphocytes B mémoires de l'hôte, où EBV se maintient en latence de type 0 (appelée aussi programme latent). Durant cette latence, les EBER sont transcrits mais aucune protéine virale n'est exprimée (Hochberg, Souza et al. 2004).

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé plus particulièrement à la latence de type II d'EBV et à son association à 2 pathologies malignes (le lymphome de Hodgkin, le carcinome du nasopharynx), c'est pourquoi par souci de concision, je me contenterai de décrire les produits des gènes associés à cette latence.

2. Description des différents produits de gènes de la latence II

a) EBNA1

Dans un premier temps, l'expression des protéines EBNA (EBV Nuclear Antigen) est initiée à partir du promoteur Wp puis, lorsque la transformation cellulaire est établie, c'est le promoteur Cp qui prend le relais (figure 4).

Les transcrits EBNA1 sont initiés à partir du promoteur Wp, au moment de la circularisation du génome viral. Puis, comme pour les autres protéines EBNA, la transcription passe sous le contrôle du promoteur Cp, une fois la transformation cellulaire établie. Dans les latences de type I et II, où la protéine EBNA1 est la seule des protéines EBNA à être produite, les promoteurs Cp et Wp sont éteints par méthylation, et le promoteur Qp prend le relais (Schaefer, Strominger et al. 1997).

La protéine EBNA1 est retrouvée dans tous les types de latence et, de ce fait, dans toutes les pathologies associées à EBV. En effet, les propriétés biologiques de la protéine EBNA1 sont indispensables au maintien du virus dans la cellule en prolifération. Ainsi, EBNA1 se fixe sur une région de répétitions située dans l'origine de réplication plasmidique (oriP) et également sur les chromosomes de la cellule hôte lors de la mitose (Schreiber, Wu et al. 2002). Grâce à ces fixations, la protéine EBNA1 permet la réplication et le maintien du génome viral dans les cellules en prolifération. La protéine EBNA1 peut également agir en tant qu'activateur transcriptionnel, sur quelques promoteurs viraux et cellulaires (Hebner, Lasanen et al. 2003). La localisation nucléaire ainsi que les fonctions d'EBNA1 ont été montrées comme étant régulées par des modifications post-traductionnelles. Ainsi, au niveau de la région centrale riche en glycines et arginines d'EBNA1, la méthylation sur certaines arginines semble permettre sa localisation au niveau des nucléoles, alors que la phosphorylation de sérines régule à la fois ses propriétés de transactivateur et de maintien du génome viral (Shire, Kapoor et al. 2006). Enfin, selon la sérine ciblée au sein du signal de localisation nucléaire d'EBNA1, la phosphorylation diminue ou accroît le transport vers le noyau via un contrôle par l'importine $\alpha 5$ (Kitamura, Sekimoto et al. 2006).

Quelques études montrent également l'importance de la protéine EBNA1 pour la transformation cellulaire. En effet, des souris transgéniques pour EBNA1 présentent une forte incidence de lymphomes B, et l'expression de la protéine EBNA1 dans une lignée de

CNP augmente ses propriétés tumorigènes et métastatiques (Sheu, Chen et al. 1996; Wilson, Bell et al. 1996). De plus, indépendamment de sa fonction de maintien du génome viral, EBNA1 semble impliqué dans l'inhibition de l'apoptose des cellules B infectées par EBV quelque soit le type de latence exprimée par le virus (Kennedy, Komano et al. 2003).

Plusieurs mécanismes moléculaires contribueraient aux effets cellulaires d'EBNA1 en faveur de la tumorigénèse (figure 7), notamment dans le CNP, par (i) la déstabilisation du P53, facteur de transcription jouant un rôle important dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose ((Holowaty, Zeghouf et al. 2003) ; (Saridakis, Sheng et al. 2005) ; (Sheng, Saridakis et al. 2006)), (ii) la perturbation des corps nucléaires du PML (*Promyelocytic leukemia*) qui contrôlent l'apoptose, la réparation de l'ADN et la sénescence ((Salomoni, Ferguson et al. 2008); (Bernardi and Pandolfi 2007); (Takahashi, Lallemand-Breitenbach et al. 2004)), (iii) la modulation des voies de signalisation qui régulent la prolifération et la transformation cellulaire en induisant la sous-régulation de STAT1, connue pour supprimer des gènes de tumeur et régulée par TGF- β 1, en altérant la signalisation du TGF- β ce qui augmente le turnover de SMAD2 (Wood, O'Neil et al. 2007); (Flavell, Baumforth et al. 2008) et par l'inhibition de la voie NF- κ B (Valentine, Dawson et al. 2010), (iv) l'induction du stress oxydatif résultant de l'accumulation des ROS (Reactive Oxygen Species) impliqué dans divers mécanismes tels que l'apoptose et le dommage à l'ADN (Lassoued, Ben Ameur et al. 2008); (Cerimele, Battle et al. 2005), (v) l'inhibition du Nm23-H1, suppresseur de métastase et de migration cellulaire (Kaul, Murakami et al. 2007); (Murakami, Lan et al. 2005) et (vi) l'induction de la Survivine, inhibiteur de l'apoptose, contribuant ainsi à la survie des cellules infectées par EBV (Wu, Kapoor et al. 2002; Lu, Murakami et al. 2011).

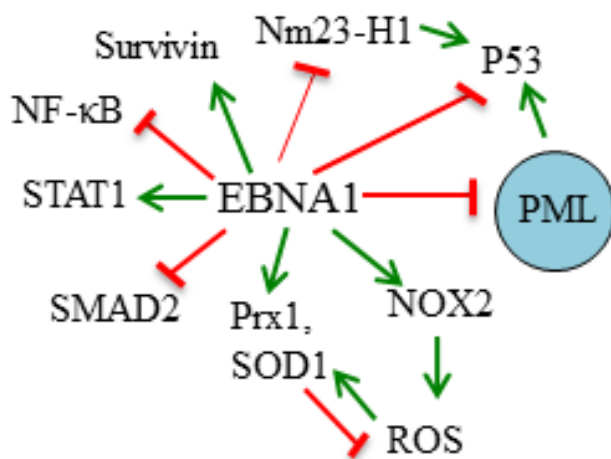


Figure 7 : Effets d'EBNA1 sur la survie cellulaire.

Les protéines cellulaires dont les fonctions ou les quantités sont affectées par EBNA1 de manière à augmenter la survie des cellules sont présentées. Les flèches vertes représentent la régulation positive et les lignes rouges représentent la régulation négative. Un corps nucléaire PML est représenté par le cercle bleu (Frappier, 2012).

b) LMP1

Le transcrit correspondant à la protéine LMP1 est le plus abondant du cycle de latence (50 à 60 copies par cellule dans la latence de type III) et est synthétisé vers la gauche, contrairement à tous les autres transcrits exprimés durant la latence. LMP1 est une protéine de membrane ayant une demi-vie courte (environ 3h). Elle est fortement associée au cytosquelette et forme constitutivement des agrégats dans la membrane plasmique, même en l'absence de facteurs de croissance exogènes ou d'autres protéines virales. Elle comprend 3 domaines : un domaine N terminal (Nt) cytoplasmique de 24 aa, un domaine transmembranaire de 162 aa composé de 6 hélices α et un domaine C terminal (Ct) cytoplasmique de 200 aa (figure 8). Les domaines Nt et transmembranaire sont responsables de l'ancrage de LMP1 à la membrane et de son agrégation constitutive. Le domaine Ct cytoplasmique est, quant à lui, impliqué dans l'activation des voies de signalisation cellulaire induites par LMP1.

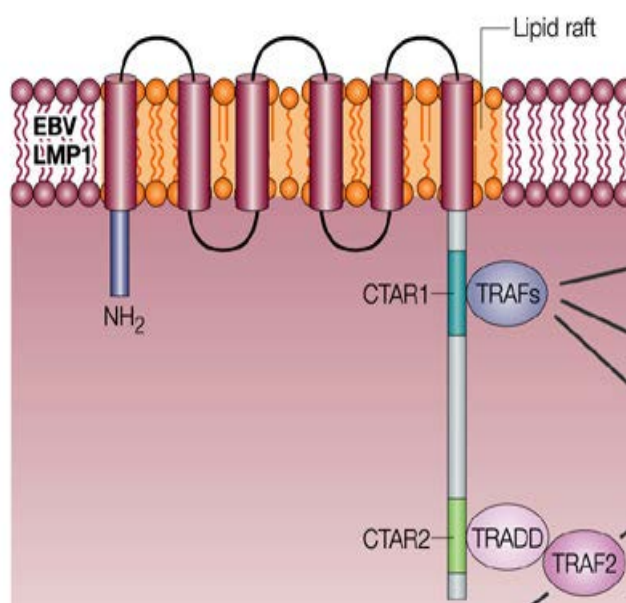


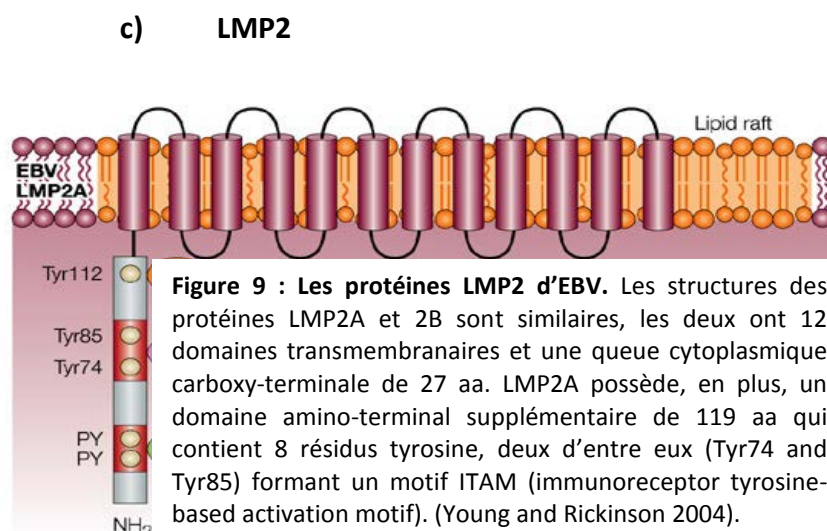
Figure 8: La protéine LMP1 d'EBV. La protéine LMP1 d'EBV est une protéine membranaire intégrale de 63 kDa qui peut se subdiviser en 3 domaines: une queue amino-terminale cytoplasmique (acides aminés (aa) 1-23), qui attache LMP1 à la membrane plasmique et oriente la protéine, six boucles transmembranaires hydrophobes qui sont impliquées dans l'auto-agrégation et l'oligomérisation (aa 24-186), une longue région carboxy-terminale cytoplasmique (aa 187-386) qui possède l'activité signalisatrice de la molécule. Deux domaines fonctionnels CTAR (C Terminal Activator Regions) 1 et 2 ont été identifiés sur la base de leur capacité à activer la voie du facteur de transcription NF κ -B (Nuclear factor- κ B). (Young and Rickinson 2004).

LMP1 est considéré comme l'oncogène majeur d'EBV. Grâce à sa signalisation, LMP1 présente des propriétés immortalisantes et transformantes, et est responsable de nombreux changements phénotypiques dans les cellules infectées par EBV (Young, Dawson et al. 2000). La région de LMP1 responsable de l'induction des voies de signalisation cellulaire est incluse dans la partie Ct cytoplasmique de la protéine. Cette région se subdivise en 2 domaines importants «C terminal Activatig Region » (CTAR)-1 et CTAR-2 qui incluent eux-mêmes les sites « *Transforming Effector Sites* » (TES)-1 et TES2, dont les rôles dans la signalisation et la

transformation se recouvrent en grande partie. Ces 2 domaines sont responsables de l'activation des voies p38 et JNK/AP1 et de l'activité NF- κ B induite par LMP1. Les médiateurs proximaux de ces voies identifiés à ce jour et interagissant directement avec LMP1 ont également été caractérisés au préalable par leur interaction avec les membres de la famille des récepteurs au TNF α (TNF-R). Il s'agit des protéines TRAF (*TNF-R Associated Factors*, interagissant avec TES1) et TRADD (*TNF-R Associated Death Domain*, interagissant avec TES2).

LMP1 joue un rôle important dans la transformation des cellules épithéliales de CNP. EBV seul n'étant, en effet, pas suffisant pour initier la tumorigénèse du CNP, dans lequel on trouve une surexpression des oncogènes et de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs (GST) défectueux (Lo and Huang 2002; Tao and Chan 2007). La capacité de LMP1 à moduler l'expression ou l'activité de nombreux oncogènes et GST laisse suggérer qu'elle contournerait la nécessité de dérégulation de gènes durant la pathogénèse du CNP.

Récemment, une étude a montré que LMP1 induit la sur-expression protéique de la survivine et de P53 ainsi que leur phosphorylation, et que l'inhibition de P53 par un siRNA montre que LMP1 augmente l'expression de la survivine en passant directement par P53. De plus, il a été montré, au niveau transcriptionnel, que LMP1 induit la sur-expression de la survivine en augmentant l'activité du promoteur médié par P53. Enfin, P53 favoriserait la progression du cycle cellulaire au niveau de la phase G1/S, mais n'induirait pas l'apoptose dans les cellules de CNP LMP1+ (Guo, Tang et al. 2012).



Les ARNm de LMP2A et LMP2B sont transcrits à partir du même gène mais de promoteurs différents. Le promoteur de LMP2B est en fait pLMP1 puisque ce promoteur est bidirectionnel (figure 4B). Ainsi, la protéine LMP2B est une version tronquée de LMP2A à laquelle il manque tout le domaine amino-terminal cytosolique. LMP2A joue un rôle important dans le maintien à l'état latent du virus *in vivo* (Merchant, Swart et al. 2001). En effet, LMP2A possède des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) qui permettent de lier et de séquestrer les tyrosine kinases Lyn et Syk nécessaires à la signalisation du récepteur des lymphocytes B (BCR) (Figure 9). La protéine LMP2A recrute également les ligases (E3) qui vont ubiquitinyler les protéines Lyn et Syk et donc activer leur dégradation par le protéasome (Winberg, Matskova et al. 2000). En bloquant la voie de signalisation du BCR, la protéine LMP2A inhibe le passage de la latence au cycle lytique, normalement induit par la signalisation du BCR (Merchant, Swart et al. 2001). Cependant, LMP2A stimule à un certain degré les tyrosines kinases et fournit des signaux de survie mimant l'activation du BCR, empêchant ainsi les lymphocytes B de suivre leur développement normal dans les centres germinatifs - c'est-à-dire mourir par apoptose en l'absence de sélection via le BCR (Merchant, Swart et al. 2001). Les transcrits de LMP2A ou LMP2B sont fréquemment détectés dans les lymphomes de Hodgkin, le carcinome du nasopharynx et dans le Lymphome de Burkitt (Bell, Groves et al. 2006) suggérant que LMP2A est un facteur clé dans la capacité d'EBV à contribuer aux cancers humains. LMP2A est en effet capable de participer à la transformation des cellules épithéliales notamment grâce à l'activation des voies de signalisation cellulaire PI3K-Akt et β -caténine (Morrison and Raab-Traub 2005), mais également à leur pouvoir métastatique (Pegtel, Subramanian et al. 2005). Cette donnée a été confirmée par les travaux de Longnecker, dans des lignées de cellules épithéliales et de cellules de carcinome gastrique (Fukuda and Longnecker 2007). Idée également supportée par de récents travaux rapportant l'effet protecteur de LMP2A sur l'apoptose induite par une translocation *c-myc* dans un modèle de Lymphome de Burkitt, ainsi que sa participation à la prolifération cellulaire et à l'accélération de la mise en place du lymphome (Bultema, Longnecker et al. 2009). Ceci suggère que LMP2A peut avoir un rôle clé non seulement dans le maintien de la latence chez les porteurs sains, mais également en tant qu'activateur de la carcinogénèse EBV-dépendante (Pang, Lin et al. 2009).

De plus, LMP2A agirait comme un régulateur de signal et augmenterait l'invasion et la motilité des cellules épithéliales. Il a été montré que LMP2A induit la sur-expression des matrices métalloprotéinase 9 (MMP9), protéase associée à la métastase, au niveau de l'ARNm et protéique. Elle active également le promoteur de MMP9 qui nécessite deux éléments AP-1. Parmi les facteurs de transcription AP-1, Fra-1 est induit par LMP2A et s'est révélé essentiel à la sur-régulation des MMP9 médiée par celle-ci. Son induction (Fra-1) est dépendante de la voie d'activation ERK1/2 de LMP2A, et l'induction de l'axe ERK1/Fra-1-MMP9 requiert le motif PY au niveau du domaine N-terminal de LMP2A. Le pouvoir invasif de LMP2A sur les cellules de CNP est bloqué quand l'expression des MMP9, l'induction de Fra-1 ou l'activation de ERK1/2 est inhibée (Lan, Hsiao et al. 2012).

d) **ARN viraux EBER et BART**

Les ARN **EBER** (EBV Encoded RNA) sont des petits ARN nucléaires non polyadénylés qui sont exprimés dans tous les programmes de latence d'EBV. Ils sont tous deux transcrits par l'ARN polymérase III et à un moindre degré par l'ARN polymérase II. La particularité de ces petits ARN est leur très grande quantité (plus d'une centaine de copies par cellule). Ils sont complexés à des protéines nucléaires pour former des complexes ribonucléoprotéiques très stables. Les ARN EBER semblent impliqués dans l'épissage des transcrits EBNA et LMP. Ils sont aussi impliqués dans des mécanismes anti-apoptotiques, inhibent les effets anti-viraux des interférons (IFN)- α et - γ et induisent la production d'interleukine (IL)-10, probablement par le biais de l'inhibition de la protéine PKR (double stranded RNA-activated Protein Kinase) (Sharp, Raine et al. 1999; Iwasaki, Nakashima et al. 2000).

Les ARN **BART** (Rightward Transcrits of the BamHI A region) sont également retrouvés dans tous les types de latence virale. Ils présentent dans leur extrémité 3' terminale un cadre de lecture ouvert, BARF0. Des études *in vitro*, réalisées avec une des protéines BARF0 (RK-BARF0) surexprimée, montrent que cette protéine pourrait induire la transcription de LMP1 en l'absence d'EBNA2 grâce à une interaction avec le précurseur du récepteur Notch (Kusano and Raab-Traub 2001). Cependant, l'expression des protéines BARF0, n'a jamais été retrouvée *in vivo* (van Beek, Brink et al. 2003). Il existe d'autres cadres de lecture ouverts possibles dans les ARN BART, dont RPMS1 et BARF1. RPMS1 s'exprime dans les latences de type I, II et III. Cette protéine se fixe au co-répresseur CIR pour inhiber les transactivations Notch- et EBNA2-dépendantes (Zhang, Chen et al. 2001). BARF1

(homologue soluble du récepteur au CSF-1 - Colony Stimulating Factor 1), a une expression restreinte aux tumeurs d'origine épithéliale. Cette protéine est abondamment sécrétée et a, ainsi, les propriétés oncogènes d'un facteur de croissance surexprimé (Busson, Ooka et al. 2004).

C'est dans l'ARN BART, au sein des introns, qu'ont été découverts les premiers micro ARN (ou miR-BART) d'EBV (Pfeffer, Zavolan et al. 2004). Plusieurs miR-BART divisés en trois groupes (cluster 1, cluster 2 et le mi-BART2) ont été identifiés, ils sont transcrits pendant la phase de latence. Le miR-BART22 (cluster 2), fortement exprimé dans le CNP, régule l'expression de la protéine LMP-2A permettant l'échappement au système immunitaire des cellules infectées par EBV (Lung et al. 2009). Le miR-BART2 diminue l'expression de l'ADN polymérase BALF5 empêchant le passage du cycle de latence au cycle lytique (Barth, Pfuhl et al. 2008). Enfin, le miR-BART5 (cluster 1) inhibe l'expression de la protéine pro-apoptotique induite par p53, la protéine PUMA (p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis), favorisant ainsi la survie cellulaire (Choy, Siu et al. 2008).

Le tableau II rappelle les protéines de la latence II et rapporte leurs principales fonctions que ce soit dans le maintien de la latence ou dans le processus de transformation.

Tableau II. Récapitulatif des protéines virales de la latence II et de leurs fonctions.

PROTÉINE VIRALE	FONCTIONS
EBNA1	- Essentielle à l'immortalisation des lymphocytes B <i>in vitro</i>, - Maintien du génome viral, - Activateur transcriptionnel (EBNAs, LMP1)
LMP1	- Essentielle à l'immortalisation/transformation cellulaire, - Oncogène majeur (activation des voies p38, JNK/AP1 et NF-κB)
LMP2	- Activateur de la carcinogénèse - Permet aux lymphocytes B de survivre en l'absence de sélection via le récepteur des lymphocytes B (BCR) - Inhibe le passage de la latence au cycle lytique

EBV a ainsi su co-évoluer avec l'homme durant des millions d'années, et pendant cette association étroite, le virus a adapté son cycle de vie à son hôte, faisant d'EBV l'un de nos virus « parasites » les plus communs.

C. *Physiopathologie de l'infection par EBV*

1. Cibles cellulaires classiques du virus

a) Lymphocytes B

C'est "la" cellule cible classique d'EBV car (i) c'est dans ces cellules que l'on a découvert le virus et (ii) c'est dans ces mêmes cellules que se situe le réservoir viral de la plupart des personnes infectées ; 1 à 10 cellules B mémoire infectées sur 100 000 (Hochberg, Souza et al. 2004). De plus, ces cellules expriment fortement le principal récepteur d'EBV (CD21, récepteur de la gp350) et le co-récepteur (CMH de classe II, récepteur de la gp42) et sont ainsi aisément infectables *in vitro*. Cette infection par EBV de cultures primaires de lymphocytes B humains va se traduire par une transformation cellulaire donnant des LCL. Dans ces cellules, le virus établit un programme de latence de type III. Sous l'effet de ces protéines de latence, le phénotype et les fonctions des lymphocytes B vont être profondément modifiés : augmentation de l'expression des molécules d'adhérence comme CD54/ICAM1, LFA1 et LFA3 (ce qui donne, *in vitro*, la croissance en paquets si caractéristique de ces cellules (figure 10)) ou de marqueurs d'activation (CD23, CD39 et CD40). Les cellules ont également une dépendance moins forte au sérum pour leur prolifération et sécrètent moins d'immunoglobulines.

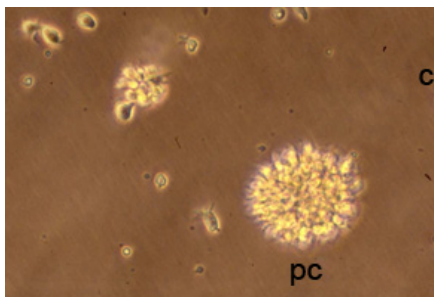


Figure 10 : Photographie de LCL en culture. ci: cellule isolée ; pc: paquet de cellules. (Obtenue sur le site du laboratoire "Epstein-Barr Virus" du Professeur Paul J Farrell; <http://www1.imperial.ac.uk/medicine/about/divisions/is/viro>)

b) Cellules épithéliales

Historiquement, ce type cellulaire est le second à avoir été fortement associé à EBV suite à la découverte de nombreux cas de CNP associés à la présence du virus.

In vivo, la pénétration d'EBV dans les cellules épithéliales de l'oropharynx et/ou des amygdales est une étape précoce lors de l'infection par le virus. Néanmoins, le fait que leur infection ait lieu précédemment ou subséquent à celle des lymphocytes B est une question encore largement débattue dans la littérature (Chang, Tung et al. 1999; Pegtel, Middeldorp et al. 2004; Shannon-Lowe, Neuhierl et al. 2006; Hadinoto, Shapiro et al. 2009). Par contre, une fois ces cellules infectées, le virus y accomplit alors principalement un cycle réplcatif complet. L'infection des cellules épithéliales est moins bien comprise que l'infection des lymphocytes B car, contrairement à ces dernières, elles n'expriment pas la molécule CD21 (CR2). Cependant, si l'on co-cultive, *in vitro*, une lignée de cellules épithéliales et des lymphocytes B infectés par EBV et produisant des virions, on observe une infection des cellules épithéliales (Speck and Longnecker 2000; Tugizov, Berline et al. 2003; Pegtel, Middeldorp et al. 2004).

Des travaux montrent que l'attachement du virus sur les cellules épithéliales fait intervenir la glycoprotéine virale gH. L'entrée du virus dans ces cellules, contrairement aux lymphocytes B qui nécessitent le complexe gH/gL/gp42, implique un complexe composé uniquement des deux glycoprotéines gH/gL (Molesworth, Lake et al. 2000). La plupart des virions produits par les lymphocytes B perdent la protéine gp42 à leur surface. En effet, cette dernière est séquestrée par le CMH de classe II présent à la surface des lymphocytes B. Ceci accroît donc le tropisme du virus pour les cellules épithéliales. A l'opposé, l'absence du CMH II à la surface des cellules épithéliales va influencer le tropisme du virus vers les lymphocytes B (Borza and Hutt-Fletcher 2002) ; figure 11).

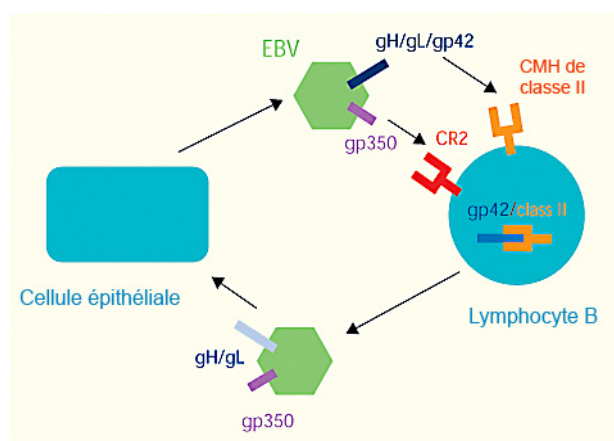


Figure 11 : Modèle d'infection par EBV.

EBV infecte les lymphocytes B, grâce aux interactions gp350-CR2, et gH/gL/gp42-CMH-II. Les virions libérés par les lymphocytes B (ceux qui sont donc relargués dans la salive) sont gp42⁻ (séquestrée par CMH-II dans les cellules B) et infectent donc préférentiellement les cellules épithéliales dont l'infection ne nécessite pas gp42. (Farrell 2002)

Par ailleurs, une autre glycoprotéine du virus a été décrite comme importante pour l'infection des cellules épithéliales. En effet, une étude a démontré que BMRF2 porte un motif RGD qui est essentiel à l'interaction avec l'intégrine $\beta 1$ exprimée du côté basolatéral des cellules épithéliales. Cette interaction est indispensable à l'infection des cellules avec des virus libres (Tugizov, Berline et al. 2003). Cette même équipe a également montré qu'EBV pouvait se disséminer au sein d'un épithélium de façon indépendante des cellules B. En effet, EBV est capable de se transmettre entre des cellules épithéliales adjacentes en passant au travers des membranes latérales à proximité des desmosomes et des jonctions serrées (Tugizov, Berline et al. 2003).

Beaucoup plus récemment, il a été montré que l'infection par EBV (venant de lymphocytes B) des cellules épithéliales impliquait la formation d'une synapse intercellulaire où se concentrent des complexes gp350/CD21 et où gp85 et gp110, mais pas gp42 (essentielle à l'infection des cellules B via le CMH de classe II), jouent un rôle important (Shannon-Lowe, Neuhiel et al. 2006).

2. Etapes cellulaires de l'infection

Les études menées *in vitro* sur des lymphocytes B ont permis de mettre en évidence les différentes étapes de l'infection par EBV (figure 12).

L'infection commence par la fixation du virus sur la cellule cible, grâce à l'interaction entre une glycoprotéine majeure de l'enveloppe virale, la gp350/220, et la molécule cellulaire CD21 ou CR2 (récepteur des fractions C3d et C3g du complément), exprimée à la surface de tous les lymphocytes B. Après fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique de la vésicule d'endocytose, la nucléocapside pénètre dans le cytosol. La pénétration de la membrane cellulaire requiert un complexe de molécules virales comprenant 3 glycoprotéines, gH/gL/gp42 qui vont se fixer sur les cellules CD21-positives (Molesworth, Lake et al. 2000). L'internalisation des virions nécessite la coopération de la molécule gp42 avec les molécules du CMH classe II qui jouent un rôle de co-récepteur dans l'infection des lymphocytes B par EBV (McShane, Mullen et al. 2003) (figure 12).

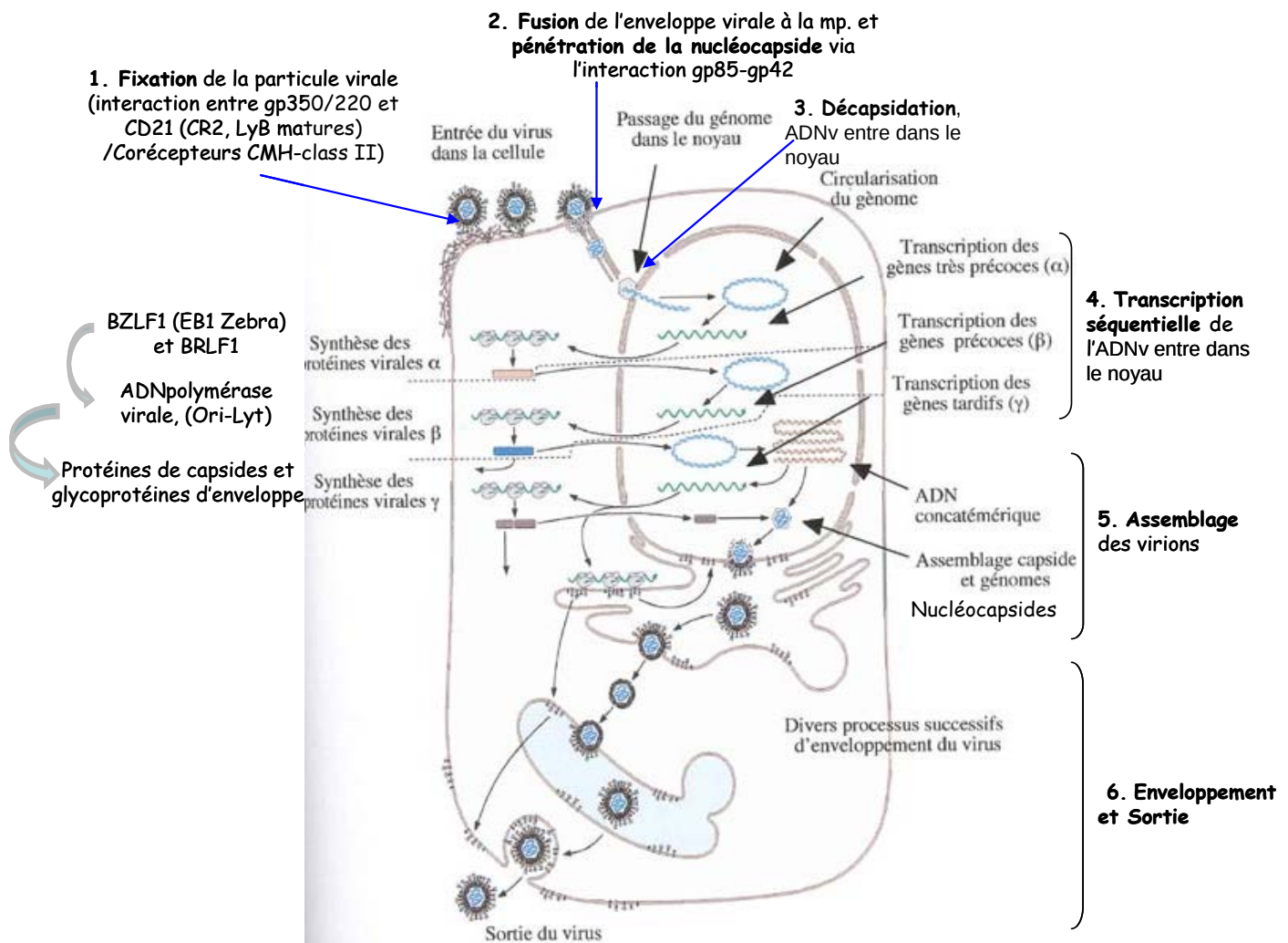


Figure 12: Etapes cellulaires de l'infection par EBV. 1. Fixation du virus ; 2. Fusion des enveloppes virales et cellulaires ; 3. Décapsidation et circularisation ; 4. Transcription séquentielle des gènes viraux ; 5. Assemblage des virions ; 6. Enveloppement et sortie (ADNv: ADN viral). Schéma réalisé par Astrid Lerouxel, source: <http://www.unilim.fr/theses/2003/sciences/2003limo0017/these.html>

La nucléocapside est transportée jusqu'à la membrane nucléaire, puis dégradée. Après décapsidation, le génome viral, sous forme linéaire, est transporté dans le noyau. Rapidement, le promoteur Wp permet l'expression des protéines EBNA2 et EBNA-LP (4 heures après l'infection). En effet, ce promoteur contient un enhancer spécifique des cellules lymphoïdes et ne nécessite pas de protéines virales en *trans* pour fonctionner. Quelques heures plus tard, l'ensemble des protéines EBNA3 et l'oncogène majeur d'EBV, la protéine LMP1, sont exprimés (environ 12 heures après l'infection).

Vingt heures après le début de l'infection, quelques génomes viraux se circularisent. Les génomes viraux linéaires ne seront pas répliqués et disparaîtront au fil des divisions cellulaires, alors que l'ADN viral circularisé sera répliqué en même temps que les chromosomes cellulaires au

cours de la phase S. A ce moment là, toutes les protéines EBNA et la protéine LMP1 sont exprimées, ce qui complète le processus d'immortalisation. Le promoteur Cp des gènes EBNA prend alors le relais, probablement lorsque la protéine EBNA2 est exprimée à un niveau suffisant. En effet, il existe dans ce promoteur des enhancers spécifiques d'EBNA2. On observe alors l'expression des protéines LMP2, et des ARN viraux, EBER et BART, qui marquent l'établissement complet de la latence de type III et l'obtention d'une lignée lymphoblastoïde immortalisée.

Au terme de l'infection, le nombre d'épisomes viraux par cellule est en moyenne de 10 à 100 copies et reste stable. Des copies identiques des épisomes sont transmises dans chaque cellule fille issue de la division cellulaire. Dans certains cas (assez rares), le génome viral peut s'intégrer au génome cellulaire. En effet, des formes intégrées et épisomiques semblent pouvoir coexister dans une même cellule.

3. Entrée de EBV dans l'hôte

In vivo, la primo-infection par EBV se fait le plus souvent par la salive. Ceci fait donc des cellules épithéliales de l'oropharynx et/ou des amygdales un des premiers types cellulaires au contact du virus. L'infection de ces cellules épithéliales par EBV a été clairement démontrée *in vitro* (Chang, Tung et al. 1999; Speck and Longnecker 2000; Tugizov, Berline et al. 2003; Shannon-Lowe, Neuhierl et al. 2006) et, est retrouvée *in vivo* à travers des pathologies comme le CNP et la leucoplasie orale chevelue (Henle and Henle 1970; Greenspan, Greenspan et al. 1985). Cependant, on ne sait pas si elles sont effectivement la "porte d'entrée" du virus dans l'organisme. En effet, les muqueuses pouvant être en contact avec la salive contaminée sont très infiltrées de lymphocytes, ce qui pourrait permettre un contact direct entre EBV et des lymphocytes B à ce niveau. Ainsi plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer l'entrée du virus dans l'organisme (figure 13) :

- EBV infecte d'abord certaines cellules épithéliales, ce qui entraîne un foyer de réplication lytique et donc un relargage important de virions qui peuvent ainsi infecter les lymphocytes B circulants près de la muqueuse (figure 13A).
- EBV infecte directement des cellules B qui affleurent au niveau des muqueuses (figure 13B) de façon complètement indépendante des cellules épithéliales, ou bien en coopération avec celles-ci, c'est-à-dire, que les quelques cellules B infectées en premier lieu permettent (par contact cellulaire) une infection efficace des cellules épithéliales, qui relarguent alors une plus grande quantité de virions qui vont, à leur tour, infecter majoritairement et massivement les lymphocytes B circulants.

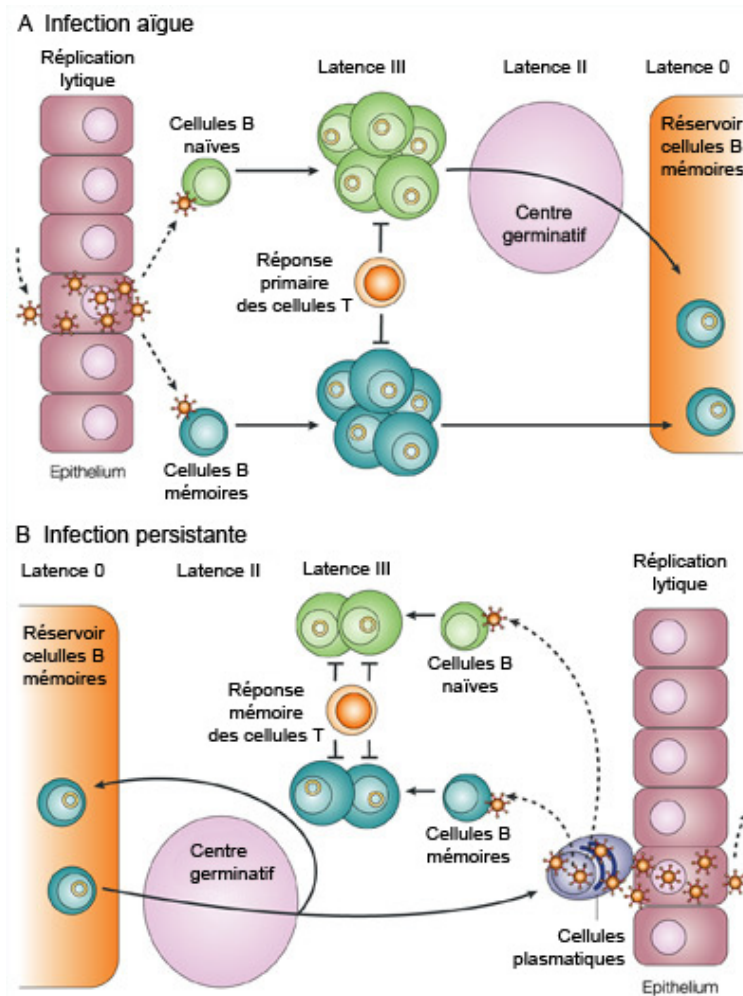


Figure 13: Modèle de l'infection *in vivo* par EBV. A. Infection aiguë. B. Infection persistante. (Young and Rickinson 2004).

A partir de là, le virus se répand à travers les tissus lymphoïdes sous la forme de cellules B infectées et proliférantes (latence III – (Kurth, Spieker et al. 2000)). Beaucoup de ces cellules sont détruites par la réponse primaire des cellules T spécifiques des antigènes de latence III qui apparaissent. De plus, ce programme de latence semble intrinsèquement sensibiliser les cellules B infectées à la réponse cytotoxique des cellules T en augmentant, *via* LMP1, l'expression du récepteur de mort CD95 (Le Cloennec, Youlyouz-Marfak et al. 2006). Mais certaines réussissent à échapper à cette réponse immunitaire T en diminuant l'expression de leurs antigènes et établissent alors un réservoir viral stable à travers les cellules B mémoires où tous les antigènes viraux seront éteints (latence 0 – (Babcock, Hochberg et al. 2000; Hochberg, Souza et al. 2004)). Pour arriver à ce résultat, deux possibilités sont envisagées. La première part du principe que, *in vivo*, les cellules B naïves sont les cibles principales du virus lors d'une nouvelle infection. Dans ce scénario, la transformation virale conduit les cellules B naïves vers le stade mémoire en mimant

les processus physiologiques de maturation antigène-dépendante des cellules B au sein des tissus lymphoïdes (figure 14).

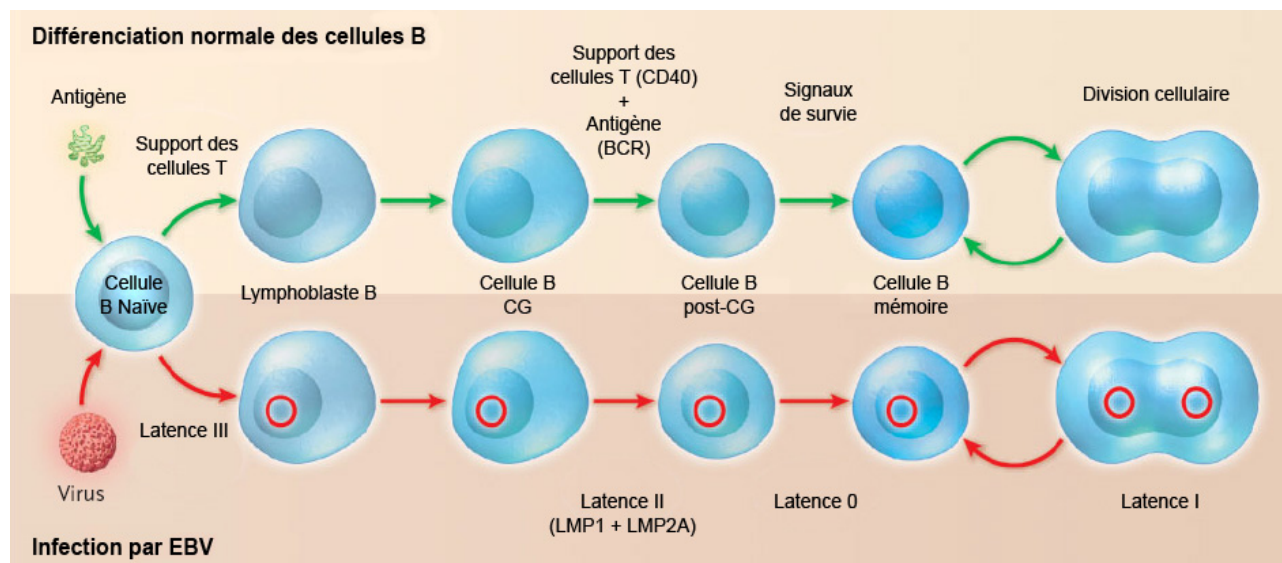


Figure 14: L'infection par EBV mime les étapes de la maturation physiologique des lymphocytes B *in vivo*. EBV infecte des cellules B naïves qui sont à l'état quiescent dans les tissus lymphoïdes de la cavité oropharyngée, et exprime un programme de latence III qui active ces cellules. Elles deviennent alors des lymphoblastes en prolifération. Au cours d'une réponse immune normale, ces lymphoblastes cessent ensuite de proliférer, sont sélectionnés au sein des centres germinatifs (cellules B CG) grâce aux signaux délivrés par l'antigène lui-même (*via* sa fixation au BCR) et par les lymphocytes T helper correspondants (notamment *via* l'interaction CD40L/CD40). Ce processus peut également être mimé par EBV lorsqu'il passe de la latence III à la latence II (LMP1 et LMP2A miment en partie les signaux activés respectivement par CD40 et le BCR). Ensuite les cellules sélectionnées sortent des CG (cellules B post-CG) et peuvent survivre à long terme dans l'organisme en se transformant en lymphocytes B mémoires circulant. Ce passage dans la circulation périphérique se traduit par une extinction de l'expression de toutes les protéines de latence: le virus passe à une latence 0. De façon occasionnelle, les cellules B mémoires sont amenées à se diviser pour maintenir un nombre stable de cellules dans le réservoir. Quand la cellule est infectée, EBV réexprime alors uniquement EBNA1 afin de maintenir son génome dans les 2 cellules filles: ce programme correspond à la latence I. CG : centre germinatif ; CD40L : CD40 Ligand ; BCR : B-Cell Receptor. (Hochberg, Souza et al. 2004).

Ceci implique un processus d'hypermutation somatique pendant le passage au travers du centre germinatif. Cependant, cela reste difficile à réconcilier avec le fait que les cellules B infectées par EBV dans les amygdales des patients souffrant d'une mononucléose infectieuse (MI) se situent dans les zones extrafolliculaires (donc pas dans les centres germinatifs) et ne comportent pas d'hypermutation prononcée dans les clones en multiplication. Une vue alternative considère l'infection de cellules B mémoires préexistantes comme voie directe. Ceci est cohérent avec l'étude d'amygdales des patients atteints de MI, mais laisse inexpliquée la disparition apparente des cellules B naïves infectées.

Une fois cette phase aiguë de l'infection passée, le réservoir viral est définitivement installé. Toutefois, ce réservoir de cellules B mémoires infectées par EBV est sujet au même contrôle physiologique que les cellules non infectées concernant la migration des cellules B

mémoires ainsi que leur différenciation (Laichalk, Hochberg et al. 2002). En effet, occasionnellement ces cellules infectées peuvent être recrutées dans les centres germinatifs, ce qui entraîne l'activation de différents programmes de latence (le transit dans le centre germinatif semble juste activer la latence I, alors que la sortie est liée à l'activation de la latence de type II – (Babcock, Hochberg et al. 2000)). Après quoi, ces cellules peuvent revenir dans le réservoir en tant que cellules mémoires ou bien subir la différenciation vers le stade de plasmocyte. Dans ce cas, les cellules se dirigent probablement vers des muqueuses de l'oropharynx et activent leur cycle lytique au cours de la différenciation. Les virions produits à cet endroit peuvent engendrer des foyers de réplication virale en infectant des cellules épithéliales permissives. Cela permet alors un relargage à bas bruit de particules virales infectieuses dans la cavité oropharyngée, ainsi que de nouvelles infections transformantes (latence III) de cellules B naïves ou mémoires. Ces nouvelles infections permettent peut-être de refournir des cellules mémoires infectées dans le réservoir viral, mais elles sont plus probablement détruites par la réaction mémoire des cellules T anti-EBV dorénavant présente.

4. Pathologies associées à EBV

EBV est associé à un très large spectre de pathologies bénignes et malignes. EBV est, en effet, le premier virus tumoral humain décrit. Il a depuis été impliqué dans de nombreuses pathologies malignes d'origine cellulaire principalement B mais également épithéliale, et lymphocytaire (NK ou T) aussi bien chez l'hôte immunodéprimé qu'immunocompétent. L'expression des protéines virales dans les tissus infectés conduisent à des altérations cellulaires qui contribuent à ces pathologies (tableau III).

Tableau III. Pathologies associées à EBV**Pathologies Bénignes**

- Mononucléose Infectieuse - Infection Chronique Active - Leucoplasie Orale Chevelue

Pathologies Malignes

Hôte Immunodéprimé		
Pathologies cellulaires B	<i>Immunodéficience Acquisée</i>	- Lymphome cellulaire B associé au SIDA - Désordre Lymphoprolifératif Post-Transplantation - Granulomatose Lymphomatoïde - Lymphome cellulaire B associé au Méthotrexate
	<i>Immunodéficience Congénitale</i>	- Lymphomes cellulaires B associés à l'Immunodéficience Sévère Combinée - Lymphomes cellulaires B associés au syndrome de Wiskott-Aldrich - Lymphomes cellulaires B associés au désordre Lymphoprolifératif lié à l'X
Pathologie mésenchymale		- Leïomyosarcome

Hôte immunocompétent	
Pathologies cellulaires B	- Lymphome de Burkitt - Lymphome de Hodgkin classique
Pathologies cellulaires T	- Lymphome cellulaire NK/T extranodal, de type Nasal - Lymphomes cellulaires T des syndromes hémophagocytiques associés au virus
Pathologies épithéliales	- Carcinome Nasopharyngé non-glandulaire - Carcinome de type Lymphoépithéliale (Salivaire, Thymique, Pulmonaire) - Carcinome Mammaire - Carcinome Hépatocellulaire
Pathologie mésenchymale	-Sarcome associé aux cellules Dendritiques Folliculaires

II. Réponse immunitaire dirigée contre EBV

A. Réponse humorale

Afin de mieux comprendre le développement de la réponse humorale, nous allons considérer séparément les événements survenant durant l'infection primaire de ceux observés en phase d'infection persistante (phase de latence).

1. Réponse humorale à l'infection primaire

Lors de la primo-infection, la réplication du virus dans les cellules épithéliales et dans les lymphocytes B entraîne une réponse immune humorale, dirigée d'abord contre les antigènes du cycle lytique, puis contre les antigènes de la phase de latence. L'étude des patients atteints de MI apporte la plupart des informations disponibles concernant la réponse anticorps primaire à EBV (Pedneault, Lapointe et al. 1996).

La plupart des patients diagnostiqués au cours de la phase aiguë de la mononucléose présente déjà un titre conséquent en anticorps IgM anti-VCA, et un taux croissant d'IgG anti-VCA et -EA (le plus souvent du compartiment D¹). La réponse IgM anti-VCA (dirigée contre les antigènes de capside) disparaît par la suite, soit durant la convalescence ou dans les quelques mois suivants, alors que le titre d'IgG anti VCA atteint un pic puis peut légèrement chuter, durant les mois qui suivent, jusqu'à atteindre un niveau stable. Elles persisteront toute la vie, témoignant d'une infection ancienne.

La réponse IgG anti-EA chute généralement plus rapidement et à des taux plus faibles que les IgG anti-VCA, et soit elle devient indétectable soit elle se stabilise à un niveau très faible (Henle, Lennette et al. 1979). Le niveau des IgG anti-EA-D (*Diffuse component of Early Antigens*)¹ est inconstant, apparaissant dans 60 à 80 % des cas de primo-infection de manière fugace. Les IgG anti-EA-R (*Restricted component of Early Antigens*)² sont rarement présents dans la phase aiguë de la mononucléose infectieuse, ils sont produits pendant la convalescence et sont retrouvés dans les infections chroniques et dans le lymphome de Burkitt. Quant à la réponse anti-LMA (*Late Membrane Antigen*), elle est surtout dirigée contre la gp85 au cours de la mononucléose infectieuse.

Les anticorps neutralisant le virus durant la MI aiguë ont tendance à être présent à un faible titre, et semblent dépendants du complément, tels les anticorps dirigés contre l'antigène

¹ Antigènes diffus dans le cytoplasme et le noyau

² Antigènes localisés dans le cytoplasme

gp350, cible majeure de neutralisation, qui appartiennent alors de manière prédominante à la classe des IgM. Le titre en IgG se développe relativement plus tard durant la maladie. Ces anticorps, produits plus tardivement, vont alors se fixer sur les cellules qui produisent les particules virales et les rendre sensibles à la lyse par cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante (ACDC).

La réponse humorale contre les protéines EBNA est une autre caractéristique particulière de la sérologie de la MI. Les anti-EBNA sont tardifs et n'apparaissent que six mois environ après la primo-infection. Ils témoignent du développement d'une réaction d'immunité cellulaire contre les cellules infectées par EBV, les EBNA n'étant accessibles qu'après destruction cellulaire par les lymphocytes T cytotoxiques. Chez la plupart des patients en phase aiguë de la maladie on trouve une réponse IgG à EBNA-2, alors que la réponse IgG à EBNA-1 n'est généralement détectable qu'à la convalescence (Henle, Henle et al. 1987). Les anticorps anti-EBNA1 apparaissent plus tardivement que les anti-EBNA2 mais persistent toute la vie, à la différence des anti-EBNA2 qui n'apparaissent que de manière transitoire. Des anticorps capables de reconnaître la région riche en motifs répétés Glycine-Alanine (GAR) d'EBNA-1 ont été détectés dans la fraction IgM du sérum de patients en phase aiguë de MI par immunoblotting (Rhodes, Rumpold et al. 1987), mais il semble actuellement qu'ils soient le reflet d'une cross-réactivité anticorps (également détectable contre les auto-antigènes) survenant de la stimulation polyclonale du système cellulaire B (voir plus loin). Les réponses anticorps à LMP-1 et LMP-2 n'ont pas encore été retrouvés chez le patient mononucléotique et, en fait, ne sont détectables que chez une faible part des porteurs sains même en utilisant les techniques de détection les plus sensibles (Frech, Zimmer-Strobl et al. 1990; Meij, Vervoort et al. 1999).

En plus des anticorps spécifiques anti-EBV, on observe, au cours de la phase aiguë de la mononucléose infectieuse, une augmentation des taux sériques des immunoglobulines IgM, IgG et IgA, qui peut s'expliquer par l'activation polyclonale des lymphocytes B par EBV (Henle, Lennette et al. 1979). Une telle activation polyclonale des B peut être soit directement conduite par l'infection des cellules B (Garzelli, Taub et al. 1984) ou induite par une réponse des cellules T helper (Th) exagérée, comme on a pu le voir dans d'autres cas d'infections virales aiguës (Recher M., 2004). On note aussi l'apparition d'anticorps hétérophiles et d'auto-anticorps dans 70-80 % des cas. Ces anticorps hétérophiles sont spécifiques de la mononucléose infectieuse mais non de EBV. Ils sont souvent absents chez les très jeunes patients. Ce sont des IgM qui ont la propriété

d'agglutiner les hématies de mouton, de cheval et de boeuf et sont détectés par la réaction de Paul-Bunnell-Davidsohn (monospot). Ils apparaissent dès le début des signes cliniques et disparaissent en 1 à 3 mois. D'une manière générale, le profil de la réponse anticorps peut être représenté comme sur la figure suivante (Figure 15), parallèlement aux événements virologiques survenant dans le même temps.

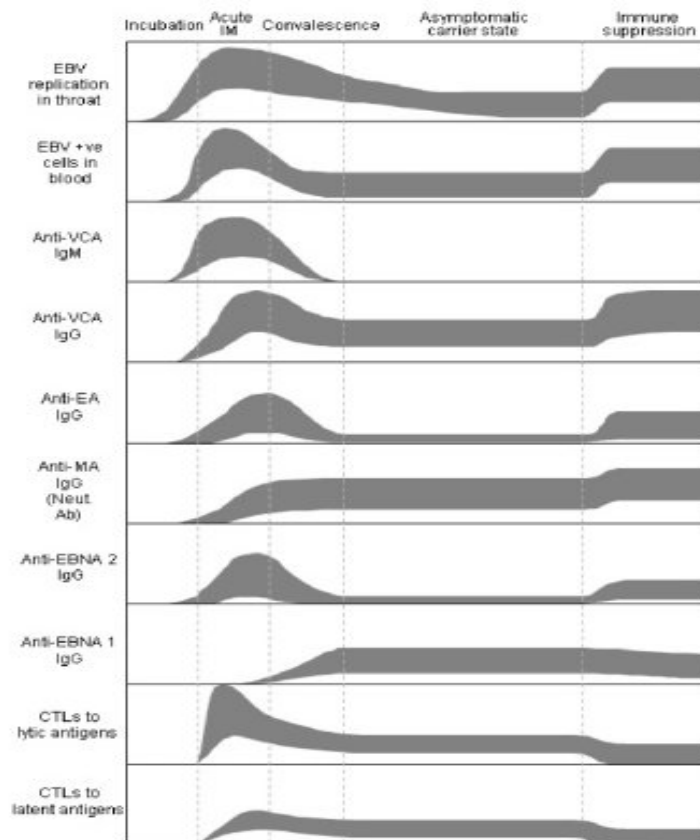


Figure 15: Paramètres de l'équilibre EBV-hôte durant les différentes phases de l'infection : phase d'incubation, phase symptomatique et phase de convalescence, de la mononucléose infectieuse, durant le portage viral asymptomatique, et suivant l'imposition d'une thérapie immunosuppressive sur un porteur sain préalablement infecté. Pour chaque paramètre, les bandes ombrées représentent la large gamme dans laquelle la plupart des personnes se trouvent ; quand la bande va au-delà de la base, cela signifie que les réponses en question ne sont détectables que chez certains, mais pas tous les individus. (Fields in virology 5^{ème} édition, 2007)

2. Réponse humorale durant la phase de latence

Les porteurs sains du virus sont constitutivement IgG anti-VCA+, anti-gp350 neutralisant+ et anti-EBNA-1+ (Henle, Lennette et al. 1979). Les titres peuvent différer nettement entre les individus, et restent assez stables dans le temps. Un nombre significatif de porteurs de virus au long terme possèdent des réactivités additionnelles, par exemple aux EA (plus fréquemment du compartiment R) ou à une ou plusieurs des protéines EBNA. Le profil sérologique, cependant, peut être un marqueur utile d'une infection passée. Comme les patients déficients en cellules B n'acquièrent pas EBV naturellement, nous n'avons pas d'informations directes concernant l'importance biologique de la réponse anticorps (Faulkner, Burrows et al. 1999). Les anticorps anti-VCA, EA, et EBNA ciblent des complexes intracellulaires et, cependant, il est peu probable qu'ils jouent un rôle effecteur majeur dans le contrôle *in vivo* des cellules infectées par le virus. Les

anticorps anti-MA/anti-gp-350, peuvent se fixer sur la surface des cellules en infection lytique avancée et également aux virions, et ont la capacité de neutraliser un large spectre de souches d'EBV. De tels anticorps peuvent donc aider à prévenir la recrudescence de la virémie chez l'hôte présentant une infection persistante mais aussi offrir une protection contre la surinfection due à d'autres souches de virus oralement transmissibles.

La réponse humorale n'a cependant, que peu d'efficacité sur le contrôle de l'infection, comme en témoigne l'absence d'aggravation de la primo-infection chez les sujets agammaglobuliniques. La réponse cellulaire joue par contre un rôle primordial et c'est cette dernière que nous allons maintenant détailler.

B. Réponse immune cellulaire

EBV a été un modèle d'importance pour l'étude de la réponse cellulaire à l'infection virale chez l'homme. Une particularité clef consiste en l'ubiquité du virus dans la population humaine, sa stabilité génétique chez l'hôte infecté, sa forte immunogénicité, et la possibilité de suivre à la fois la phase primaire et mémoire de la réponse via des études prospectives chez le patient mononucléosique. Bien que beaucoup des règles de bases gouvernant la réponse cellulaire induite par EBV furent établies chez des porteurs sains de virus (Rickinson and Moss 1997), une image plus complète émerge aujourd'hui incluant les événements de l'infection primaire (Khanna and Burrows 2000; Hislop, Rensing et al. 2007).

1. Réponse immune cellulaire innée

Les cellules *Natural Killer* (NK) sont une composante clef de la réponse immune précoce à de nombreux agents infectieux. Il existe, par exemple, des preuves d'un rôle important de ces cellules dans le contrôle précoce de l'infection à CMV à la fois chez l'homme et la souris (Braud, Tomasec et al. 2002; Vidal and Lanier 2006). La lymphocytose que l'on observe typiquement dans le sang de patients durant la phase aiguë de la MI, bien que principalement composée de cellules T CD8+, contient néanmoins un nombre significatif de cellules NK activées (Williams, McAulay et al. 2005) capables de tuer les cibles NK-sensibles dans des essais *ex-vivo* de cytotoxicité (Strang and Rickinson 1987; Tomkinson, Maziarz et al. 1989). L'expansion des cellules NK activées est visible dans le sang des patients en phase aiguë de MI, et selon quelques études, le nombre de cellules NK serait inversement proportionnel à la charge virale (Williams, McAulay et al. 2005). Les études *in vitro* démontrent que les cellules NK peuvent inhiber la transformation EBV-induite des cellules B au repos si on les ajoute dans les premiers jours de l'infection, et ce en partie grâce à la

libération d'IFN- γ (Lotz, Tsoukas et al. 1985). Les cellules NK des amygdales sont, en effet, activement productrices d'IFN- γ (les cellules NK des amygdales et des ganglions lymphatiques produisent 5 fois plus d'IFN- γ que les NK du sang périphérique), et inhibitrices de la transformation *in vitro*, notamment si on réalise une co-culture avec des lymphocytes B infectés par EBV en présence de cellules dendritiques (CDs) sécrétrices d'IL-12 (nécessaire à l'activation et à la prolifération des NK) (Ferlazzo and Munz 2004; Strowig, Brilot et al. 2008). Les résultats de cette étude suggèrent donc que les cellules NK spécialisées des amygdales, site d'entrée mucosal de EBV, peuvent être efficacement stimulées par les CD activées par EBV et ainsi limiter la transformation induite par EBV jusqu'à ce que s'établisse le contrôle immunitaire EBV-spécifique par les autres composants du système.

Néanmoins, les preuves cliniques sont plutôt en défaveur du rôle des NK dans le contrôle de la transformation *in vivo*, puisque chez les receveurs de cellules souches déplétées en cellules T, les lymphoproliférations liées à EBV apparaissent plus communément dans les 3 à 6 mois suivant la transplantation, temps durant lequel le pool de cellules NK est recouvré alors que le patient est encore profondément déficient en cellules T (O'Reilly, Small et al. 1997). Les cellules NK peuvent également jouer un rôle important dans le contrôle de l'infection lytique, puisque la réduction de l'expression des molécules HLA de classe I à la surface cellulaire, que l'on observe dans les cellules infectées *in vitro*, est accompagnée par une augmentation de la sensibilité de reconnaissance des cellules NK (Pappworth, Wang et al. 2007). De manière intéressante, EBV n'a encore montré aucune stratégie d'évasion aux cellules NK contrairement aux nombreuses stratégies aujourd'hui connues chez l'homme et la souris en réponse au CMV (Blazar, Patarroyo et al. 1980; Braud, Tomasec et al. 2002; Vidal and Lanier 2006), agent pour lesquels la réponse NK semble particulièrement importante.

2. Réponse immune cellulaire adaptative

a) Réponse cellulaire T-CD8+

Le syndrome mononucléosique, rencontré dans le cas de la primo-infection à EBV, se caractérise par une hyperlymphocytose brutale (jusque 5 à 20 fois plus) et réversible, composée majoritairement de lymphocytes T CD8 cytotoxiques. Cette hyperlymphocytose est essentiellement liée à l'expansion de quelques clones reconnaissant spécifiquement des épitopes

d'EBV. Cette distribution caractéristique des sous types V β montre l'emploi d'un motif oligoclonal des récepteurs des cellules T (TCR) (Callan, Tan et al. 1998; Hoshino, Morishima et al. 1999).

La réponse lymphocytaire T cytotoxique est dirigée à la fois contre les antigènes de latence (les différents EBNA, LMP1, LMP2), les antigènes lytiques (BRLF1, BALF2, BMRF1, BMLF1, BZLF1) et les antigènes structuraux (gp 350, gp 85 et gp 110) du virus. Des essais réalisés *ex vivo* avec des effecteurs issus de patients en phase aiguë de MI furent capables de détecter une cytotoxicité contre des épitopes définis de protéines de la phase de latence d'EBV (Steven, Leese et al. 1996), mais les marquages avec des tétramères HLA classe I montrent qu'une telle réponse aux épitopes de latence ne compte que pour 1% à 5% du pool total des CD8+ (Callan, Tan et al. 1998). La réponse primaire est, en fait, nettement dominée par des lymphocytes T CD8+ reconnaissant les antigènes lytiques (Steven, Annels et al. 1997; Hislop, Annels et al. 2002). L'équipe de Callan a démontré par l'utilisation de tétramères que 5 à 50% de l'ensemble des lymphocytes T CD8+ étaient dirigés contre un seul épitope d'antigène lytique au cours de la primo-infection.

Les groupes de cibles antigéniques d'EBV sont ordonnés selon une hiérarchie caractéristique de leur immunodominance pour les cellules T CD8+. Ainsi, parmi les protéines de latence, les plus fortes réponses sont presque toujours dirigées contre des épitopes dérivés de la famille d'EBNA-3A, -3B, -3C, accompagnées par des réponses contre les épitopes sous-dominants, souvent dérivés de LMP-2, quelques fois d'EBNA-1, mais que très rarement de EBNA-2, EBNA-LP ou LMP-1. La même hiérarchie est manifeste durant la réponse primaire chez les patients avec une MI (Steven, Leese et al. 1996; Callan, Tan et al. 1998), chez les jeunes enfants après l'infection primaire asymptomatique (Tamaki, Beaulieu et al. 1995), et dans la réponse mémoire chez les porteurs de virus au long terme (Khanna, Burrows et al. 1992; Murray, Kurilla et al. 1992).

Par ailleurs, parmi les protéines du cycle lytique, les plus fortes réponses sont presque toujours dirigées contre les épitopes dérivés des antigènes précoces-immédiats (BZLF1, BRLF1) et contre une sous partie d'antigènes précoces (BMLF1, BMRF1, BALF2, BALF5), alors que les protéines structurales tardives du virus n'induisent qu'une très faible réponse quand elle a lieu (Scotet, David-Ameline et al. 1996; Steven, Annels et al. 1997; Khanna, Moss et al. 1999; Pudney, Leese et al. 2005). Ceci reflète directement, et de manière intéressante, l'efficacité avec laquelle ces différentes protéines du cycle lytique sont *processées* et présentées à la surface des cellules infectées en phase lytique (Pudney, Leese et al. 2005). Cela suggère que, après le *priming* initial de la réponse (probablement par des cellules dendritiques chargées en antigènes dans le tissu

lymphoïde de l'oropharynx), l'expansion épitope-spécifique massive est conduite par l'engagement direct des cellules T CD8+ contre les cellules en infection lytique.

Des études prospectives sur des patients ayant une MI ont permis de suivre l'évolution de la réponse T CD8+ dans le temps. Les cellules T effectrices activées, rencontrées durant la phase aiguë de la maladie, expriment peu *bcl-2* et semblent particulièrement sensibles à l'apoptose si elles sont privées de stimulation antigénique (Moss, Bishop et al. 1985; Akbar, Borthwick et al. 1993; Callan, Tan et al. 1998). Les très fortes réponses spécifiques des antigènes lytiques sont ainsi lourdement éliminées après la MI, et la quantité totale des cellules T CD8+ du sang chute rapidement. De plus, le pourcentage de représentation de ces réactivations dans le pool de cellules T CD8+ circulantes décroît graduellement, tombant de 20% à 50% durant la phase aiguë à 1% à 5% dès les deux premières années; au moins une réponse à un épitope lytique bien défini disparaît entièrement après la MI (Hislop, Annels et al. 2002).

La cinétique de la réponse spécifique aux antigènes de latence diffère significativement. Ces populations s'accroissent bien moins fortement durant la phase aiguë de la MI, leur pourcentage de représentation dans le pool de cellules T circulantes augmente légèrement durant la convalescence, puis chute doucement vers des niveaux stables autour de 0,5% à 2% dans les deux premières années. Quelques une des plus faibles réactivations aux épitopes de latence sont en fait indétectables durant la phase aiguë mais apparaissent plus tard. Par conséquent, la composition de la mémoire à long terme, peut différer de manière significative de celle rencontrée dans la réponse aiguë de la primo-infection (Callan, Tan et al. 1998; Callan, Fazou et al. 2000; Catalina, Sullivan et al. 2001; Hislop, Annels et al. 2002; Woodberry, Suscovich et al. 2005). Ces contrastes dans la taille et la maturation des cinétiques de réponses aux antigènes lytiques versus de latence sont illustrés figure 16.

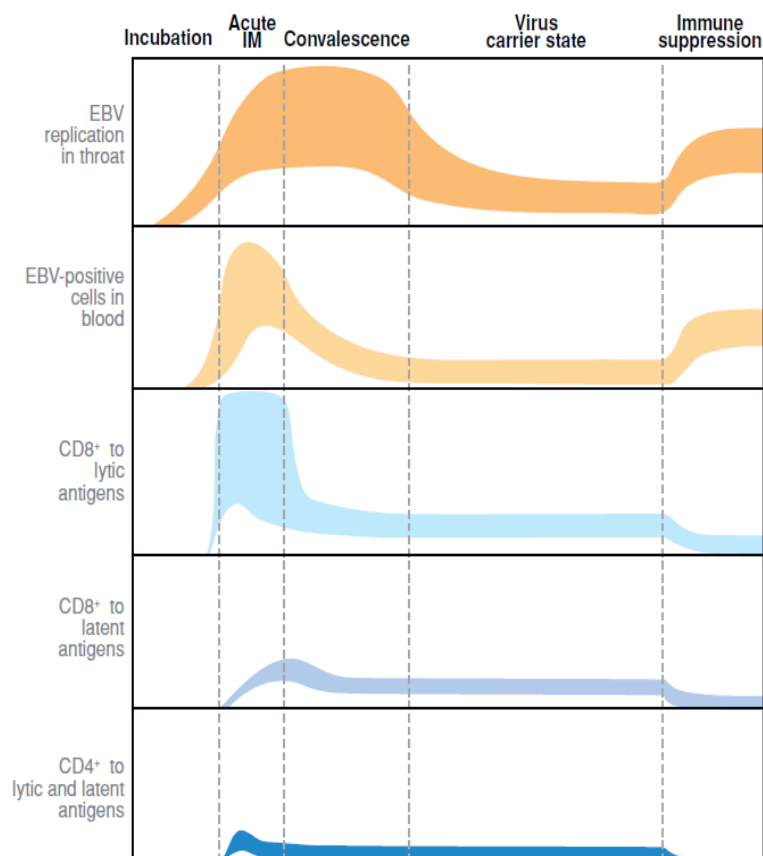


Figure 16: Changements temporels de la réponse cellulaire au cours de l'infection virale. Variation de la réplication virale dans la gorge et selon la charge en cellules B en infection latente dans le sang, durant la phase aiguë et la convalescence de la MI, et dans le cas de l'infection à long terme. Les changements dans la magnitude de la réponse T sont montrés avec la même échelle de temps. Sont également représentés les effets de la suppression des cellules T sur ces paramètres de l'équilibre virus-hôte comme on peut le voir chez les patients après une transplantation (Hislop, Rensing et al. 2007)

Des différences phénotypiques intéressantes sont également visibles entre les deux catégories de réponses CD8 induites par EBV. Durant la phase aiguë de la MI, des cellules T CD8+ induites par EBV dans le répertoire naïf CCR7+, CD45RA+ de l'hôte se sont accrues pour devenir des cellules effectrices CCR7-, CD45RO+. Comme la réponse mûrit à partir de populations mémoires, les cellules spécifiques des épitopes lytiques dans le sang tendent à rester dans le compartiment des cellules *effectrices mémoires* CCR7-, CD45RO+ (avec certaines cellules changeant leur isotype CD45 pour acquérir le phénotype CCR7-, CD45RA+). Les réactivations des épitopes latents sont plus équitablement distribuées entre les effecteurs mémoires CCR7-, CD45RO+, et les mémoires centrales CCR7+, CD45RO+ (Hislop, Gudgeon et al. 2001; Catalina, Sullivan et al. 2002; Hislop, Annels et al. 2002). L'expression du CCR7 apporte aux cellules mémoires centrales la capacité de circuler de nouveau dans les tissus lymphoïdes, incluant ceux de l'oropharynx, site majeur d'infection par EBV, alors que les cellules mémoires effectrices sont capables d'émigrer des tissus périphériques (Sallusto, Lenig et al. 1999). Durant la convalescence, la réponse spécifique aux antigènes de latence est la première à acquérir de nouveau le marqueur CCR7 et la première à s'accumuler dans les amygdales, alors que les cellules mémoires spécifiques des épitopes lytiques acquièrent le CCR7 plus lentement et en plus faible quantité, et apparaît

comme plus lente à coloniser les amygdales (Pudney, Leese et al. 2005; Woodberry, Suscovich et al. 2005).

Ces différences peuvent aider à expliquer pourquoi l'infection latente du système de cellules B est sous contrôle plus rapidement après la MI, alors que la réplication virale et le relargage à partir de l'oropharynx est si prolongée. Chez les porteurs de virus à long terme, les fréquences d'antigènes lytiques et surtout latents sont significativement plus élevées dans les amygdales que dans le sang, et pris ensemble peuvent compter pour 20% des cellules T CD8⁺ des amygdales (Pudney, Leese et al. 2005; Woodberry, Suscovich et al. 2005). Au moins deux facteurs peuvent contribuer à cette accumulation : la présence d'antigènes locaux conduite par l'infection virale persistante et le phénotype migratoire imposé aux cellules T associées à la muqueuse au moment du *priming*.

b) Réponse cellulaire T-CD4⁺

La réponse cellulaire T CD4⁺ a été bien moins étudiée parce que, contrairement à la très forte expansion des cellules T CD8⁺ induite par l'infection primaire à EBV, le nombre de cellules T CD4⁺ dans le sang de patients MI reste relativement constant (Williams, McAulay et al. 2005), sans preuve majeure d'expansion oligoclonale selon l'analyse des TCR (Maini, Gudgeon et al. 2000). Des tests de sécrétion d'IFN- γ via l'utilisation de peptides, de protéines recombinantes, ou de lysats de cellules infectées comme source d'antigènes ont permis de détecter des cellules T CD4⁺ spécifiques des antigènes lytiques ou de latence dans le sang de patients mononucléotiques (Amyes, Hatton et al. 2003; Precopio, Sullivan et al. 2003; Piriou, van Dort et al. 2004; Woodberry, Suscovich et al. 2005). Les réponses, qui numériquement sont plus petites puisqu'elles représentent moins de 1% du pool de cellules T CD4⁺, tendent à diminuer vers des taux encore plus faibles après la MI. La spécificité précise de la plupart de ces réponses primaires doit encore être identifiée (Figure 16).

De nombreuses études se sont focalisées sur la composition des cellules T CD4⁺ mémoires dans le sang de porteurs de virus. Une étude suggère l'existence d'une certaine hétérogénéité au sein des lymphocytes T CD4⁺ mémoires, dépendante des conditions de persistance de l'antigène. Ainsi, le modèle proposé par Harari (Harari, Vallelle et al. 2005) suggère 3 types de réponses lymphocytaires T CD4 mémoires en fonction du profil de cytokines exprimées: (i) lymphocytes T CD4 IL-2⁺ observés dans le cas où la réponse immunitaire entraîne une clairance de l'antigène; (ii) lymphocytes T CD4 mémoires IL-2⁺, IFN- γ + et IL-2⁺/IFN- γ + retrouvés en cas de persistance de l'antigène en faible quantité ; (iii) lymphocytes T CD4 mémoires IFN- γ + observés en cas de

persistance de l'antigène en forte quantité. Les lymphocytes T CD4 mémoires IL-2+ représenteraient des lymphocytes mémoires à vie longue, les lymphocytes T CD4 IFN- γ + des lymphocytes mémoires effecteurs et les cellules IL-2+/IFN- γ + des lymphocytes T de profil intermédiaire. Les 3 types de lymphocytes T CD4 mémoires seraient retrouvés dans les infections virales chroniques de type EBV (figure 17).

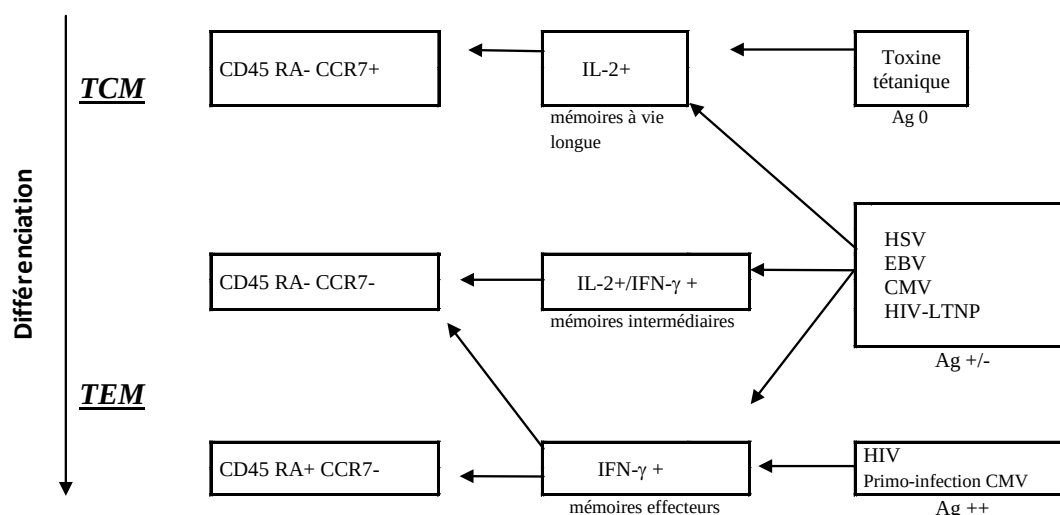


Figure 17: Modèle de différenciation des lymphocytes T CD4 mémoires en fonction du type d'antigène. TCM: lymphocyte T mémoire central; TEM: lymphocyte T mémoire effecteur; Ag: antigène; LTNP: long-term non-progressors. (Harari, Vellelian et al. 2005).

Concernant les réponses spécifiques aux antigènes lytiques, des clones de cellules T CD4+ dirigés contre la protéine précoce immédiate BZLF1 (Adhikary, Behrends et al. 2006), la protéine précoce BHRF1 (Landais, Saulquin et al. 2004), et les deux glycoprotéines tardives, gp 350 et gp110 (Adhikary, Behrends et al. 2006), ont récemment été décrits. De manière intéressante, la réactivation à BHRF1, gp350, et gp110 induit une reconnaissance efficace des LCL en culture semi-permissive (Landais, Saulquin et al. 2004; Adhikary, Behrends et al. 2006). De plus, les cellules T CD4+ spécifiques de gp350 et gp110 peuvent reconnaître des PBMC exposées au virus dans les jours qui suivent directement l'infection, probablement par le *processing* des glycoprotéines de virions, et pourraient bloquer le processus de transformation à ce stade précoce. *In vivo*, cependant, les cibles peuvent aussi bien inclure des cellules répliquant activement le virus que des cellules B récemment infectées. On retrouve en phase de latence des lymphocytes T CD4+ dirigés contre les antigènes lytiques. Ces derniers pourraient représenter une "seconde ligne de défense" contre le virus, susceptible de contrôler sa réplication *in vivo*. Une diminution de la réponse

immune envers les antigènes lytiques pourrait expliquer la réactivation d'un cycle lytique avec libération de virus observée chez l'immunodéprimé (Khanna and Burrows 2000).

Les réponses des T CD4 mémoires aux antigènes de latence ont été particulièrement étudiées en utilisant soit des antigènes isolés ou des pools de peptides comme stimuli *in vitro* des PBMC de donneurs sains et le suivi des réponses par la mesure de la prolifération ou de la sécrétion de cytokines (Munz, Bickham et al. 2000; Steigerwald-Mullen, Kurilla et al. 2000; Leen, Meij et al. 2001; Long, Haigh et al. 2005). L'ensemble de ces données révèle qu'il existe une hiérarchie importante dans l'immunodominance des antigènes de latence qui est cependant différente de la hiérarchie rencontrée pour les cellules T CD8+. La plupart des porteurs du virus ont des réponses mémoires aux épitopes d'une ou deux protéines EBNA-1, EBNA-2 ou EBNA-3C, et bien moins fréquemment, aux épitopes d'EBNA-3A ou aux LMPs. Ces cellules T CD4+ mémoires sont présentes à un taux dix fois moins élevé que les cellules T CD8+ mémoires dans le sang de porteurs de virus, mais peuvent néanmoins être réactivées efficacement *in vitro* pour produire des clones de cellules T CD4+. Ces clones présentent régulièrement un phénotype de type Th1, secrètent de l'IFN- γ (plutôt que de l'IL4 ou de l'IL-10) en réponse à l'antigène, ou à des cellules cibles chargées en peptides, et sont fréquemment cytotoxiques. Cela apporte la possibilité d'un rôle effecteur direct de telles réponses *in vivo* (comme pour les CD8+), ils peuvent reconnaître et tuer des cellules infectées en latence qui expriment de manière endogène l'antigène viral relevant (Morales, Depil et al. 2012).

De ce point de vue, des clones dirigés contre certains épitopes d'EBNA-1 (Paludan, Bickham et al. 2002), EBNA-2 (Khanna, Burrows et al. 1997; Long, Haigh et al. 2005), et EBNA-3C (Long, Haigh et al. 2005), ont été capables *in vitro* de tuer des cibles LCL autologues non manipulées, mais ce n'est pas le cas pour la réponse à d'autres épitopes dans les mêmes protéines (Mautner, Pich et al. 2004; Long, Haigh et al. 2005). Les lymphocytes T CD4+ jouent également un rôle important dans le contrôle de l'infection durant la phase de latence. Il a été montré que des lymphocytes T CD4+ cytotoxiques pouvaient intervenir dans le contrôle précoce de l'infection et de la transformation des lymphocytes B par EBV (Nikiforow, Bottomly et al. 2001). Les lymphocytes T CD4 agiraient donc, non seulement par leurs fonctions *helper* (aide aux lymphocytes T CD8), mais aussi par leurs fonctions cytolytiques propres (le mécanisme reste discuté : utilisation de la voie Fas/Fas-L, système perforine-granzyme, sécrétion de granulysine) (Wilson, Redchenko et al. 1998; Khanolkar, Yagita et al. 2001; Sun, Burton et al. 2002). Dans ce

contexte, l'existence d'une réponse cytotoxique *in vivo* médiée par des lymphocytes T CD4+ CMH II-restreints a été démontrée dans un modèle murin d'infection à LCMV (Jellison, Kim et al. 2005).

L'ensemble de ces données souligne l'importance de (i) l'identification de la gamme complète des épitopes CD4+ de latence pouvant développer des réponses en reconnaissance aux LCL et (ii) pour lesquels, quand une telle réponse se produit, nous avons besoin de savoir comment des protéines de latence endogènes accèdent à la voie du *processing* des molécules HLA de classe II dans les cellules infectées. A ce jour, des preuves indiquent qu'EBNA-1 est délivré à cette voie par une route intracellulaire autophagosomale (Paludan, Bickham et al. 2002), alors que la présentation d'EBNA-2 et EBNA-3C semble nécessiter le transfert intracellulaire et le *processing* dans les cultures de LCL (Taylor, Long et al. 2006).

Concernant la réponse lymphocytaire T à EBV, l'immunodominance relative des antigènes viraux du cycle lytique ou de la phase de latence, a été représentée selon le schéma de la figure 18.

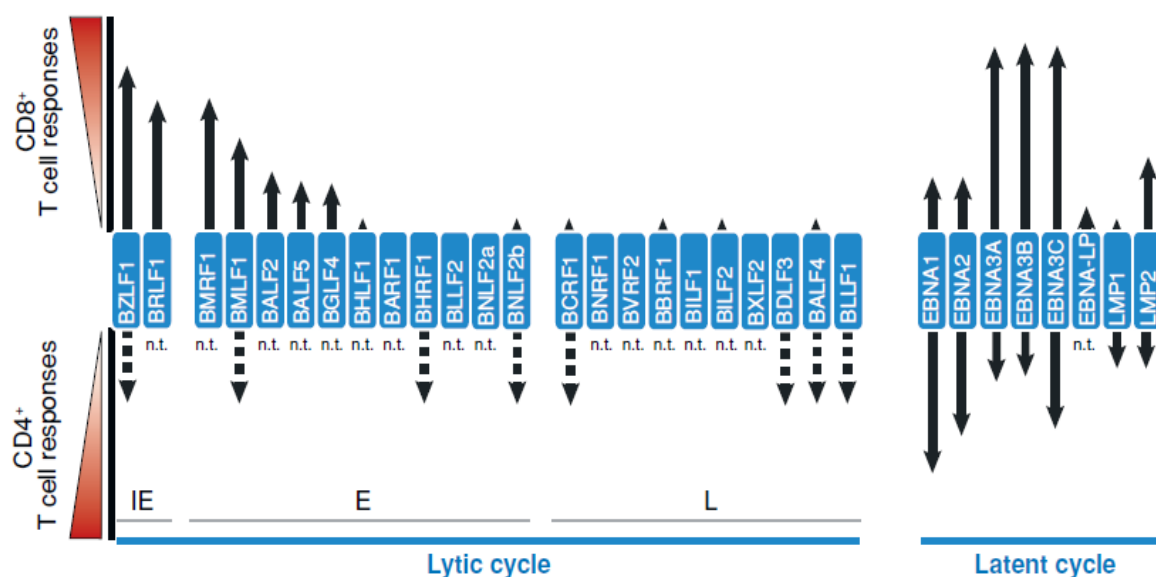


Figure 18 : Représentation schématique de l'immunodominance relative des protéines d'EBV. Chez le porteur viral sain, des protéines représentatives immédiatement précoces (IE), précoces (E), et tardives (L) du cycle lytique et des huit protéines de latence, pour les réponse cellulaires des T CD4 et T CD8. Les flèches en pointillés indiquent que la réponse des T CD4+ a été observée pour cette protéine mais que leur immunodominance relative n'est pas encore déterminée. Les protéines non encore testées sont notées n.t. (Hislop, Rensing et al. 2007).

On voit clairement que la réponse des T CD8 domine dans les deux cas, mais également, même si la notion de « hiérarchie d'immunodominance » ne repose pas sur le même principe pour la réponse des T CD4+, que celle-ci reste tout à fait présente et donc réactivable, offrant ainsi des perspectives intéressantes en termes d'immunothérapie.

III. Mécanismes d'échappement au système immunitaire dans les pathologies associées à EBV

A. Mécanismes d'échappement d'EBV au système immunitaire

EBV infecte de manière asymptomatique plus de 90% de la population mondiale et bien qu'il possède une activité transformante évidente *in vitro*, il cause rarement de pathologies malignes *in vivo*. En effet, de même que pour d'autres herpesvirus très proches, il a évolué pour co-exister avec son hôte (Sharp, Raine et al. 1999). Ainsi, malgré une réponse immune puissante à son rencontre, EBV persiste au long de la vie de son hôte notamment de part les stratégies d'évasion au système immunitaire qu'il met en place.

Une grande partie du génome d'EBV est consacrée à l'expression de protéines et d'ARN destinés à contrecarrer la réponse immune de l'hôte.

1. Stratégies moléculaires impliquant les protéines de latences

Alors qu'EBV exprime plus de 80 antigènes durant la phase lytique de réplication, les cellules infectées en phase de latence n'expriment plus que 8 protéines et quelques ARNs non codants. La diminution de l'expression des antigènes est probablement le premier et l'essentiel des mécanismes d'échappement au système immunitaire déployé par EBV au cours de l'infection persistante. En plus de cela, le virus réalise certaines fonctions grâce à ses ARNs non codants. Les BARTs (*BamHI A rightward transcripts*) sont soupçonnés de créer les microARNs d'EBV (Pfeffer, Zavolan et al. 2004) et les EBERs (EBV-encoded RNAs) semblent protéger les cellules infectées de l'apoptose (Nanbo, Inoue et al. 2002). Ils ne peuvent être détectés par les cellules T puisque leur activation nécessite la présentation de petits peptides via les molécules HLA.

EBV réduit encore l'expression des protéines antigéniques selon le stade de différenciation des cellules B infectées (Hochberg, Souza et al. 2004). Alors que les 8 protéines de latences sont en effet retrouvées dans les cellules B naïves des amygdales, les cellules B du centre germinatif n'expriment qu'EBNA1, LMP1 et LMP2 (Babcock, Hochberg et al. 2000). Dans le même ordre d'idée, les cellules B mémoires du sang périphérique n'expriment aucun antigène d'EBV, voire EBNA1 seul durant la prolifération homéostatique (Hochberg, Souza et al. 2004). De ce fait, de telles cellules B mémoires arborant le génome de EBV sans aucune expression de ses protéines représentent très certainement le meilleur site de persistance à long terme pour EBV (Babcock, Decker et al. 1998).

Au-delà d'une expression réduite des protéines virales durant la phase de latence, le nombre même de copies des antigènes d'EBV exprimés et des peptides antigéniques *processés* pour la présentation par le CMH sont également très faibles. L'exemple le plus marquant réside en l'étude d'**EBNA1** qui prévient efficacement sa transcription grâce à son domaine GAR (Glycine Alanine repeats) (Gasser, Hess et al. 2003), ce même domaine inhibe également le *processing* par le protéasome nécessaire à la présentation par le CMH de classe I. **EBNA3C** limite également son expression protéique à un taux très faible, réduisant ainsi le *processing* antigénique et la présentation au CMH de classe I à moins d'un peptide par cellule (Crotzer, Christian et al. 2000). EBV réduit ainsi sa détection non seulement en limitant l'expression des protéines virales, mais aussi en contrôlant le nombre de copies par protéine, source de protection contre le système immunitaire durant la phase de latence (Hochberg, Souza et al. 2004).

Il a été rapportée qu'une autre protéine de latence d'EBV, **LMP1**, était, et ce de manière variable dans des systèmes *in vitro*, directement suppressive pour la réponse cellulaire T-helper ou inductrice d'une réponse T régulatrice et, dans chaque cas, l'effet pouvait être reproduit en utilisant un (Dukers, Meij et al. 2000) ou une série de peptides du domaine hydrophobe de LMP-1 (Marshall, Vickers et al. 2003). Il est généralement accepté que LMP1 médie un grand nombre d'effets immunomodulateurs en *cis* et en *trans*. Il est ainsi concevable que les signaux d'échappement au système immunitaire délivrés par LMP1 protègent les cellules infectées par EBV du contrôle immunitaire quand elles passent par les ganglions lymphatiques. Un ensemble assez remarquable de gènes sont influencés par LMP1, ce qui confirme ses fonctions dans la régulation immune. Parmi ces gènes, on retrouve des chimiokines (CCL17, CCL22) (Takegawa, Jin et al. 2008), des cytokines telles que l'IL-6 et l'IL-10 humaine (Nakagomi, Dolcetti et al. 1994), des molécules d'adhésion (LFA, ICAM, CD18), des molécules de costimulation (CD86, CD80) et également des gènes impliqués dans le *processing* de l'antigène et sa présentation (molécules HLA de classe I, II et TAP) (Zhang, Brooks et al. 1994; Cahir-McFarland, Carter et al. 2004). Dans les cellules B en latence III, un des nombreux changements cellulaires induit par LMP-1 est effectivement la sur-expression des antigènes HLA de classe I et du transporteur TAP, requise pour la présentation des antigènes aux CD8+, créant ainsi un environnement cellulaire dans lequel d'autres protéines de latence coexprimées sont *processées* et induisent le développement d'une réponse immune (Rowe, Qu et al. 1997). Cela peut être à l'avantage du virus puisque le besoin initial de cellules B latentes en expansion dans l'hôte naïf doit être équilibré face au risque d'une maladie lymphoproliférative fatale et que cette expansion ne doit pas être reconnue par le système

immunitaire de l'hôte. LMP-1 lui-même est pauvrement immunogénique pour la réponse humorale et cellulaire (Meij, Vervoort et al. 2002) (figure 18). De même, l'infection à EBV semble empêcher la présentation antigénique CMH class I restreinte dans les cellules de patients atteints de CNP et les cellules B « normales » (Zeidler, Eissner et al. 1997) suggérant que, dans le contexte infectieux, LMP1 peut agir différemment, en envoyant des signaux de mise sous silence à son environnement immunologique. Il a ainsi été rapporté que LMP1 stimule les cellules de l'hôte pour qu'elles augmentent leur expression en différentes molécules dont la molécule immunomodulatrice IL-10 (Dukers, Meij et al. 2000). L'induction de cette sécrétion réside dans le domaine C terminal et fonctionne en *cis*, alors que le domaine transmembranaire hydrophobe et ses sous-fragments peuvent induire l'expression d'IL-10 en *trans* en activant les cellules T régulatrices CD4+CD25+FoxP3+ (Marshall, Vickers et al. 2003). L'équipe de Middeldorp s'est intéressée à une nouvelle molécule immunomodulatrice, le sCD83 -forme soluble du CD83 sécrétée par les CD et les B activées dont LMP1 stimulerait la sécrétion (Middeldorp and Pegtel 2008). Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont démontré son rôle immunosuppresseur notamment dans l'inhibition de la stimulation médiée par les cellules dendritiques et la maturation même de ces cellules (Fujimoto and Tedder 2006; Baleeiro and Barbuto 2008).

Finalement il a été montré que LMP1 et certains fragments du premier domaine transmembranaire, incluant essentiellement la séquence LALLFWL, supprimait activement l'activation des cellules T CD3+CD28- induite par les antigènes et les mitogènes; en tant que molécule purifiée (Dukers, Meij et al. 2000; Keryer-Bibens, Pioche-Durieu et al. 2006) ou lors de sa sécrétion dans les espaces intracellulaires en association avec les exosomes des blastes infectés par EBV (Flanagan, Middeldorp et al. 2003). En fait LMP1 contient un domaine immunosuppresseur très conservé dans sa première hélice transmembranaire à la séquence LALLFWL, qui présente une forte homologie avec le domaine immunosuppresseur LDLLFL inclus (de manière endogène) dans des protéines transmembranaires rétrovirales (Tableau IV).

Tableau IV. Alignement de séquences peptidiques de la région immunorégulatrice prototype des rétrovirus avec celle d'EBV. Le domaine "LALLFWL" (en gras) présente une homologie de séquence avec le domaine immunosuppressif relativement bien conservée "LDLLFL" (dans la zone jaune).

Virus*	Protein	Amino acid sequence
MuLV	p15E	Q N R R G L D L L F L K E G G L C A A
FeLV	p15E	Q N R R G L D I L F L Q E G G L C A A
HTLV-I	Gp21	Q N R R G L D L L F W E Q G G L C K A
HTLV-II	Gp21	Q N R R G L D L L F W E Q G G L C K A
EBV	LMP1	L L L L L L A L L F W L Y I V M S D W
HERV-E	fusion	R L A L D Y L T A E K G G L C
HERV-K	fusion	R S K R F I F T L I A V I M G L I A V
Lentivirus	Nef	T Y K A A I D L S H L K E G G L
CKS17	prototype	Q N R R G L D L L F L K E G G

La présence de LMP1 dans des exosomes immunomodulateurs (Dukers, Meij et al. 2000; Thery, Duban et al. 2002) lui confère aussi une fonction immunomodulatrice. Normalement, l'interaction directe avec les exosomes dérivés de CPA doit mener à l'activation des cellules T, mais selon le set de protéines de surfaces transportées, elles peuvent également médier à l'anergie des cellules T voire à leur mort cellulaire (Abusamra, Zhong et al. 2005; Kim, Bianco et al. 2006). Les études menées par l'équipe de Pierre Busson ont montré que les exosomes dérivés de cellules B (Dukers, Meij et al. 2000; Flanagan, Middeldorp et al. 2003) et de cellules de CNP (Keryer-Bibens, Pioche-Durieu et al. 2006) étaient riches en LMP1. Les exosomes LMP1+ peuvent interagir avec les cellules avoisinantes, incluant les cellules présentatrices de l'antigène et les cellules T, contribuant ainsi à l'immunomodulation. En effet, il a été montré que les exosomes LMP1+ suppriment directement l'activation des cellules T, alors que des exosomes dérivés de cellules B EBV- ne le peuvent pas (Flanagan, Middeldorp et al. 2003). Ces exosomes LMP1+ peuvent rendre anergiques les cellules T avoisinantes, même après une forte stimulation comme celle induite par de l'anti-CD3/-CD28 et les activations médiées par de puissants mitogènes T. Cette sécrétion d'exosomes est un phénomène généralement rencontré dans les tumeurs associées à EBV, qui ne se limite pas aux cellules B ou aux lymphomes, mais qui se produit également dans les cellules épithéliales et les carcinomes (Keryer-Bibens, Pioche-Durieu et al. 2006).

Ajoutons à cela que LMP1 stimule la résistance à l'apoptose via une sur-régulation de bcl-2 apportant ainsi un moyen supplémentaire d'échapper aux signaux cytotoxiques médiés par les CTL (granzyme-B et Fas-L) (Oudejans, Jiwa et al. 1997).

La protéine **LMP2** joue également un rôle dans l'échappement du virus à la réponse immunitaire. L'équipe de Young, a ainsi montré que cette protéine pouvait agir sur la modulation des récepteurs aux IFN (IFN-R) de type I et II. En effet, des cellules épithéliales exprimant LMP2 ont une réponse affaiblie aux IFN- α ou - γ . De même, LMP2 semble augmenter le turn-over des IFN-Rs par des processus mettant en jeu l'acidification des endosomes. Ces données sur une diminution de la réponse aux IFNs ajoutent bien une autre voie d'échappement à la réponse immune aussi bien innée qu'adaptative (Shah, Stewart et al. 2009).

2. Stratégies moléculaires impliquant les protéines du cycle lytique

Un certain nombre de protéines lytiques d'EBV a été impliqué dans des fonctions d'échappement au système immunitaire. L'EBV code une cytokine et un récepteur de cytokine d'un rôle important dans l'immunorégulation permettant l'établissement de l'infection latente. La protéine **BCRF1** partage, en effet, 70% de sa séquence en acides aminés avec l'IL-10 (Moore, Vieira et al. 1990). BCRF1 mime l'action de l'IL-10 humaine en inhibant la synthèse de l'IFN- γ par les *PBMC in vitro*. La protéine **BARF1** fonctionne comme un récepteur soluble du Colony Stimulating Factor 1 (CSF1). Or CSF1 augmente normalement l'expression de l'interféron- γ par les monocytes, donc BARF1 fonctionne comme un « leurre » en bloquant l'action de cette cytokine (Strang and Rickinson 1987; Cohen and Lekstrom 1999). **BZLF1** est exprimée à l'initiation du cycle lytique et sous régule l'IFN- γ (Morrison, Mauser et al. 2001). Comme l'IFN- α et - γ inhibent la croissance des cellules B infectées par l'EBV *in vitro*, les protéines BARF1, BCRF1 et BZLF1 contribuent à l'échappement du virus au système immunitaire de l'hôte durant l'infection aiguë ou encore pendant les phases de réactivation virale. De même, **BHFR1**, un homologue de bcl-2 joue un rôle dans l'inhibition de l'apoptose et protège ainsi les cellules infectées des attaques médiées par le système immunitaire (Henderson, Huen et al. 1993).

D'autres fonctions d'échappement immunitaire, plus récemment identifiées affectent la reconnaissance des cibles cellulaires lors de la réponse cellulaire T adaptative et impliquent des protéines de capsid en plus des glycoprotéines virales. L'un d'entre eux implique la protéine gp42, qui fait partie d'un complexe trimoléculaire contenant la gp85 et la gp25 sur l'enveloppe virale, qui, via la fixation aux molécules HLA de classe II sur la surface des cellules B, permet la fusion membranaire et l'entrée du virus (Louis, Straathof et al.) (figure 11). Des travaux plus récents montrent qu'une forme tronquée de gp42 (forme soluble) est produite par des cellules infectées et peut se fixer en retour sur des molécules HLA classe II, protégeant ainsi les cellules

d'une reconnaissance des cellules T CD4⁺ (Ressing, van Leeuwen et al. 2003; Ressing, van Leeuwen et al. 2005).

De nombreuses observations suggèrent également que EBV peut aussi interférer avec la voie de signalisation des molécules HLA classe I dans le cycle lytique : (a) la réponse des CD8⁺ est très nettement biaisée envers les antigènes immédiatement précoces et une petite partie des antigènes précoces (Pudney, Leese et al. 2005) ; (b) des clones de cellules T spécifiques des antigènes tardifs isolées montrent une très forte affinité pour le peptide apparenté reconnaissant alors pauvrement les cellules en infection lytique (Pudney, Leese et al. 2005); (c) avec la progression des cellules dans le cycle lytique, le niveau des antigènes HLA de classe I semble chuter plus significativement que n'importe quelle autre protéine de surface (Keating, Prince et al. 2002). Ces effets ont récemment été assignés à **BNLF2a**, une petite protéine précoce du cycle lytique qui se fixe au transporteur TAP et en bloque les fonctions, et la voie de signalisation de la présentation des antigènes par les molécules HLA classe I (Hislop, Ressing et al. 2007; Jung, Castellana et al. 2009). **BGLF5**, une DNase hautement conservée chez les herpèsvirus, est également capable d'inhiber la synthèse de protéines cellulaires, résultant notamment en une perte de l'expression des molécules HLA de classe I (Zuo, Thomas et al. 2008). Une diminution de l'expression des molécules HLA de classe II a également été observée suivant l'expression de BGLF5, attestant ainsi son rôle dans l'altération de la reconnaissance des cellules infectées par EBV par les cellules T CD8⁺ et T CD4⁺.

BILF1, un autre gène du cycle lytique codant une glycoprotéine qui induit une signalisation constitutive équivalente à celle d'un récepteur couplé aux protéines G, a récemment été associé aux mécanismes d'échappement à la réponse immune durant la phase du cycle lytique. BILF1 réduit le taux de CMH de classe I à la surface cellulaire et inhibe ainsi la reconnaissance des cibles antigéniques endogènes par les cellules T CD8⁺. Il semblerait que BILF1 se fixe au CMH de classe I dont elle augmente le *turn-over* à la surface cellulaire et qu'elle augmente leur dégradation par les protéases lysosomiales (Zuo, Currin et al. 2009).

Bien que les divers effets décrits plus haut ont été interprétés dans le contexte de cellules en cycle lytique, il devient clair que plusieurs gènes lytiques sont transitoirement exprimés à partir de nouveaux génomes viraux dans les cellules B au repos fraîchement infectées (Alotaibi, Kennedy et al. 2004). Il est possible, cependant, que, comme il l'a déjà été rapporté pour la protéine BCRF1

(Zeidler, Eissner et al. 1997), chaque effet rencontré dans le cycle lytique puisse également s'opérer transitoirement durant des stades très précoces de la transformation des cellules B quand la cellule infectée pourrait être sujette à une attaque par la réponse immune adaptative et innée simultanément ; créant alors des fenêtres pendant lesquelles peut se produire une amplification virale immunologiquement silencieuse.

B. Mécanismes d'échappement des cellules tumorales au système immunitaire

Comme décrit dans le chapitre II, il existe une réponse humorale et cellulaire très importante dans l'infection par EBV. On peut donc théoriquement envisager qu'un organisme au sein duquel se développe une tumeur associée à ce virus puisse engendrer une réponse immunitaire efficace. Cependant la prolifération tumorale indique que cette réponse n'est pas suffisante pour empêcher la progression de la maladie. Au cours de leur croissance, les cellules tumorales vont, en effet, acquérir la capacité de contourner les réponses immunitaires mises en place par l'organisme. Les mécanismes qui visent à contourner la réponse immunitaire antitumorale sont multiples et se regroupent sous le nom de mécanismes d'échappement tumoral, ces mécanismes sont décrits dans ce chapitre (figure 19).

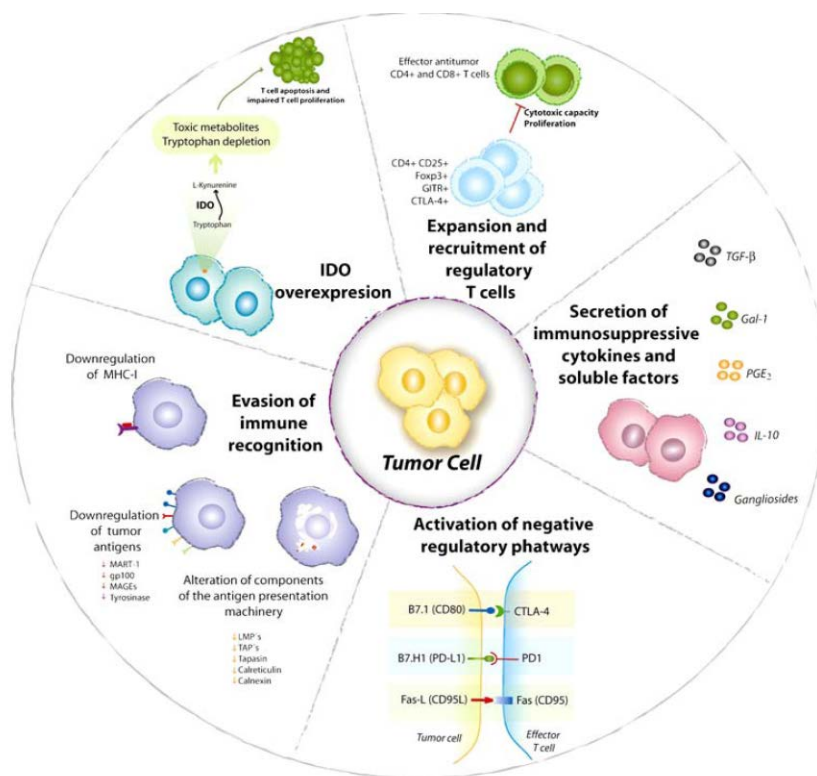


Figure 19 : Stratégies d'échappement développées par les tumeurs (Crocì, Zacarias Fluck et al. 2007).

1. Altération de l'expression des molécules du CMH

L'absence d'expression des molécules du CMH, fréquente dans de nombreux types tumoraux, leur confère une résistance aux lymphocytes T spécifiques (Seliger, Cabrera et al. 2002). C'est le cas des mélanomes, des carcinomes du côlon, des cancers de la prostate (Algarra, Collado et al. 1997) et du cancer du sein, où la perte est même supérieure à 50%. Ces cellules n'exprimant pas les molécules du CMH proviendrait de variants tumoraux issus d'une lésion cancéreuse précoce (Khong and Restifo 2002; Algarra, Garcia-Lora et al. 2004). La capacité invasive de certains cancers a pu être corrélée à l'absence de molécules du CMH de classe I (Algarra, Collado et al. 1997). Les mécanismes impliqués dans la perte d'expression des molécules du CMH sont nombreux (figure 20).

Une absence totale des molécules du CMH de classe I est souvent due à une mutation dans le gène codant la β -2 microglobuline (D'Urso, Wang et al. 1991; Hicklin, Wang et al. 1998; Jieyong, Zhong et al. 2006) ou encore à la régulation négative de complexes protéiques du protéasome (LMP2 et LMP7) ou de transporteurs peptidiques (TAP1, TAP2). Ce qui a notamment été rapporté pour des cancers du poumon, de la prostate, et du rein (D'Urso, Wang et al. 1991; Sanda, Restifo et al. 1995; Korkolopoulou, Kaklamanis et al. 1996; Seliger, Hohne et al. 1997).

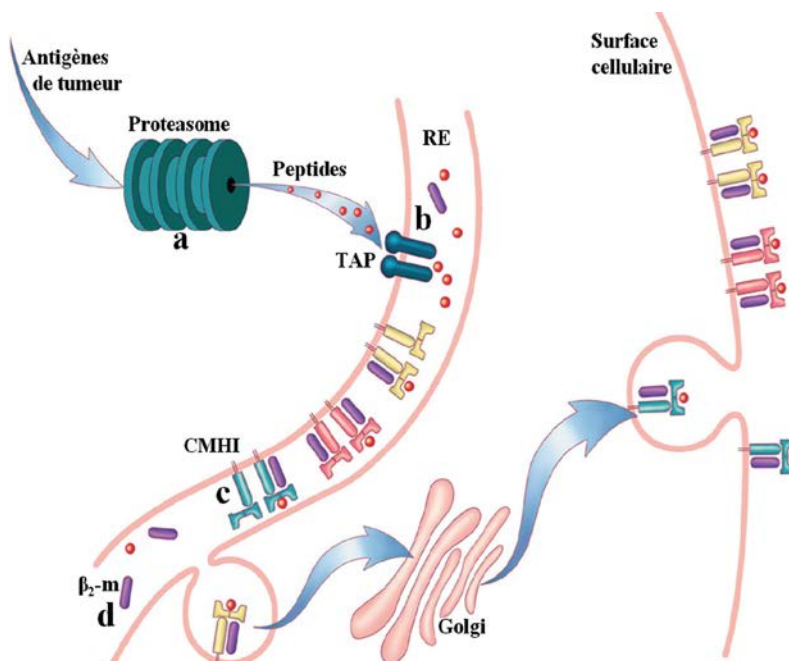


Figure 20 : Mécanismes d'altération de l'expression des molécules du CMH I (Khong and Restifo 2002). Des dérégulations peuvent intervenir au cours des différentes phases aboutissant à l'expression des molécules du CMH I à la surface cellulaire. a. dérégulation dans les composants du protéasome (telles LMP2 et LMP7); b. dérégulation des transporteurs peptidiques TAP1 et TAP2; c. perte d'hétérozygotie sur le chromosome 6; dérégulation transcriptionnelle, mutations ponctuelles ou délétion sur le gène codant le CMH de classe I; d. mutations ou délétion du gène codant la β -2 microglobuline (Khong and Restifo 2002).

Etant donné que les cellules NK peuvent être activées par le système « Missing self recognition », la perte totale des molécules du CMH de classe I semble moins avantageuse pour la tumeur. Cependant, les altérations des molécules du CMH sont souvent plus fines ; c'est le cas de certains cancers qui présentent des pertes d'allèles, de *locus* ou d'haplotype pour le CMH : perte d'expression du locus HLA-B ou délétion du produit du locus HLA-C dans le mélanome (Versteeg, Kruse-Wolters et al. 1989; Marincola, Shamamian et al. 1994; Griffioen, Ouwerkerk et al. 1999); absence de certains facteurs de transcription pouvant mener à la perte d'expression du locus HLA-B dans le cancer du côlon (Soong and Hui 1992). Pour la maladie de Hodgkin, c'est un défaut général dans l'expression de la chaîne α du TCR qui a été décrite (Renner, Ohnesorge et al. 1996).

Dans les CNP, Sengupta et al. ont décrit une forte inhibition de l'expression des gènes des molécules de CMH de classe I, qui est fortement corrélée à l'expression des gènes d'EBV (EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, LMP1, et LMP2A). L'association entre expression des gènes d'EBV et inhibition de l'expression des molécules de CMH de classe I, suggère une inhibition directe de la présentation antigénique des antigènes d'EBV, ce qui faciliterait l'échappement immunitaire des cellules tumorales (Sengupta, den Boon et al. 2006).

2. Variation ou perte d'expression des antigènes de surface

La diminution de l'expression des antigènes dans le mélanome est souvent corrélée à une progression dans la maladie (de Vries, Smeets et al. 2001). Cette perte d'expression peut être retrouvée après une vaccination peptidique. Par exemple, il a été montré que l'expression de l'antigène tumoral gp100 diminuait après une vaccination par ce peptide, alors que l'expression d'un autre antigène tumoral, MART-1, restait inchangée (Riker, Cormier et al. 1999). Les mécanismes contrôlant la diminution de l'expression de ces antigènes ne sont pas totalement élucidés, mais ils pourraient être reliés au concept d'immunodominance des épitopes (figure 21). Cette théorie est basée sur la reconnaissance prioritaire d'un épitope parmi la totalité de ceux exprimés par la cellule tumorale. Cet épitope présent sur les populations parentales va entraîner une réponse anti-umorale spécifique. Après destruction de la population parentale, une nouvelle hiérarchie s'établit entre les variants résistants, aboutissant à la transformation d'épitopes immunorécessifs en épitopes immunodominants. Cependant, l'épitope immunodominant parental peut continuer à être présenté par *cross-présentation* via les cellules dendritiques aux T CD8+, maintenant ainsi une réponse immunitaire contre une cible « fantôme », au détriment de réponses dirigées contre les autres épitopes (Schreiber, Wu et al. 2002).

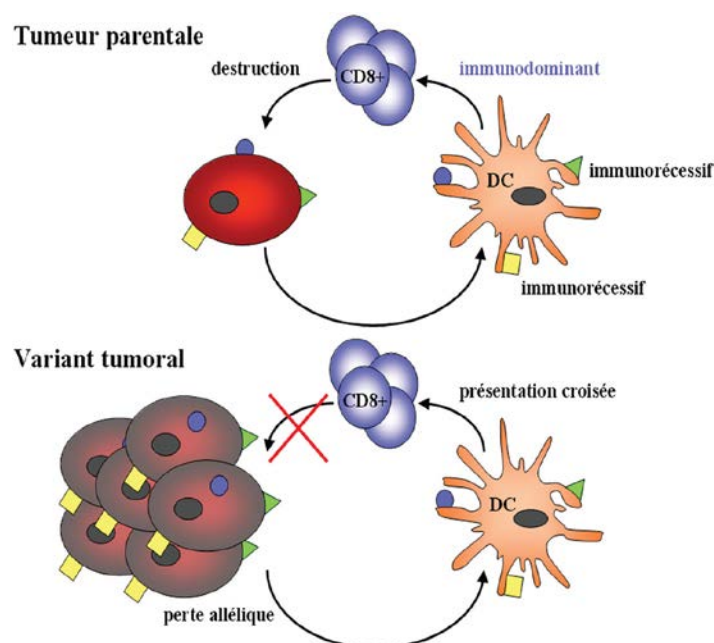


Figure 21: Concept d'immunodominance. La perte d'un des trois allèles du CMHI est suffisante pour permettre l'échappement d'un variant tumoral. La présentation croisée de l'antigène dominant par les CD maintient la réponse immunitaire dirigée contre cet épitope dominant. Cette réponse ne peut plus participer à l'élimination du variant tumoral, et prévient la mise en place d'une réponse contre de potentiels antigènes cibles (Schreiber, Wu et al. 2002).

Le mécanisme « Antigenic drift », qui avait été décrit dans l'échappement de la reconnaissance immune pour les virus (Ciurea, Hunziker et al. 2001), a été récemment décrit dans les tumeurs : les multiples mutations tumorales peuvent conduire à une perte de l'antigénicité initiale et expliquent la faible efficacité d'une réponse cellulaire anti-tumorale (Bai, Liu et al. 2003). La reconnaissance et la lyse par les CTL spécifiques d'un complexe CMH:peptide des cellules tumorales nécessitent qu'une quantité suffisante d'antigène soit transcrite (Labarriere, Diez et al. 1997). Des travaux ont montré que, même si elles partagent les mêmes antigènes tumoraux, différentes lignées de cellules cancéreuses utilisent en même temps ces différents mécanismes pour échapper à la réponse immune (Bai, Liu et al. 2006).

3. Inhibition de l'apoptose induite par les lymphocytes T spécifiques

Dans certains tissus, il existe des zones de privilège immunitaire, comme la chambre antérieure de l'œil ou les testicules, où l'on retrouve une forte expression des ligands des récepteurs de mort (FasL, TRAIL) (Fijak and Meinhardt 2006; Ferguson and Griffith 2007; Niederkorn 2007). La voie des récepteurs de mort et de leurs ligands a une importance cruciale dans la réponse immunitaire en induisant l'apoptose des cellules tumorales. Cependant, ces dernières sont capables de détourner cette machinerie, à l'image des zones de privilèges immunitaire, en utilisant différentes méthodes.

a) Inhibition directe

L'inhibition de l'apoptose peut avoir lieu au niveau du récepteur Fas exprimé sur les cellules tumorales par le biais de plusieurs mécanismes (figure 22).

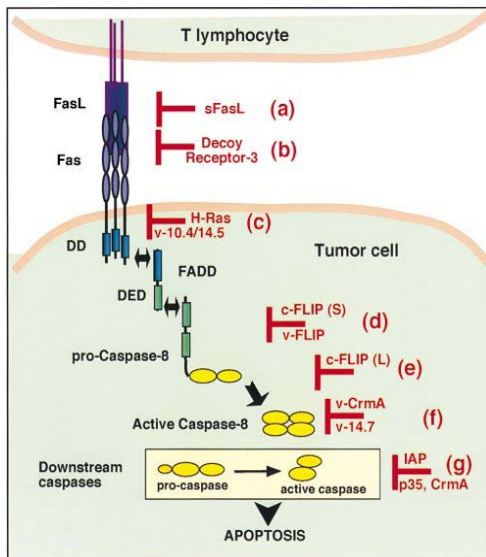


Figure 22 : Voie de signalisation de Fas et ses inhibition. La signalisation de Fas est déclenchée sur les cellules cibles par la trimérisation ultérieure à la fixation de FasL. Le recrutement consécutif de FADD (par interaction DD-DD) et de la procaspase-8 ou -10 mène à l'autoactivation de la caspase (caspase-8 ou -10) en amont, ce qui initie l'apoptose par le clivage des caspases effectrices en aval (caspases-3, -6, -7). L'apoptose par les récepteurs de mort peut être inhibée en différents points (en rouge) : au niveau du récepteur, par exemple, par des ligands solubles (a), et/ou des récepteurs leurres (b), par l'internalisation des récepteurs, par exemple, par adénovirus E3-10.4/14.5K (c), par une sous expression de récepteurs, par exemple, par l'oncogène H-Ras(c); durant la transduction du signal par FLIPs (d, e, f); et au stade effecteur (par l'inhibition des caspases, par exemple, baculovirus, p35, adénovirus 14.7, et/ou IAPs [g]) (French and Tschopp 1999).

Des mutations du gène *Fas* ont été retrouvées dans des lymphomes malins non-Hodgkiniens (LMNH) (Gronbaek, Straten et al. 1998; Shen, Liang et al. 2002), des cancers du poumon non à petites cellules (Lee, Shin et al. 1999), des lymphomes gastriques (Wohlfart, Sebingner et al. 2004); il existe une inhibition de l'expression du récepteur Fas par l'oncogène Ras (Fenton, Hixon et al. 1998; Peli, Schroter et al. 1999). Les mêmes mécanismes anti-apoptotiques ont été retrouvés dans le cas de l'apoptose médiée par TRAIL (Hersey and Zhang 2001; Bergmann, Strauss et al. 2007). Certaines cellules tumorales sécrètent le récepteur Fas soluble afin d'empêcher les lymphocytes T FasL+ d'atteindre leur cible cellulaire exprimant Fas (Linkermann, Qian et al. 2005). Cette stratégie du leurre (*decoy*), aide les cellules tumorales à neutraliser le FasL des cellules effectrices par les molécules solubles sécrétées. DcR3 (*Decoy Receptor 3*) possède ainsi la partie extracellulaire de Fas, tout en étant dépourvu de région transmembranaire. L'expression de cette molécule a été décrite dans de nombreuses tumeurs comme les cancers du côlon et du poumon (Pitti, Marsters et al. 1998), les gliomes malins (Roth, Isenmann et al. 2001), des adénocarcinomes pancréatiques (Tsuji, Hosotani et al. 2003). Il a également été montré que l'expression élevée de CDR3, retrouvée chez 25% des patients atteints de cancer gastrique, était corrélée à une réduction de la survie globale (Takahama, Yamada et al. 2002).

La surexpression des inhibiteurs de l'apoptose peut conférer aux cellules une résistance à l'apoptose. La molécule FLIP, un inhibiteur de l'apoptose de la famille ADED (*ADED, Anti-apoptotic Death Effector Domain*), est capable de s'associer à FADD ou à la caspase 8 en utilisant ces deux domaines DED afin d'inhiber le recrutement et l'activation de la caspase 8 au niveau du DISC (Irmeler, Thome et al. 1997). Thome et al. ont montré une expression élevée de FLIP dans les mélanomes, FLIP pourrait ainsi aider les cellules tumorales à échapper au contrôle du système immunitaire (Irmeler, Thome et al. 1997). Cette hypothèse fût confirmée par plusieurs équipes (French and Tschopp 1999), leurs études indiquant que les cellules tumorales transfectées avec le gène tumorale codant pour le FLIP viral (Djerbi, Screpanti et al. 1999) ou cellulaire (Medema, de Jong et al. 1999), avaient un avantage de croissance très significatif lorsqu'elles étaient injectées chez des souris immunocompétentes syngéniques ou semi-allogéniques. En revanche, aucune différence de comportement n'était observée quand ces cellules étaient injectées dans des souris SCID. Ces observations suggèrent que les lymphocytes T sont capables de rejeter les cellules tumorales n'exprimant pas FLIP chez les souris immunocompétentes et confirment le rôle de la surexpression de FLIP dans l'échappement tumoral.

La survivine, une protéine inhibitrice des caspases-3, -7 et -9 de la famille IAP (*IAP, Inhibitory of Apoptosis Protein*), est fortement exprimée durant la vie fœtale et n'est pratiquement pas détectable dans les cellules normales chez l'adulte (Deveraux and Reed 1999). Ambrosini et al. ont décrit une surexpression de la survivine dans de nombreuses tumeurs ce qui les aiderait à résister à l'apoptose (Ambrosini, Adida et al. 1998).

Les membres de la famille Bcl-2 jouent un rôle important dans la régulation des voies de signalisation de la mort cellulaire (Adams and Cory 2007). Cette famille comprend des protéines anti-apoptotiques (comme Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1) (Borner, Brousset et al. 1999; Rochaix, Krajewski et al. 1999; Groeger, Esposito et al. 2004) et des protéines proapoptotiques (comme Bax, Bak, Bad, Bid, Bim). La surexpression des protéines anti-apoptotiques ou l'inactivation des gènes de protéines proapoptotiques (Yin, Knudson et al. 1997) dans les cellules tumorales contribuent à bloquer l'action du système immunitaire.

Dans le CNP, LMP1 est décrite comme inhibitrice de l'apoptose. En effet, de par ses propriétés oncogènes, elle est capable de protéger les cellules contre l'apoptose. Même si LMP1 n'induit pas BCL2 dans les cellules épithéliales, elle stimule TNFAIP3/A20, Mcl-1, c-IAP2 (BIRC3) et

la survivine dans un mécanisme NF- κ B/AP-1 dépendant (Tsao, Tramoutanis et al. 2002; Li and Chang 2003; Morris, Dawson et al. 2009). De plus, l'induction des interleukines IL-1, 6 et 10 pourrait protéger les cellules qui expriment LMP1 de l'apoptose par une activation soutenue du NF- κ B et de STAT3 (Chen, Chang et al. 1999). EBNA1 est elle aussi décrite dans l'inhibition de l'apoptose des cellules épithéliales infectées par EBV, notamment par la déstabilisation du P53 (Sheng, Saridakis et al. 2006).

b) Inhibition indirecte

Si l'inhibition directe de l'apoptose induite par les lymphocytes T se traduit par l'échappement des cellules tumorales, l'inhibition indirecte constitue une autre stratégie induisant la mort des cellules effectrices du système immunitaire.

En 1996, Hahne et al. ont découvert une expression tumorale de la molécule FasL chez des patients atteints de mélanome, et montré que cette expression pouvait se traduire par une apoptose massive des lymphocytes infiltrant les tumeurs (*TIL*, *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*) chez la souris. Ces données ont été confirmées par des expériences d'inhibition d'apoptose des *TIL* en présence d'anticorps anti-FasL *in vitro*, et par l'absence de développement des cellules tumorales FasL+ injectées chez les souris *lpr* (modèle de souris déficiente en protéine Fas, lymphocytes T Fas⁻) (Hahne, Rimoldi et al. 1996). Dans la même année, une équipe Allemande a montré une expression du FasL en périphérie de la tumeur et dans les zones de contacts avec les *TIL* par l'étude anatomopathologique de tumeurs pulmonaires et hépatiques. Les *TIL* étaient alors majoritairement apoptotiques (Strand, Hofmann et al. 1996). L'expression de FasL a également été révélée dans d'autres tumeurs : côlon (O'Connell, O'Sullivan et al. 1996), gliomes (Saas, Walker et al. 1997), myélomes multiples (Greil, Egle et al. 1998), carcinomes des cellules squameuses de la tête et du cou (Gastman, Atarshi et al. 1999), cancers pancréatiques (Bernstorff, Glickman et al. 2002), cancers du sein (Mullauer, Mosberger et al. 2000) etc. L'ensemble de ces données démontre que l'expression tumorale de FasL participe au processus d'échappement tumoral à la réponse immunitaire (Parry, Chemnitz et al. 2005). Cependant, le processus même de la mort des lymphocytes T reste contesté (figure 23). L'hypothèse de contre-attaque (*counterattack*) est soutenue et largement documentée par l'équipe irlandaise d'O'Connell (O'Connell, Bennett et al. 1999; O'Connell, Houston et al. 2001). Elle explique que l'expression de FasL dans les cellules tumorales constitue un moyen de contre-attaque utilisé par ces dernières pour induire l'apoptose des lymphocytes T. Cependant, un modèle alternatif, défendu par l'équipe de Restifo à l'Institut National des Cancers aux Etats-Unis, soutient que FasL est exprimé par les cellules T activées qui

reconnaissent la tumeur, ce qui déclenche leur auto-apoptose ou une apoptose mutuelle (Chappell, Zaks et al. 1999; Restifo 2000; Restifo 2001).

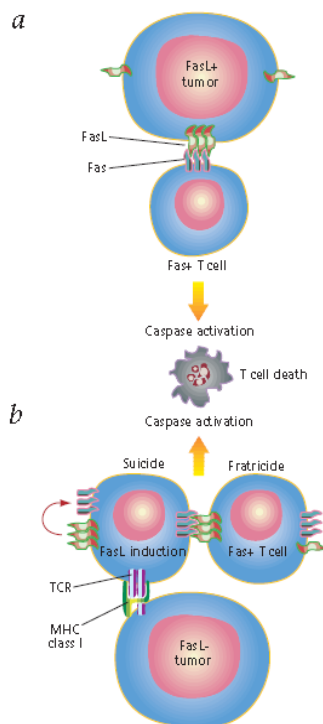


Figure 23 : La mort des cellules T induite par FasL (Restifo 2000). a. FasL, exprimé sur une cellule tumorale, interagit avec son récepteur, Fas, qui est exprimé sur les cellules T infiltrantes. Cette interaction déclencherait la mort des cellules T, par l'activation des caspases. b. FasL est exprimé par les lymphocytes T après la reconnaissance de la tumeur et l'activation. Les cellules T se tuent alors elles-mêmes (« suicide ») et les unes les autres (« fratricide ») par la même machinerie caspase dépendante (Restifo 2000).

Une autre molécule transmembranaire analogue à FasL, le RCAS1 (*RCAS1, Receptor-binding Cancer Antigen express on SiSo Cells 1*), est également impliquée dans l'inhibition de la réponse cytotoxique au cours de l'immunosurveillance (Nakashima, Sonoda et al. 1999). RCAS1 a été mis en évidence dans plus de 14 types de cancers (ovaire, utérus (Nakashima, Sonoda et al. 1999), gliomes (Nakabayashi, Nakashima et al. 2007), tumeurs hépatiques, pulmonaires, pancréatiques, gastro-intestinales (Iwasaki, Nakashima et al. 2000; Noguchi, Enjoji et al. 2001; Akashi, Oimomi et al. 2003; Leelawat, Engprasert et al. 2005). **RCAS1** induit l'apoptose des lymphocytes périphériques *in vitro*, mais cause également une augmentation du nombre de *TIL* apoptotiques. Aujourd'hui, RCAS1 est devenu un biomarqueur informatif que l'on peut associer à différents états de la tumeur (grade clinique, taille et différenciation...).

B7-H1 (Program Death (PD) Ligand (L)-1, CD274), un membre de la famille des costimulateurs B7 qui se lie sur PD1, est exprimé préférentiellement dans les tissus tumoraux (Strome, Dong et al. 2003; Winterle, Schreiner et al. 2003), ce qui est considéré comme un facteur de mauvais pronostic chez l'homme (Thompson, Gillett et al. 2005). La liaison de B7-H1 sur PD1 engendre soit l'apoptose, soit la sénescence (Ishida, Agata et al. 1992; Flies and Chen 2007). B7-H1

est surexprimé d'une manière inductible sur les cellules tumorales *in vivo* et *in vitro* (notamment par l'IFN- γ), et il pourrait jouer un rôle important dans l'échappement tumoral à la réponse immune via un accroissement de l'apoptose des cellules T (Zeng and Jia 2002). Il a été suggéré que la disparition des cellules T CD4⁺ conventionnelles (Tconv) par le mécanisme faisant intervenir PD1/B7-H1 permettrait à la tumeur de sélectionner préférentiellement des cellules T CD4⁺ régulatrices qui n'expriment que peu B7-H1. Ceci est important surtout dans le contexte de protocoles d'immunothérapie où les Tconv sont fortement activées (Parry, Chemnitz et al. 2005; Alderson, Zhou et al. 2008).

4. Défaut d'activation lymphocytaire

En comparaison aux lymphocytes du sang périphérique ou de ceux issus de tissus distants de la tumeur, les *TIL*-T sont constitutivement plus faiblement répondeurs, voire non-répondeurs, aux stimuli traditionnels qui activent les cellules Tconv (Whiteside 1992). L'altération des lymphocytes T CD4⁺ à répondre à un stimulus antigénique survient souvent précocement dans le développement de tumeurs (Staveley-O'Carroll, Sotomayor et al. 1998). Les mécanismes de stimulation faisant intervenir les cellules présentatrices d'antigènes peuvent être déficients. Ainsi, les cellules dendritiques associées aux tumeurs, les TDAC (*TDAC, Tumor-Associated Dendritic Cell*), sont fonctionnellement défectueuses notamment dans leur rôle de présentation antigénique (Mantovani, Romero et al. 2008). Les molécules de costimulation comme celles de la famille B7 à la surface des cellules dendritiques, nécessaires au second signal d'activation des lymphocytes T spécifiques, sont souvent absentes ou sous-exprimées sur les cellules tumorales, ce qui entraîne une anergie du lymphocyte T (Chaux, Favre et al. 1997; van der Merwe and Davis 2003). De plus, les TAM présents dans les sites inflammatoires tumoraux, présentent aussi des dysfonctionnements équivalents à leurs homologues TDAC chez un même patient (Mantovani, Bottazzi et al. 1992) et pourraient inhiber l'activation des cellules T (Attwood and Munn 1999). *CTLA-4* (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*) un homologue de CD28, est exprimé de manière constitutive sur les cellules T activées et les Treg. Dans le microenvironnement tumoral, les cellules T activées par les cellules dendritiques TAA (*Tumor Associated Antigens*) spécifiques riches en B7, vont surexprimer *CTLA-4*. Or cette molécule est le régulateur négatif de la voie d'activation par le CD28 pour lequel elle est plus affine, sa surexpression sur les T activés résultant en une inhibition de l'immunité de type Th1 et une polarisation favorisant la réponse de type Th2 (Taylor, Lees et al. 2002). L'induction d'une réponse humorale Th-2 en présence de cellules B présentant des peptides antigéniques est un autre mécanisme de tolérance des lymphocytes T CD4⁺,

puisqu'une réponse de type Th1 est nécessaire pour un rejet tumoral efficace (Qin, Richter et al. 1998). Il peut également exister une altération des signaux de transduction des lymphocytes T. Une diminution partielle ou complète de l'expression de plusieurs protéines (Chaîne α , P56lck, fyn) impliquées dans la transduction du signal via le récepteur des cellules T a été rapportée au niveau des *TIL* au cours du développement des cancers (Tartour, Latour et al. 1995; Gastman, Atarshi et al. 1999), notamment dans les tumeurs hématopoïétiques de Hodgkin (Renner, Ohnesorge et al. 1996). De même, dans les tumeurs myéloïdes, une altération des protéines à activité tyrosine kinase comme CD16 a été rapportée comme mécanisme de détérioration de l'activité des cellules T et NK (Buggins, Hirst et al. 1998). Dans les tumeurs primaires intracrâniennes, des manifestations telles que la lymphopénie, une diminution de l'expression des immunoglobulines et une anergie des cellules T CD4+ (Morford, Elliott et al. 1997) ont été décrites. L'anergie des cellules T CD4+ pourrait également être due à l'incapacité de ces cellules à exprimer un niveau suffisant de chaînes α du récepteur à l'IL-2 (CD25), ainsi qu'à une extinction de la phosphorylation des tyrosines de certaines protéines importantes dans la transduction du signal (Morford, Elliott et al. 1997). Par exemple, chez des patients atteints de mélanome, l'altération des signaux de transduction est corrélée avec une diminution de l'expression des gènes de l'IFN- γ , de l'IL2 ou de la chaîne ζ du TCR (Kiessling, Wasserman et al. 1999).

5. Production de molécules immunosuppressives

L'activation ou l'inhibition des lymphocytes T repose en grande partie sur la nature des cytokines qui composent le microenvironnement tumoral. Le déclenchement d'une réponse immunitaire efficace peut ainsi être inhibé par des facteurs immunosuppresseurs sécrétés (Kiessling, Wasserman et al. 1999). A ce jour, de nombreuses molécules ont été identifiées dans les surnageants de culture de cellules tumorales.

L'**IL-10** est fréquemment détectée dans le sérum de patients atteints d'un cancer. Elle peut avoir un effet inhibiteur sur la différenciation et la fonctionnalité des CD différenciées à partir des cellules souches hématopoïétiques (Girolomoni and Ricciardi-Castagnoli 1997). L'IL-10 inhibe la présentation antigénique ainsi que la production d'IL12 et donc inhibe la réponse CD4+ de type Th1 *in vivo* (Chouaib, Asselin-Paturel et al. 1997; Sharma, Stolina et al. 1999). Elle participe à l'extinction de l'activité cytotoxique des *CTL* et à la résistance des cellules tumorales à la lyse par les *CTL*, notamment via la diminution de l'expression des molécules du CMH de classe I et II et de la molécule d'adhésion ICAM-1 à la surface des cellules tumorales (Yue, Dummer et al. 1997). Elle

participe également à la diminution quantitative des CD en augmentant leur sensibilité à la lyse par les cellules NK autologues (Carbone, Terrazzano et al. 1999). La présence d'IL-10 dans l'environnement tumoral favorise également le recrutement et l'expansion des Treg. Plus récemment, on a décrit une boucle d'interaction entre l'IL-10 intratumoral et les CPA (cellule Présentatrice d'Antigènes) probablement via les Treg et la molécule B7-H4. B7-H4 est une molécule coinhibitrice, appartenant à la famille des molécules B7 (Collins, Ling et al. 2005), qui participe à la régulation négative de la réponse immune cellulaire mais dont les mécanismes moléculaires sous-jacents sont encore mal connus (inhibition de la prolifération et de la cytotoxicité) (Sica, Choi et al. 2003). Les TAM (*TAM, Tumor Associated Macrophages*) B7-H4+, rencontrés dans les tumeurs ovariennes, peuvent devenir immunosuppresseurs en présence d'IL-6 et -10 (Kryczek, Zou et al. 2006). De fortes concentrations de TGF- β produites par les cellules tumorales et les cellules apoptotiques (Leen, Meij et al. 2001), peuvent être retrouvées chez des patients, en association à une progression de la maladie (Gorsch, Memoli et al. 1992; Pardali and Moustakas 2007). Le TGF- β , est capable d'induire une diminution de l'expression des molécules du CMH II et de la synthèse de perforine/granzyme (Inge, McCoy et al. 1992). Il permet l'inhibition de la différenciation des CTL, affecte la prolifération et l'activation des TIL *in vivo* et permet d'inhiber la sécrétion des cytokines (Fontana, Frei et al. 1989). Enfin, il supprime l'effet de l'IL12 sur la prolifération des cellules T (Blobe, Schiemann et al. 2000). Gorelik L et al. ont schématisé les principaux effets du TGF- β dans l'inhibition de la réponse anti-tumorale (figure 24).

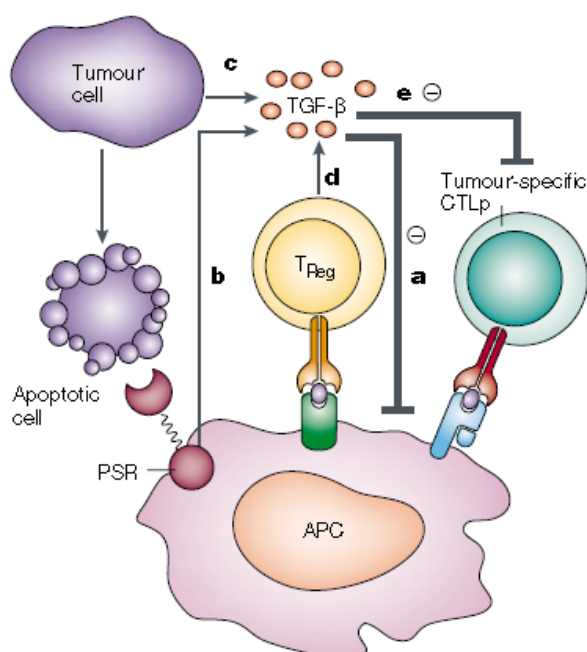


Figure 24 : Inhibition de la réponse anti-tumorale par le TGF- β (Gorelik and Flavell 2002). a. La production de TGF- β inhibe la maturation et la présentation de l'antigène par les CD. b. La mort des cellules tumorales par apoptose peut participer à la production de TGF- β au site tumoral de même qu'à l'inhibition de la fonction des cellules dendritiques. Une fois que les CPA ont apporté l'antigène aux organes lymphoïdes pour qu'il soit présenté aux cellules T, l'activation des cellules T peut être inhibée par le TGF- β produit par les cellules tumorales (c) ou les cellules immunitaires en réponse à l'antigène tumoral (d). e. Même si certains précurseurs des lymphocytes cytotoxiques (pCTL) sont activés sous de telles conditions inhibitrices, le TGF- β inhibera encore leur différenciation en CTL effecteurs. [PSR, Phosphatidylserine receptor, Treg, T-regulatory cell]

Après la phagocytose des cellules tumorales, les macrophages sécrètent également des molécules immunosuppressives comme l'IL-10 et les TGF- β (al-Sarireh and Eremin 2000). De plus, il a été montré que les monocytes/macrophages étaient responsables de la synthèse de molécules du stress oxydatif, comme le Nitric Oxyde (NO) (Hansson, Hermodsson et al. 1999), capable d'inhiber fortement la réponse de cellule T et NK au site tumoral (al-Sarireh and Eremin 2000). Même si, le NO est une molécule ambivalente pouvant avoir parallèlement des effets positifs sur la réponse immunitaire et la régression tumorale (Banat, Christ et al. 2001).

Le facteur pro-inflammatoire PGE2 (PGE2, Prostaglandine E2) est une cytokine également exprimée par les cellules tumorales. Elle va augmenter la production d'IL-10 par les lymphocytes et les macrophages et diminuer celle de l'IL12 (Pitti, Marsters et al. 1998). Il a également été montré que les cellules T CD4⁺ fortement sécrétrices d'IL-10, ou Tr1 (Groux, Cottrez et al. 1997), sont induites par le microenvironnement tumoral et que des facteurs dérivés de tumeurs comme le PGE2 pouvaient promouvoir ce processus (Bergmann, Strauss et al. 2007).

Les gangliosides dérivés des tumeurs ont un rôle dans l'induction de l'immunosuppression par mort cellulaire Fas-dépendante et peuvent interférer avec l'expression des composants inductibles du protéasome dans la machinerie d'apprêtement de l'antigène (De Maria, Lenti et al. 1997; Tourkova, Shurin et al. 2005).

Il a été montré que le VEGF (*VEFG, Vascular Endothelial Growth Factor*), sécrété par de nombreuses tumeurs, avait un rôle potentiellement immunosuppresseur. Il possède des capacités pro-angiogéniques, et inhibe la maturation des cellules dendritiques en bloquant notamment le facteur de transcription NF- κ B (Gabrilovich, Chen et al. 1996; Oyama, Ran et al. 1998; Lissoni, Malugani et al. 2001). Il a ainsi été montré, dans le cancer du sein et du poumon, l'existence d'une corrélation entre la diminution du nombre de CD matures et l'augmentation du VEGF (Almand, Resser et al. 2000).

L'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) est une hémoprotéine cytosolique qui catalyse la première étape du catabolisme du tryptophane par la voie de la kynurénine (soit plus de 90% du tryptophane chez l'homme). La conversion du tryptophane en N-formylkynurénine est catalysée par l'IDO : l'IDO se fixe d'abord sur son substrat (le tryptophane) et secondairement le complexe IDO-tryptophane est fixé par l'oxygène pour former le complexe ternaire IDO-O₂-tryptophane ; ce complexe est alors converti en N-formylkynurénine (Zamanakou, Germenis et al. 2007). Munn et al. ont démontré que le catabolisme du tryptophane médié par IDO était étroitement lié à l'induction de la tolérance périphérique (Munn, Zhou et al. 1998). Cela s'ajoute au fait que l'expression constitutive d'IDO peut être observée sur les cellules de nombreux tissus et organes

des sites putatifs de tolérance ou de « privilège immunitaire », où elle participerait à la défense de l'hôte contre les pathogènes comme les poumons, la muqueuse intestinale, l'épididyme, le placenta et l'œil (Mellor and Munn 1999; Mellor and Munn 2004). L'expression d'IDO par les cellules cancéreuses de même que par les CPA (Mellor, Keskin et al. 2002; Uyttenhove, Pilotte et al. 2003; Mellor and Munn 2004) a été détectée dans les zones infiltrantes des tumeurs, dans le stroma péri-tumoral et dans les ganglions lymphatiques drainants de nombreux types de cancers (Friberg, Jennings et al. 2002; Astigiano, Morandi et al. 2005). L'IDO prive le milieu de tryptophane, acide aminé essentiel à la survie, à l'activation et à la prolifération des cellules, notamment des cellules T. En plus de la privation en tryptophane, l'accumulation des métabolites de cette voie bloque la prolifération des cellules T (notamment par la voie des cytokines (IL2, 4, 7, 9, 15, 21) qui se fixent aux récepteurs partageant la chaîne γc), les menant à l'anergie ou la mort (Frumento, Rotondo et al. 2002; Terness, Bauer et al. 2002).

Enfin, l'environnement hypoxique que l'on retrouve dans les tumeurs contribue également au dysfonctionnement immunitaire *in situ*. Ainsi l'HIF-1- α (HIF-1- α , Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha) relargué par les cellules stromales exerce un effet inhibiteur sur les lymphocytes (Semenza 2002; Mabeesh and Amir 2007; Rankin and Giaccia 2008).

6. Recrutement et activation des lymphocytes T régulateurs

Les tumeurs ont la capacité de contrôler les processus normaux de l'inflammation pour promouvoir leur progression. Or, la stimulation du système immunitaire entraîne la croissance d'effecteurs cellulaires et humoraux. Cette augmentation doit être quantitativement et qualitativement contrôlée pour parvenir à la mise en place d'une réponse immunitaire optimale. Au cours des 15 dernières années, les recherches se sont amplifiées sur les cellules T impliquées dans les phénomènes d'immunorégulation. Au début des années 1970, les travaux de Gheron et al. démontrèrent que la stimulation du système immunitaire par des antigènes d'origine thymique aboutissait à l'activation d'une population de lymphocytes T qui inhibe la différenciation des LT helper et des CTL (Gershon and Kondo 1970).

Ces observations sont considérées comme le point de départ du concept de cellules T régulatrices dont nous allons discuter dans le chapitre III-C.

7. Sécrétion des exosomes

Les exosomes sont des nano-vésicules sécrétées par la majorité des types cellulaires, cependant les quantités sécrétées par les cellules tumorales sont généralement plus importantes.

Les études menées sur des exosomes tumoraux sécrétés dans les pathologies associées à EBV, notamment dans le CNP, ont montré qu'ils avaient des capacités immunosuppressives et qu'ils constitueraient un des mécanismes d'échappement de la tumeur à la réponse immunitaire (Gourzones, Barjon et al. 2012). Le rôle immunomodulateur des exosomes sera décrit plus précisément dans le chapitre III-D.

C. Les lymphocytes T régulateurs dans l'échappement à la réponse immunitaire

1. Lymphocytes T régulateurs: généralités

Ce sont les travaux de Sakaguchi et al. (Sakaguchi, Fukuma et al. 1985) et de Don Mason et al. (Fowell and Mason 1993), au milieu des années 1980, qui apportèrent les preuves convaincantes de l'existence de ces cellules T régulatrices, notamment dans le contexte des pathologies auto-immunes. Néanmoins, la véritable percée dans ce domaine est due aux travaux de l'équipe de Sakaguchi qui, 10 ans après ses premiers résultats, décrivait une sous-population de lymphocytes T CD4⁺ présentant un taux élevé en chaîne alpha du récepteur de l'IL2 également appelée CD25, qui était essentielle à la prévention de l'auto-immunité (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). On sait que ces cellules baptisées cellules T régulatrices naturelles (Treg), s'accumulent dans les tumeurs et leurs ganglions drainants, et que leur présence est en forte corrélation avec la progression de la pathologie. De même, une déplétion en cellules T CD4⁺CD25⁺ induit une réponse immune antitumorale plus efficace, prouvant de fait leur rôle dans le contrôle et la détérioration de la réponse immune anti-tumorale (Onizuka, Tawara et al. 1999; Shimizu, Yamazaki et al. 1999; Gallimore and Sakaguchi 2002).

2. Définition des Lymphocytes T CD4⁺CD25⁺

Les cellules T régulatrices naturelles (Treg) sont caractérisées par leur capacité opérationnelle à réguler/supprimer la réponse immune. Elles sont hypo-répondantes à la stimulation *in vitro* via le TCR, mais de l'IL2 exogène, une forte costimulation avec des concentrations élevées d'anticorps monoclonaux anti-CD28 ou une stimulation mitogénique (qui court-circuite le TCR) peut surpasser leur état anergique (Sakaguchi 2004). Les Treg ont la capacité de supprimer la prolifération et la production cytokinique des cellules T effectrices CD4⁺ et CD8⁺, en inhibant notamment la transcription du gène de l'IL2 (Thornton and Shevach 1998; Thornton and Shevach 2000; Piccirillo and Shevach 2001); elles inhibent également la prolifération et la production d'anticorps par les lymphocytes B (Bystry, Aluvihare et al. 2001). L'induction des

fonctions suppressives des Treg est antigène-spécifique et les cellules Treg semblent avoir une plus forte avidité pour leur antigène spécifique si on les compare à leurs homologues CD4+CD25- : leur activité suppressive est ainsi provoquée par une concentration en antigène spécifique 10 à 100 fois plus faible que pour celle nécessaire aux T conventionnelles (Thornton and Shevach 2000). Plusieurs études ont montré que la régulation médiée par les cellules Treg était dépendante d'un apport continu en allo-antigènes (Scully, Qin et al. 1994) ou en antigènes tissu-spécifiques (Seddon and Mason 1999; Savina, Vidal et al. 2002), et que le retrait de la source d'auto-antigènes menait à une contraction rapide du pool de Treg tissu-spécifiques. Les Treg présentent par contre une prolifération active *in vivo* suivant leur activation antigénique (Walker, Chodos et al. 2003). Les cellules Treg naturelles jouent un rôle clé dans le maintien de la tolérance aux auto- et allo-antigènes *in vivo* (Maloy and Powrie 2001).

a) Caractérisation phénotypique

Les Treg se développent dans le thymus (Fontenot, Dooley et al. 2005) et constituent environ 5-10% des cellules T CD4+ périphériques chez les sujets sains (Jonuleit, Schmitt et al. 2001), mais chez l'homme, seuls les lymphocytes T CD4+CD25^{high}, qui ne représentent que 2-3% des cellules T CD4+ sont régulateurs (Baecher-Allan, Brown et al. 2001). Aujourd'hui encore, le meilleur marqueur de surface en corrélation à l'activité immunosuppressive reste une expression constitutive du CD25 ou récepteur α de l'IL-2 (IL2-R α), même s'il a été montré que des cellules potentiellement régulatrices existaient parmi les T CD4+CD25- (Stephens and Mason 2000). Ce qui est d'autant plus intéressant que l'IL-2 est également essentielle pour la génération de cellules Treg dans le thymus, pour leur survie, expansion et fonction suppressive en périphérie (Burchill, Yang et al. 2007). Des souris IL-2^{-/-} et des souris déficientes en IL2-R développent des lymphoproliférations T et des pathologies auto-immunes mortelles, très probablement suite à un manque de mort cellulaire induite par l'activation (AICD) et aussi un manque de cellules Treg (Sadlack, Lohler et al. 1995; Suzuki, Kundig et al. 1995). En plus du CD25 exprimé à la surface cellulaire, il a été montré que le facteur de transcription FoxP3 était un marqueur intracellulaire hautement spécifique des cellules Treg (Fontenot, Gavin et al. 2003; Hori, Nomura et al. 2003; Khattri, Cox et al. 2003). Foxp3, l'IL-2 et le CD25 sont essentiels au développement, à la fonction et à la survie des cellules Treg parce qu'une mutation ou un polymorphisme dans les gènes codant une de ces molécules peut causer ou prédisposer les sujets murins ou humains aux maladies auto-immunes (Mottet and Golshayan 2007). Le gène *foxp3* (*foxp3*, *forkhead box p3*) a été identifié comme le gène défectueux de la souche murine scurfy, qui a pour phénotype une mutation récessive liée à

l'X associée à une mortalité chez les mâles dans le mois suivant la naissance, par à une activation excessive des T CD4⁺ et à une surproduction de cytokines pro-inflammatoires (Brunkow, Jeffery et al. 2001). On identifia plus tard les mutations du gène humain orthologue *foxp3*, comme étant responsables d'IPEX (*IPEX, Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, autoimmune Enteropathy, X-linked*), et de XLAAD (*XLAAD, X-Linked Autoimmunity-Allergic Dysregulation*). Les patients portant ces mutations développent des pathologies auto-immunes organes spécifiques telles que T1D (*T1D, Type 1 Diabetes*), des thyroïdites, des maladies inflammatoires de l'intestin (IBD, *Inflammatory Bowel Disease*), des dermatites allergiques, des désordres hématologiques et des infections graves (Chatila, Blaeser et al. 2000; Bennett, Christie et al. 2001; Wildin, Ramsdell et al. 2001). Le rôle spécifique de FoxP3 dans la fonction des Treg a été souligné par le fait qu'une transduction rétrovirale de FoxP3 dans des cellules T CD4⁺CD25⁻ peut les convertir en cellules Treg fonctionnelles capables de supprimer la prolifération d'autres cellules T *in vitro* et d'inhiber le développement de maladies auto-immunes, telles que les colites et le T1D, médiées par les cellules effectrices dans des modèles expérimentaux *in vivo*.

En 2006, un nouveau pas important dans la discrimination des Treg a été franchi avec deux groupes qui ont parallèlement mis en évidence le fait que les Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ étaient CD127^{low} alors que les lymphocytes T effecteurs activés (CD25⁺) ou non activés (CD25⁻) étaient CD127^{high}. CD127 étant la chaîne α du récepteur à l'IL-7, un faible niveau d'expression pourrait indiquer que contrairement aux autres populations lymphocytaires T, les Treg n'ont pas de besoin spécifique en IL-7 pour se maintenir en périphérie (contrairement à l'IL-2, d'où le niveau d'expression de CD25 très élevé). Chez l'homme, la proportion de lymphocytes T CD4⁺CD25⁺CD127^{low} est de $6,35 \pm 0,26\%$ dans le sang de donneurs sains (Seddiki, Santner-Nanan et al. 2006). Dans la population T CD4⁺CD25⁺, il y a une très forte corrélation entre l'expression de FoxP3 et la faible expression de CD127. Des analyses moléculaires par Immuno Précipitation (IP) chromatine suggèrent que le promoteur du gène codant CD127 est une cible du facteur de transcription FoxP3. De plus, la surexpression de FoxP3 dans une souris transgénique conduit à une population étant de manière homogène CD127^{low} et possédant des propriétés suppressives (Ohta, Gorelik et al. 2006). CD127 serait donc un très bon marqueur de surface permettant d'identifier et d'isoler en combinaison avec le CD25 des populations pures de Treg (Ohta, Gorelik et al. 2006). Cependant, Liu *et al.* suggèrent que les lymphocytes T conventionnels mémoires pourraient également sous-exprimer ce marqueur suite à l'activation. Et ces cellules présenteraient des propriétés suppressives lors de tests fonctionnels *in vitro* au contraire des

cellules T CD4+CD25+CD127^{high} qui ne possèdent aucune activité suppressive (Ohta, Gorelik et al. 2006). Plus récemment, il a été montré que plus de $34 \pm 15\%$ des cellules humaines CD127^{low/-} n'exprimaient pas le marqueur FoxP3 et inversement, $30 \pm 7\%$ des cellules CD127⁺ sont FoxP3⁺ (Klein, Kretz et al.).

Les Treg naturelles expriment également le CTLA-4 (Takahashi, Tagami et al. 2000) et le GITR (*Glucocorticoid Induced TNFR-Related gen*) (McHugh, Whitters et al. 2002), mais comme pour le CD25 ou le FoxP3, ces marqueurs sont également surexprimés à la suite de l'activation des cellules T CD4+CD25⁻ naïves. Comparées aux cellules CD4+CD25⁻, les Treg expriment un taux élevé de CD45RO, pas de CD45RA et sont fréquemment CD62L^{high} (L-Selectine), indiquant plutôt une appartenance au pool de cellules activées ou mémoires (Baecher-Allan, Brown et al. 2001). Le CD103 (integrine $\alpha E\beta 7$), reconnaît la cadhérine épithéliale (E-Cadherin) responsable de la rétention tissue spécifique des lymphocytes, et a servi de marqueur d'identification d'une sous-population de cellules Treg. Cette molécule semble jouer un rôle important dans le homing et la rétention des Treg aux tissus inflammatoires (Lehmann, Huehn et al. 2002; Suffia, Reckling et al. 2005). On retrouve ainsi une accumulation préférentielle de Treg CD103⁺ au niveau des ganglions lymphatiques drainant de souris porteuses de tumeurs (Webster, Thompson et al. 2007). Les Treg expriment également des récepteurs de chimiokines tels que CCR4, CCR5 et CCR8. Ce qui implique que les cellules dendritiques matures, qui produisent du CCL17 et du CCL22 (ligands du CCR4), attireront préférentiellement les cellules Treg au site de présentation de l'antigène dans les organes lymphoïdes secondaires et les zones inflammatoires périphériques (Iellem, Mariani et al. 2001). On a également montré que les Treg sont attirées par le CCL4 (ligand du CCR5), une chimiokine produite par les cellules B activées, les CD et les macrophages (Bystry, Aluvihare et al. 2001), et leur *homing* aux allogreffons est dépendant de la voie de signalisation induite par CCR4 (Long, Haigh et al. 2005; Ishida and Ueda 2006). LAG-3 (*LAG-3, Lymphocyte Activation Gene-3*) ou CD223, une protéine membranaire exprimée uniquement à la surface des lymphocytes T et NK activés chez l'homme, présente des similarités de séquence avec CD4 ainsi qu'une localisation génomique commune, et partage un même ligand: les molécules du CMH de classe II. On a récemment montré que LAG-3 était sélectivement exprimé sur les Treg activées et qu'il avait un rôle dans leur fonction suppressive (Jiang, Jia et al. 2004; Liang, Workman et al. 2008). Plus récemment, l'expression de LAG-3 sur des cellules CD4+CD25+FoxP3⁺ a permis de définir une population de cellules régulatrices sécrétrices d'IL-10 et de TGF- β , qui est amplifiée au site tumoral et dans le sang de patients atteints de cancer (Camisaschi, Casati et al. 2010).

Le groupe de Lechler, a également rapporté que la galectine-1, une β -galactoside-binding protéine, était surexprimée de manière constitutive sur les Treg et était un agent important de la régulation médiée par ces cellules (Garin, Chu et al. 2007). Certaines études plus récentes ont impliqué le CD27 dans les mécanismes de régulation de la réponse immune notamment via son interaction avec le CD70 exprimé à la surface des cellules T activées (Jacquot, Kobata et al. 1997) ; et d'autres décrivent l'expression de ce membre de la superfamille des récepteurs au TNF comme un moyen de discriminer les Treg parmi les CD4+CD25+ après activation des cellules du sang périphérique (Duggleby, Shaw et al. 2007). Enfin, CD39 et CD70 sont des nouveaux marqueurs de surface des Treg qui révèlent une signature biochimique spécifique caractérisée par la génération d'adénosine péri-cellulaire qui présente un rôle important dans les mécanismes d'immuno-régulation cellulaire (Deaglio, Dwyer et al. 2007).

b) Mécanismes de suppression

CONTACT- OU CYTOKINE-DÉPENDANT

Le mécanisme précis d'action des Treg n'est pas encore très clair concernant leurs fonctions suppressives (figure 25), surtout au regard des conclusions divergentes sur l'importance du contact cellule-cellule versus la libération de cytokines (Mottet and Golshayan 2007).

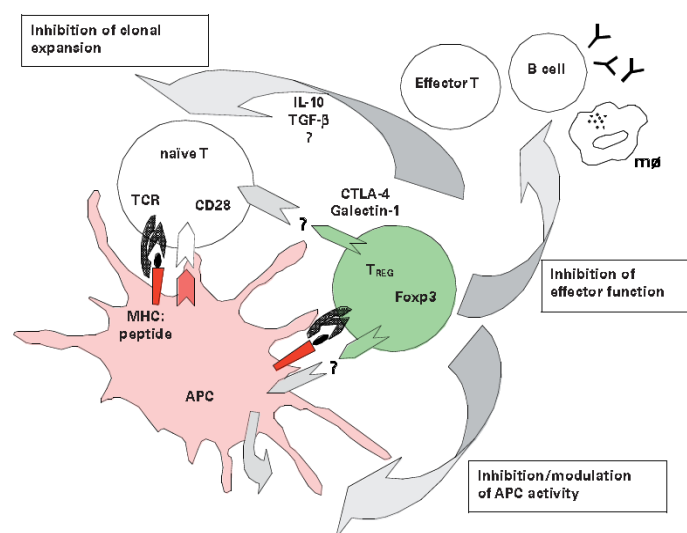


Figure 25 : Mécanisme de régulation de la réponse immune médiée par les Treg (Mottet and Golshayan 2007).

- Rôle des molécules de surface

In vitro, on a montré que les Treg inhibaient l'activation des cellules T effectrices par un mécanisme contact-dépendant plutôt que par des médiateurs solubles (Thornton and Shevach 1998). L'interaction directe T-T via les molécules de surface médie la suppression *in vitro*, puisque des Treg activées sont capables de supprimer la prolifération d'effecteurs en réponse à la stimulation du TCR et ce en absence complète de CPA (Sakaguchi 2004). *In vivo*, cependant, il est probable que des interactions plus complexes entre Treg, T effecteurs et CPA déterminent la réponse immune résultante. Le CTLA-4 (Read, Malmstrom et al. 2000; Takahashi, Tagami et al. 2000), le TGF- β membranaire (Nakamura, Kitani et al. 2001), le GITR (McHugh, Whitters et al. 2002), et la galectin-1 (Garin, Chu et al. 2007) semblent être des acteurs moléculaires dont le rôle fonctionnel est important puisque dans de nombreux modèles, leur inhibition par l'emploi d'anticorps monoclonaux spécifiques empêche la suppression médiée par les Treg *in vitro* et/ou *in vivo*.

L'activation de la protéine CTLA-4 exprimée à la surface des lymphocytes T activés transduit un signal négatif et atténue la réponse cellulaire. Cette molécule est présente à la surface des Treg et son activation est nécessaire au développement de leur fonction suppressive. Leur blocage par l'injection d'anticorps monoclonaux spécifiques ne réduit pas le nombre de Treg mais entraîne le développement de syndromes auto-immuns. *In vitro*, un tel blocage bloque l'activité immunosuppressive des Treg.

Une première étude a identifié l'expression du GITR dans des Treg en comparant le profil génétique des populations lymphocytaires T CD4+CD25+ et T CD4+CD25-, et l'analyse des deux populations non activées met en évidence une expression du GITR spécifique aux Treg. Par ailleurs, des Treg murins mis en culture en présence d'un anticorps anti-GITR et d'IL-2 prolifèrent fortement, contrairement aux T CD4+CD25-. De même, un anticorps spécifique pour le GITR abroge l'activité immunosuppressive des Treg cultivées *in vitro* avec des T CD4+CD25- ou des T CD8+. L'élimination des lymphocytes T GITR+ induit des pathologies auto-immunes chez la souris. Le groupe de C. Riccardi a évalué l'activité costimulatrice du GITR sur des Tconv. Cette protéine fait partie de la famille des récepteurs au TNF et présente une homologie de structure des domaines intracellulaires avec 4-1BB (CD137) et CD27, connues pour avoir un effet costimulateur sur la prolifération des T. Concernant une population lymphocytaire T GITR^{-/-}, ils ont observé un développement normal des organes lymphoïdes mais une influence sur l'activité des cellules T. Les lymphocytes T issus de ces souris sécrètent une quantité importante d'IL-2 et sont plus sensibles à

l'apoptose que leur homologues sauvages. Les derniers travaux de Ricardi mettent en évidence son rôle costimulateur sur les différentes populations T, comme augmentant l'activation des Tconv, CTL et Treg, stimulés par un anticorps anti-CD3. La costimulation par le GITR sur des Treg n'induit pas de sécrétion de cytokines contrairement au Tconv qui sécrèteront des quantités importantes en IL-2 et IFN- γ (Bianchini, Bistoni et al.; Ronchetti, Zollo et al. 2004).

Par ailleurs, Deaglio et al. ont montré que la régulation du catabolisme extracellulaire de l'adénosine par les Treg pouvait être responsable de la coordination des effets adénosinergiques immunosuppresseurs observés dans de nombreuses études (Deaglio, Dwyer et al. 2007). L'accumulation d'adénosine dans le domaine extra- et/ou immédiatement péri-cellulaire provoque en effet une réponse cellulaire immunosuppressive qui est médiée par plusieurs récepteurs purinergiques de type I (à adénosine), incluant A2A (Sitkovsky and Ohta 2005). De très nombreuses études génétiques indiquent que l'adénosine, opérationnelle via le récepteur A2A, joue un rôle critique, non-redondant, autonome et autochtone dans l'inhibition de la fonction des cellules T effectrices activées (Huang, Apasov et al. 1997; Armstrong, Chen et al. 2001). La modulation de la réponse inflammatoire par des mécanismes adénosinergiques a été testée contre l'immunité antitumorale médiée par les cellules T (Ohta, Gorelik et al. 2006). De plus, les réponses adénosinergiques engendrées via le récepteur A2A, peuvent inhiber la réponse immune et améliorer l'angiogénèse, ce qui favorise la croissance tumorale (Sitkovsky, Lukashev et al. 2008). La génération de l'adénosine péricellulaire est régulée au niveau des Treg par l'expression du CD39 ou *ENTPD1* (*Ectonucleoside TriPhosphate Diphosphohydrolase-1*) une ectoenzyme qui hydrolyse les ATP/UTP et ADP/UDP en leur nucléoside monophosphate respectifs (AMP/UMP). Les nucléosides monophosphates ainsi générés sont rapidement dégradés en nucléosides (adénosine/uracile) par les nucléotidases solubles ou membranaires telle que le CD73 (Ecto-5-prime-nucleotidase) présent sur les Treg (Kobie, Shah et al. 2006). L'étude de Deaglio montre ainsi que la coexpression de CD39 et de CD73 sur les Treg les distingue bien des autres cellules T, phénotypiquement et fonctionnellement, et que l'expression coordonnée de CD39/CD73 sur les Treg et du récepteur A2A sur les T effectrices activées génère des boucles de régulations immunosuppressives responsables des fonctions inhibitrices des Treg *in vivo* (Deaglio, Dwyer et al. 2007). Ces nouvelles études établissent aujourd'hui, que via la génération d'un facteur immunosuppresseur, l'adénosine, les ectoenzymes CD39 et CD73 sont des contributeurs importants de l'activité régulatrice des Treg (Bynoe and Viret 2008).

Enfin, une autre voie par laquelle les Treg peuvent médier leurs fonctions immunosuppressives consiste en la différenciation de cellules T naïves en cellules régulatrices

plutôt qu'en cellules T effectrices, notamment dans le cas de pathologies infectieuses. Ce phénomène a été nommé « tolérance infectieuse », et les candidats probables de cet effet sont les cytokines immunorégulatrices IL-10 ou TGF- β (Letterio and Roberts 1998; Moore, de Waal Malefyt et al. 2001; Jonuleit, Schmitt et al. 2002).

- Rôle des cytokines solubles

IL-10

Les modèles de colites et d'infection montrent que l'IL-10 est souvent cruciale au maintien de l'homéostasie immune et à la régulation médiée par les Treg (Kuhn, Lohler et al. 1993; Maloy, Salaun et al. 2003). Dans des modèles de transplantation, les anticorps monoclonaux anti-IL-10 ou anti-IL-10-R abrogent l'induction de la tolérance périphérique (Kingsley, Karim et al. 2002). L'IL-10 est produite par de nombreux types cellulaires tels que les cellules T, les monocytes, les macrophages, les cellules épithéliales, et a des effets pleiotropiques sur les cellules B, T et NK, les CD et les mastocytes. La voie de signalisation passant par la fixation de l'IL-10 à son récepteur résulte en une puissante inhibition de la prolifération, de la production des cytokines proinflammatoires et de la maturation et de la présentation des antigènes par les CD (Moore, de Waal Malefyt et al. 2001). L'IL-10 joue également un rôle pivot dans la fonction cellulaire des Treg, les cellules T CD4+CD25+ provenant de souris KO pour l'IL-10 sont ainsi moins suppressives que leurs homologues sauvages. L'équipe de Powrie a montré, dans un modèle de colite médié par les cellules T, que l'inflammation intestinale due aux cellules T CD4+CD25- pouvait être guérie par le transfert de cellules Treg. Dans ce modèle, durant la guérison de la colite, des cellules T Foxp3+ sécrétrices d'IL-10 avaient enrichie sélectivement la lamina propria du colon. L'administration d'un anticorps monoclonal anti-IL-10-R aux souris traitées avec les Treg abolissait complètement cette guérison. Ces découvertes ont été confirmées plus tard par l'analyse d'échantillon de colon, où une accumulation de cellules T CD4+CD25+Foxp3+ a été observée dans la lamina propria de patients présentant une IBD, une diverticulite, ou encore des colites membraneuses ou à CMV (Mottet, Uhlig et al. 2003; Uhlig, Coombes et al. 2006). Les cellules Treg productrices d'IL-10 ont été isolées de tumeurs (Zou, Barnett et al. 2004). IL-10 peut prévenir la maturation des CD, et en inhiber la différenciation à partir de précurseurs monocytaires (Cirone, Lucania et al. 2008). Bloquer les effets de l'IL-10 peut dans la plupart des cas renverser le dysfonctionnement des CD et restaurer la réponse immune. *In vitro* le silencing de l'IL-10 par ARN interference résulte en une

augmentation de la production d'IL-12 et une amélioration de la réponse des cellules T cytotoxiques aux épitopes tumoraux (Chhabra, Chakraborty et al. 2008).

TGF- β

Le TGF- β est le prototype d'une famille de polypeptides impliqués dans le contrôle de la croissance, production et développement de la matrice extracellulaire. Il existe trois isoformes chez les mammifères (TGF- β 1, - β 2, - β 3), et le TGF- β 1 a été identifié comme molécule immunorégulatrice (Letterio and Roberts 1998; Gordon and Blobel 2008). La plupart des modèles de régulation immune présentant un rôle de l'IL-10 implique souvent le TGF- β . La production et l'action de ces deux cytokines est en relation directe dans des boucles de rétrocontrôles positifs dans lesquelles l'IL-10 améliore l'expression du TGF- β et vice-versa. Il semblerait que l'IL-10 ait une action locale au site d'inflammation, alors que le TGF- β aurait un effet plus systémique sur la réponse immune. Les résultats concernant la nécessité de l'expression du TGF- β par les Treg *in vitro* et *in vivo* sont encore controversés (Powrie, Carlino et al. 1996; McHugh, Whitters et al. 2002), et il semble que la régulation soit dictée de manière primaire par la sensibilité des cellules T effectrices au TGF- β (Gorelik and Flavell 2000; Fahlen, Read et al. 2005).

3. Activité cytotoxique des T régulateurs

Des travaux ont permis de documenter la capacité des Treg Foxp3+ à lyser les cellules effectrices afin de pouvoir contrôler le développement de la réponse immunitaire (figure 26). Cette cytotoxicité serait médiée par la sécrétion de perforine et de granzymes A et B ; et toucherait les cellules T effectrices, les monocytes et les DCs, cellules clés dans l'initiation et l'amplification de la réponse immunitaire (Grossman, Verbsky et al. 2004; Gondek, Lu et al. 2005; Zhao, Thornton et al. 2006).

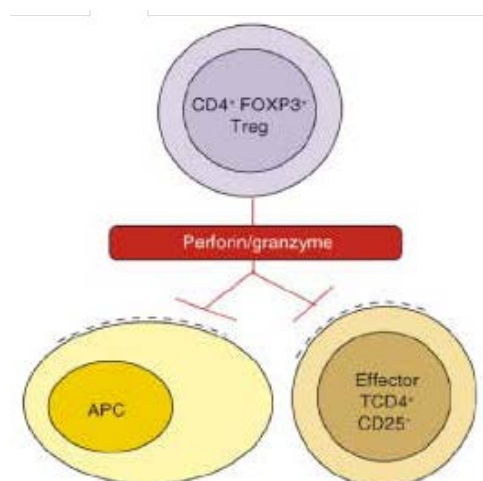


Figure 26 : Cytotoxicité des T régulateurs. Les Treg sécrètent des perforines et des granzymes leur permettant de lyser les cellules T effectrices et les CPA. (Miyara and Sakaguchi 2007)

L'implication du granzyme B dans la suppression médiée par les Treg a été observée dans l'inhibition des réponses effectrices anti-tumorale T et B et dans les mécanismes de tolérance de greffe. Cette sécrétion de granzyme B semble être induite par la stimulation antigénique des Treg via le TCR et leur costimulation par le CD28, en présence d'IL-2. En effet, la signalisation par le TCR induit la voie de signalisation Pi3k / mTOR, et l'inhibition de ces voies par le LY294002 ou la rapamycine inhibe la synthèse de granzyme B (Efimova and Kelley 2009).

L'ensemble de ces données suggère que le mécanisme suppresseur des Treg dépend du type cellulaire régulé, du contexte physiopathologique et surtout de la fonction cellulaire régulée. De plus, il est maintenant bien démontré que l'induction de l'activité suppressive des Treg requiert une stimulation antigénique via le TCR et que donc leur activation se ferait de manière antigène spécifique. Cependant la suppression réalisée par les Treg se ferait de manière antigène non spécifique bien qu'exercée dans le micro-environnement proche de la CPA présentant l'antigène spécifique (Joffre, Gorsse et al. 2004; Yamaguchi, Hirota et al. 2007).

4. T régulateurs et échappement tumoral au système immunitaire

Les travaux de l'équipe de Robert North au cours des années 1980 ont apporté la preuve du développement d'une population suppressive au cours de la mise en place de la réponse immune anti-tumorale (North and Bursaker 1984). Cette équipe a montré par la suite que ces T suppresseurs appartenaient à la population des T CD4+ et qu'une déplétion en T CD4+ pouvait résulter en une régression de la tumeur (Awwad and North 1988).

Au cours du développement d'une tumeur, les TAA exposés à la surface des CD participent à l'activation des Treg. Cette hypothèse est étayée par la présence de forts taux de Treg dans les tumeurs isolées de patients (Woo, Chu et al. 2001). De nombreuses études mettent en évidence le fait que la génération et l'activation de cellules T effectrices antitumorales sont entravées par la population de Treg. L'élimination des Treg chez la souris permet en effet la mise en place d'une réponse immune antitumorale plus efficace (Shimizu, Yamazaki et al. 1999). Une déplétion en Treg par l'utilisation d'anticorps anti-CD25 facilite le rejet de plusieurs lignées cellulaires murines transplantables, incluant des mélanomes, fibrosarcomes, leucémies et des carcinomes colorectaux. Ces études impliquent que les Treg inhibent normalement la génération de réponses immunes anti-tumorales efficaces T dépendantes (Onizuka, Tawara et al. 1999; Shimizu, Yamazaki et al. 1999; Gallimore and Sakaguchi 2002). Ces découvertes ont été confirmées par les données cliniques où la prévalence des Treg a été retrouvée augmentée dans le sang périphérique et le

microenvironnement tumoral des patients atteints d'un cancer (Kingsley, Karim et al. 2002; Liyanage, Moore et al. 2002; Ichihara, Kono et al. 2003; Viguier, Lemaitre et al. 2004; Zou, Barnett et al. 2004).

Plusieurs mécanismes de recrutement des Treg au site tumoral ont été décrits : (i) le trafic : les Treg CCR4⁺ circulantes du thymus, des ganglions lymphatiques, de la moelle osseuse (Zou, Barnett et al. 2004) et du sang périphérique sont attirées par le CCL22 (Zou, Barnett et al. 2004) produit abondamment au site tumoral (figure 27a), (ii) la différenciation : le microenvironnement tumoral produit des molécules qui peuvent changer le phénotype des CPA (Gabrilovich 2004; Kryczek, Zou et al. 2006), et ces CPA modifiées stimulent la différenciation des Treg en retour (figure 27b), (iii) l'expansion : les CD peuvent stimuler l'expansion des Treg, de même que le microenvironnement tumoral (Yamazaki, Iyoda et al. 2003; Tarbell, Yamazaki et al. 2004; Ghiringhelli, Puig et al. 2005) (figure 27c), (iv) la conversion : des cellules Tconv peuvent être converties en Treg par le TGF- β que l'on trouve en grande quantité dans le microenvironnement tumoral (Strome, Dong et al. 2003; Fantini, Becker et al. 2004; Liang, Alard et al. 2005) (figure 27d). La tendance globalement observée est donc bien une augmentation de la fréquence des Treg dans une large variété de tissus tumoraux comparativement aux mêmes tissus sains (Betts, Clarke et al. 2006). L'implication de ces observations dans le contexte des travaux précédents sur les modèles animaux, est que ces cellules suppriment effectivement la réponse immune antitumorale (Gallimore and Godkin 2008).

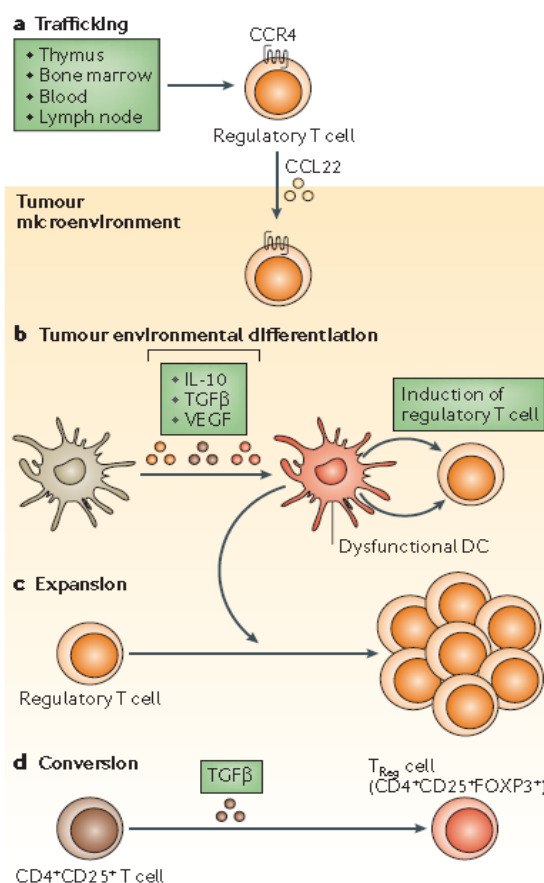


Figure 27 : Origine des cellules T régulatrices dans le microenvironnement tumoral (Kryczek, Zou et al. 2006).

La réduction de l'immunité T spécifique des antigènes tumoraux est probablement plus le résultat d'une accumulation de Treg que d'une activité suppressive supérieure dans le microenvironnement tumoral même si des études récentes tendent à prouver le contraire (Jie, Gildener-Leapman et al. 2013). Plusieurs études ont montré qu'il existait différentes voies par lesquelles les Treg pouvaient supprimer la réponse immune antitumorale : (i) les Treg induisent l'expression de B7-H4 par les CPA qui en retour arrêtent le cycle cellulaire des cellules T lors de la reconnaissance T/CPA (Sica, Choi et al. 2003; Kryczek, Zou et al. 2006) (figure 28a), (ii) les cellules Treg activées tuent directement les cellules T et les CPA par la voie perforine granzyme (Grossman, Verbsky et al. 2004; Cao, Cai et al. 2007) (figure 28b), (iii) les Treg *CTLA-4+* induisent l'expression d'IDO par les CPA, et ces dernières suppriment l'activation des cellules T en réduisant la disponibilité en tryptophane (Fallarino, Grohmann et al. 2003; Mellor and Munn 2004) (figure 28c), (iv) la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β par les Treg inhibe l'activation des T et supprime la fonction des CPA (inhibition de la sécrétion de l'IL12, de l'expression des molécules de présentation et de costimulation) (figure 28d).

On peut également ajouter à cela des mécanismes d'action mineurs comme la consommation compétitive de l'IL-2 (McHugh, Whitters et al. 2002; Jiang, Jia et al. 2004; von Boehmer 2005). L'IL-2 est très souvent en faible quantité dans le milieu tumoral, et les Tconv en sont la principale source. Or cette cytokine est essentielle au développement, à la survie et à l'action des cellules T, et seules les Treg expriment de manière constitutive la forme la plus avide du récepteur de l'IL-2, à savoir l'hétérotrimère CD25 (chaîne α)/CD22 (chaîne β)/CD132 (chaîne γ). Comme la plupart des *TIL* d'une tumeur établie sont des Treg (Zou, Barnett et al. 2004; Buschow, Liefhebber et al. 2005), ils s'y développent mieux, en défaveur des Tconv anti-tumoraux.

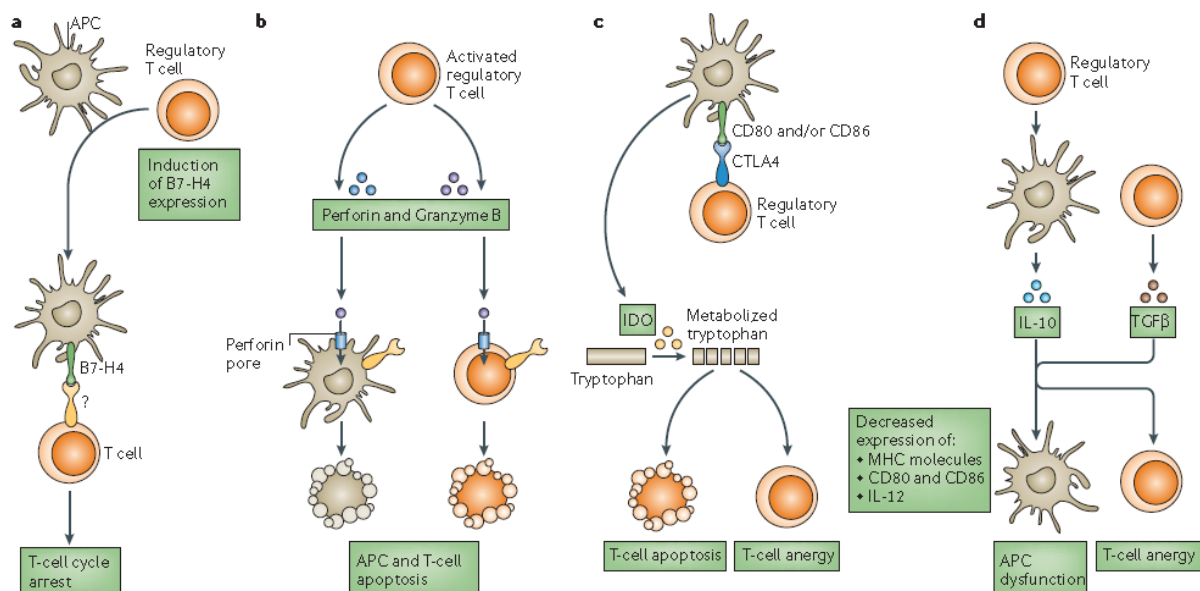


Figure 28 : Mécanismes suppressifs des Treg dans le microenvironnement tumoral (Kryczek, Zou et al. 2006).

5. Thérapies ciblant les T régulateurs dans les cancers

Alors que le système immunitaire devrait empêcher et prévenir l'établissement et la progression du cancer, certaines cellules tumorales échappent au système immunitaire et il est bien décrit que les Treg facilitent cet échappement. Par ailleurs, les Treg pourraient constituer un facteur responsable de l'échec ou du succès limité de l'immunothérapie des cancers chez l'homme. C'est pourquoi, afin d'augmenter l'efficacité de l'immunothérapie et éviter la « barrière » Treg, on devrait limiter leur nombre et inhiber leurs fonctions notamment chez les patients ayant un cancer à un stade avancé. En effet, on trouve chez la majorité des patients atteints d'un cancer, une forte présence des Treg au niveau du microenvironnement tumoral ainsi qu'au niveau systémique. La mise en évidence des mécanismes de suppression des Treg a ouvert une nouvelle voie à la recherche à visée thérapeutique ayant pour but d'inhiber ces mécanismes. Plusieurs stratégies ont été adoptées afin d'inhiber la tolérance périphérique induite par les Treg. Ces stratégies ont pour objectif : (i) la déplétion des Treg, (ii) l'inhibition de leurs fonctions, (iii) le blocage de leur recrutement ou encore (iv) la modulation de la plasticité des cellules T.

Dans ce chapitre, j'ai choisi de décrire quelques une de ces stratégies visant à augmenter les chances de succès en immunothérapie des cancers. Parmi les stratégies visant à dépléter les Treg, certaines avaient pour objectif de bloquer le CD25 résultant en la déprivation des Treg en IL-2 et induisant ainsi leur mort. Le Denileukin diftotox, par exemple, est une molécule constituée d'IL-2 humaine conjuguée à la toxine de la diphtérie et qui est capable de se lier spécifiquement

sur le récepteur de l'IL-2 (CD25). Après internalisation, la toxine est relarguée entraînant la mort des Treg. Le Denileukin diftotox a fait l'objet d'un essai clinique de phase II, sur des patients atteints d'un mélanome en stade IV. Les auteurs ont observé une diminution des Treg corrélée à une augmentation concomitante de la prévalence des cellules T CD3⁺IFN- γ ⁺ dans le sang des patients, et par la résurgence des T CD8⁺ spécifiques des antigènes du mélanome. Sur les 60 patients traités, 10 ont présenté une réponse partielle, 3 une maladie stable et 9 des réponses mitigées. D'une manière intéressante, près de 50% des patients chimio/immuno naïfs ont présenté une réponse partielle. Par ailleurs, il a été constaté, chez les répondeurs partiels, un gain de survie significatif après un an comparativement aux patients avec une maladie en progression (Telang, Rasku et al. 2011).

D'autres stratégies ont eu pour objectif d'inhiber les fonctions suppressive des Treg en ciblant différentes molécules exprimées d'une manière constitutive à leur surface et qui participent à la suppression de la réponse immunitaire. Selon la molécule, un agoniste ou un anticorps neutralisant étaient entre autres utilisés pour inhiber sa fonction. CTLA-4, GITR, OX40 ou encore RANKL ont été ciblés afin d'inhiber la fonction immunosuppressive du Treg. Par exemple, des anticorps anti-CTLA-4 ont été développés, tels que ipilimumab et tremelimumab. Le premier, utilisé en monothérapie ou en thérapie combinée avec une vaccination peptidique, augmente la survie de patients traités auparavant pour un mélanome métastatique (Hodi, O'Day et al. 2010). Le second quant à lui, favorise la réponse anti-tumorale, qui s'est avérée résulter plus d'une activation des T effecteurs que d'une modulation des Treg (Khan, Burt et al. 2011).

Par ailleurs, certaines stratégies thérapeutiques ont cherché à limiter le recrutement des Treg au sein de la tumeur. Pour ce faire, des études ont ciblé l'interaction chimiokine/récepteur telle que l'interaction CCL22-CCR4 observée dans le carcinome ovarien (Curiel, Coukos et al. 2004). CCL22 n'est pas exprimée exclusivement par les cellules tumorales puisqu'elle est également exprimée par d'autres cellules comme les macrophages associés à la tumeur. De plus, les chimiokines ont été impliquées dans le recrutement sélectif et la rétention des Treg au niveau du site tumoral (Byrne, Mills et al. 2011). Or, l'ubiquitinylation de la chimioattraction dans le système immunitaire rendrait le blocage spécifique du recrutement des Treg semble difficile vu le risque d'avoir des effets similaires sur les T effecteurs. Cependant, il existe des exemples dans lesquels le blocage d'une telle interaction cible spécifiquement les Treg tels que l'inhibition de la voie de signalisation CCL5-CCR5 dans un modèle murin où il a été observé une inhibition de la croissance

de tumeurs pancréatique (Tan, Goedegebuure et al. 2009), ou encore l'utilisation de la gallate de méthyle chez le rat qui a montré une inhibition de l'infiltration des Treg au sein de la tumeur, a réduit la croissance tumorale et a augmenté la survie. La gallate de méthyle étant en effet un inhibiteur des voies de signalisation des récepteurs de chimiokines CCR4 et du CXCR4 (Lee, Lee et al. 2010).

Et enfin, parmi les stratégies d'immunothérapie les plus en vogue ces dernières années, il y a l'utilisation d'anticorps anti-PD-1 et PD-L1 afin d'inhiber les Treg ou la conversion de T conventionnels en Treg. La liaison de PD-L1 à son récepteur PD-1 après la stimulation du TCR induit, en effet, la diminution des réponses T effectrices et le développement des Treg en périphérie en basculant la balance en faveur de la tolérance immunitaire (Francisco, Sage et al. 2010, Merelli, Massi et al. 2013). Or, il est bien connu que la tolérance dans les cancers est souvent associée à un mauvais pronostic. La neutralisation de PD-1 et/ou PD-L1 chez les patients atteints d'un cancer ont montré des résultats très encourageants surtout dans le mélanome, mais également dans le cancer rénal et le cancer du poumon. Les résultats récents de nombreux essais cliniques, utilisant des anticorps monoclonaux contre ces deux molécules, montrent clairement un gain dans le taux et la qualité des réponses et une prolongation significative de la survie (Robert, Soria et al. 2013 ; Eggermont, Kroemer et al. 2013).

6. T régulateurs et infection par EBV

Afin d'éviter la réponse immunitaire de l'hôte, les virus persistants ont recours à un certain nombre de stratégies d'échappement immunitaire. Un mécanisme particulier d'échappement immunitaire adopté par EBV a suscité l'intérêt puisque les chercheurs ne sont pas parvenus à obtenir une réponse satisfaisante à l'absence d'immunogénicité de l'antigène de latence LMP1, exprimé dans les pathologies malignes associées à l'EBV tels que le LH et le CNP. A la lumière des arguments qui sont pour une activité accrue des Treg dans les infections virales persistantes et de recherches antérieures démontrant la production de la cytokine immunosuppressive, IL-10, par des cellules T CD4⁺ stimulées in vitro avec des LCL autologues (Wilson, Hopkins et al. 2001), Vickers et al. ont émis l'hypothèse que LMP1 induirait l'activité des Treg et ont travaillé sur cette théorie (Marshall, Vickers et al. 2003).

La stimulation de PBMC isolées de donneurs EBV-séropositifs avec la protéine LMP1 purifiée induit fortement la sécrétion de l'IL-10 par les lymphocytes T CD4⁺. Des expériences

complémentaires ont permis d'établir que l'ajout de LMP1 aux PBMC de donneurs sains abouti à l'inhibition de la prolifération cellulaire et la libération de l'IFN- γ . Cette suppression était dépendante de l'IL-10 puisque la neutralisation de cette cytokine a inhibé l'activité immunosuppressive observée (Marshall, Vickers et al. 2003). Le même groupe a analysé les fonctions des T CD4⁺ issues de patients atteints d'un LH et a rapporté des niveaux élevés de lymphocytes T régulateurs sécréteurs d'IL-10 (Tr1) associés à une activité suppressive importante parmi les lymphocytes infiltrants le LH. Les Treg décrits étaient phénotypiquement identiques aux Tr1 induits, cependant, l'activité suppressive des Tr1 est essentiellement médiée par un mécanisme lié seulement à l'IL-10 alors que ce groupe décrit une activité régulatrice qui est inhibée par la prévention des contacts cellule-cellule et en bloquant CTLA-4 (Marshall, Christie et al. 2004).

Le groupe de Khanna est allé plus loin et a étudié la capacité des Treg à supprimer les réponses aux antigènes de latences d'EBV dans le LH. Ils ont montré qu'un niveau élevé d'expression de LAG-3, marqueur de Treg (Huang, Workman et al. 2004), était associé à la perte de la fonction des cellules T spécifiques de LMP-1/2 parmi les lymphocytes infiltrants le LH. Ils ont également montré que les T CD4⁺LAG-3⁺ possédaient des propriétés régulatrices (Gandhi, Lambley et al. 2006). Ils ont en effet montré une association entre LAG-3 et l'expression des gènes d'EBV dans les tissus tumoraux et établi que LAG-3 était exprimé plus fréquemment sur les lymphocytes que FoxP3, et que généralement les lymphocytes n'exprimaient pas fortement les deux protéines au même temps. Aucune association n'a été trouvée entre FoxP3 et LAG-3, l'histologie ou le statut EBV. Dans le sang périphérique, les lymphocytes T CD4⁺LAG-3⁺ étaient enrichies en CTLA-4^{high} et GITR^{high} mais pas en FoxP3 et étaient présents à une fréquence plus élevée chez les patients ayant une maladie active que ceux ayant une maladie inactive (Gandhi, Lambley et al. 2006).

Pour tenter de comprendre la spécificité des Treg dans l'infection par EBV, Voo et al ont entrepris des expériences in vitro dans lesquelles ils ont stimulé des PBMC avec des peptides EBNA1. Ils ont indiqué que l'expansion des lignées de cellules T inclus des clones T CD4⁺ Helper mais également des T CD4⁺ régulateurs avec un phénotype régulateur et une activité suppressive confirmée par des essais fonctionnels (Voo, Peng et al. 2005). Les deux types cellulaires reconnaissent les mêmes épitopes d'EBNA 1. Le mécanisme de suppression était contact-cellulaire dépendant bien que certains clones demeuraient capables de supprimer même dans des essais de

coculture en transwell indiquant un facteur inhibiteur soluble qui n'était ni l'IL-10 ni le TGF- β (Voo, Peng et al. 2005).

En raison de la nature immunosuppressive des lymphocytes infiltrant LH et la capacité de LMP- 1 à stimuler les Treg chez les donneurs sains, Marshall et al ont suggéré que LMP -1 était important dans la génération d'une forte activité des Treg dans le LH. Ils ont comparé les réponses Th1 , Th2 et Treg à LMP- 1 dans des PBMC et lymphocytes infiltrants de patients LH EBV négatifs et positifs. Les patients LH EBV positifs présentaient un nombre accru, ex vivo, de cellules sécrétant l'IL- 10 et exprimant CTLA -4- par rapport aux patients LH EBV négatifs à la fois en périphérie et dans les ganglions lymphatiques. La réponse des PBMC et des lymphocytes infiltrants à LMP-1 chez la plupart des patients étaient caractérisée par la sécrétion d'IL-10 (Dukers, Meij et al. 2000; Marshall, Vickers et al. 2003).

Le rôle joué par les cellules Treg dans l'infection par EBV est intéressant pour deux raisons principales ; (i) l'élucidation du rôle des Treg dans l'infection primaire à EBV pourrait exposer les possibilités d'immunomanipulation au stade initial de l'infection à limiter les symptômes de la MI et prévenir le risque ultérieur de LH ou de CNP. (ii) EBV est un virus oncogène et l'infection est associée au développement d'un certain nombre de pathologies tumorales d'origine lymphoïde et épithéliale (Young and Rickinson 2004). La fréquence des Treg et la capacité fonctionnelle peuvent affecter le niveau de la persistance virale et donc la clarification du rôle des Treg pourraient donner une idée sur le développement des tumeurs associées à EBV (Marshall, Christie et al. 2004). Voo et al ont décrit la génération de lignées T CD4+ par l'intermédiaire d'une stimulation avec des peptides d'EBV. Après une analyse phénotypique, la lignée cellulaire T contenait des Treg en plus que des cellules T CD4 conventionnelles. Ces données mettent en évidence la nécessité de déterminer la spécificité des Treg dans les maladies associées à EBV puisqu'un vaccin contre le cancer qui provoquerait l'expansion des Treg au détriment des T CD4 Helper, pourrait avoir de graves conséquences pour le patient (Voo, Peng et al. 2005).

Une publication antérieure avait montré que des lymphocytes T suppresseurs clonés chez deux patients ayant une MI qui ne montraient pas de cytotoxicité, réduisaient la production d'immunoglobulines EBV-induite et retardaient la croissance de cellules immortalisées (Wang, Blaese et al. 1987). En outre, le gène lytique d'EBV BCRF1, qui code pour un homologue de l'IL-10, est supposé s'exprimer afin de réguler négativement les réponses immunitaires cytotoxiques lors

de la réplication virale (Suzuki, Tahara et al. 1995). Cela pourrait alors favoriser un environnement propice à l'induction des Treg.

Enfin dans le CNP, les Treg sont constamment détectés dans les biopsies. Lau et al ont montré une expansion significative des cellules CD4+CD25high dans 56 patients ayant un CNP comparés à des contrôles sains. Ils ont reporté qu'une moyenne de 12% des cellules infiltrant la tumeur sont CD4+CD25highFoxP3+ et qu'une moyenne de 8,2 % des cellules T circulantes sont CD4+CD25high compromettant en partie les chances de réussite d'une stratégie d'immunothérapie ciblant les cellules T (Lau, Cheng et al. 2007).

Par ailleurs, les exosomes produits en quantité importante par les cellules de CNP, constituent un autre acteur de l'immunosuppression qui pourrait affecter la réussite d'une stratégie d'immunothérapie ciblant les T CD4+.

D. Exosomes et échappement au système immunitaire

1. Exosomes: généralités

a) Découverte

Le terme exosome a été utilisé pour la première fois en 1981 afin de décrire des microvésicules présentant une activité 5' nucléotidase et qui sont sécrétées par des lignées cellulaires néoplasiques (Trams, Lauter et al. 1981). Quelques années plus tard, les groupes de Stahl et de Johnstone ont montré la sécrétion de vésicules d'origine endocytaire par les réticulocytes en culture (Harding, Heuser et al. 1983; Greenspan, Greenspan et al. 1985). Ces petites vésicules d'un diamètre inférieur à 100 nm sont originaires des endosomes. En utilisant la microscopie électronique, les auteurs ont en effet observé la fusion des endosomes multivésiculaires avec la membrane plasmique résultant en la libération des vésicules internes dans le milieu extracellulaire. Ces vésicules ont été purifiées par ultracentrifugation du surnageant de culture et appelées exosomes. Bien que très intéressants, ces résultats demeurent controversés les endosomes tardifs étaient alors considérés comme des compartiments transitionnels, dont le contenu était destiné à la dégradation par les lysosomes et non pour le recyclage au niveau de la surface cellulaire. Afin d'expliquer la sécrétion des granules cytotoxiques Peters et al. ont montré en 1989 l'existence des profils de fusion entre les endosomes tardifs et la membrane plasmique dans les lymphocytes T cytotoxiques (Peters, Geuze et al. 1989). En 1996, il

a été décrit que les lymphocytes B transformés par EBV sécrétaient des vésicules internes des endosomes multivésiculaires et c'est à partir de cette date que la fonctionnalité des exosomes a commencé à être plus largement étudiée (Raposo, Nijman et al. 1996). Les exosomes dérivés des cellules B se forment dans les compartiments riches en molécules de CMH de classe II et contiennent des complexes peptide-CMH II qui seront présentés aux cellules T spécifiques de l'antigène. Ces résultats furent ensuite étendus aux cellules dendritiques (Zitvogel, Regnault et al. 1998; Thery, Regnault et al. 1999). L'implication possible des exosomes dans différentes pathologies tels les cancers, les maladies infectieuses liées à des virus (HIV, HSV) (Gould, Booth et al. 2003; Fevrier, Vilette et al. 2004), maladies à prions (Fevrier, Vilette et al. 2004), ainsi que la maladie d'Alzheimer (Rajendran, Honscho et al. 2006), a stimulé les recherches sur l'énigme de ces vésicules.

Les exosomes sont une classe de nano-vésicules de 30 à 100 nm de diamètre (Jieyong, Zhong et al. 2006), purifiables sur un gradient de sucrose à une densité entre 1,13 et 1,19 g/mL et sécrétées par quasiment tous les types cellulaires, notamment les réticulocytes, les lymphocytes T cytotoxiques, les lymphocytes B, les cellules dendritiques, les mastocytes, les plaquettes et les cellules épithéliales (Wubbolts, Leckie et al. 2003; Kharaziha, Ceder et al. 2012). Du fait de leur origine endosomale, les exosomes sont riches en molécules de CMH II et en tétraspanines (CD37, CD53, CD63, CD81, CD82...).

b) Biogenèse

La biogenèse des exosomes a lieu dans les endosomes multivésiculaires à la suite de l'invagination de la membrane vers l'intérieur du compartiment. Les endosomes multivésiculaires sont le carrefour de tri cellulaire. L'essentiel des protéines et des lipides destinés à la dégradation ou à la libération dans le milieu extérieur y sont stockés jusqu'à leur fusion avec le lysosome ou la membrane plasmique cellulaire (Luzio, Rous et al. 2000). Le recrutement des protéines, des lipides et des récepteurs vers l'endosome multivésiculaire peut être dépendant ou non de la machinerie Endosomal Sorting Complexes Required for Transport (ESCRT) (Hurley 2008).

- Voie ESCRT

La machinerie ESCRT est composée de quatre complexes protéiques ESCRT-0, -1, -II, -III et de facteurs tels que la protéine Alix et d'une ATPase VSP4. Le complexe ESCRT-0 et ESCRT-I est essentiel à la reconnaissance et au recrutement des protéines mono ubiquitinylées aux

endosomes (Hurley 2008). S'en suit le remodelage de la membrane des endosomes via les interactions protéine-protéine et protéine-lipide favorisant l'invagination de la membrane par les complexes ESCRT-II et ESCRT-III et les facteurs Alix et VSP4 (figure 29) (Pisitkun, Shen et al. 2004; Bobst, Day et al. 2005). Finalement, c'est le complexe ESCRT-III qui est responsable du détachement des vésicules s'accumulant dans la lumière endosomale (Wollert, Wunder et al. 2009).

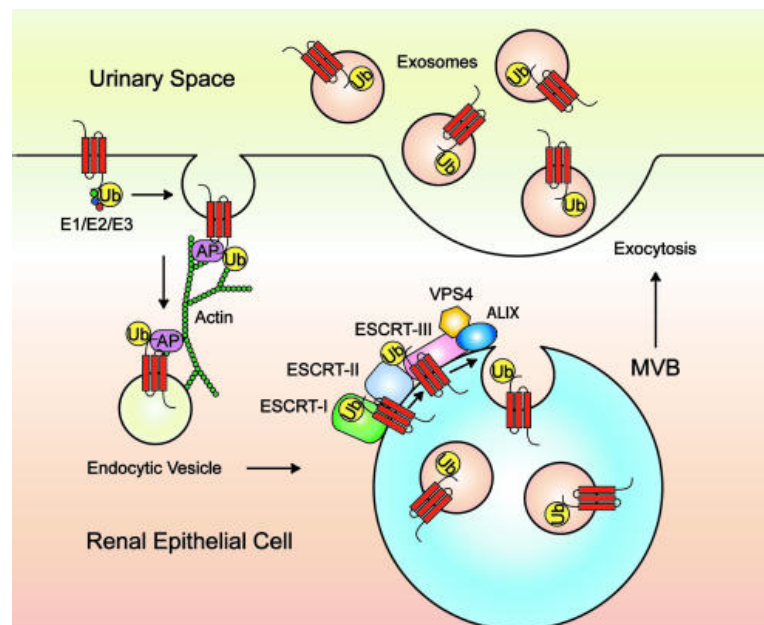


Figure 29: Le rôle de la machinerie ESCRT dans la biogenèse des exosomes. (Pisitkun, Shen et al. 2004).

Toutefois, la biogenèse des exosomes fait aussi intervenir des molécules indépendantes de la voie ESCRT comme les acides lysobisphosphatidiques (LBPA) qui sont très abondants dans la membrane de l'endosome (Matsuo, Chevallier et al. 2004; Subra, Laulagnier et al. 2007), les céramides (Trajkovic, Hsu et al. 2008) ou les protéines annexines (White, Bailey et al. 2006). De plus, Matsuo et al. ont observé qu'en milieu acide, la concentration de LBPA est augmentée induisant le bourgeonnement spontané de la membrane endosomale (Matsuo, Chevallier et al. 2004). Le bourgeonnement de la membrane conduit à la formation des exosomes (Subra, Laulagnier et al. 2007).

Les céramides, lipides de la famille des sphingomyélines, sont responsables de l'agrégation lipidique à la surface de la membrane de l'endosome. Ce phénomène forme les microdomaines ou encore les radeaux lipidiques favorisant le bourgeonnement des exosomes (Trajkovic, Hsu et al. 2008).

- *Autre voie*

Une autre voie ESCRT-indépendante est celle de l'annexine-1. En effet, l'accumulation des récepteurs de facteur de croissance épidermique (EGF), après stimulation, passe par la voie de l'annexine-1 (White, Bailey et al. 2006). Les mécanismes exacts ne sont pas connus. Cependant, sans l'annexine-1, l'accumulation du récepteur de l'EGF est très fortement atténuée.

Après avoir bourgeonné, les vésicules s'accumulent dans la lumière endosomale jusqu'à ce que l'ensemble du compartiment fusionne avec la membrane plasmique, sécrétant alors les exosomes dans le milieu extracellulaire (figure 30) (Stoorvogel, Kleijmeer et al. 2002; Gauvreau, Cote et al. 2009). Il est intéressant de noter que le pH dans l'exosome reste le même que celui du cytoplasme, c'est-à-dire pH=7,5, contrairement à celui du MVB (corps multi-vésiculaire) qui est plus acide (pH=5) (Matsuo, Chevallier et al. 2004).

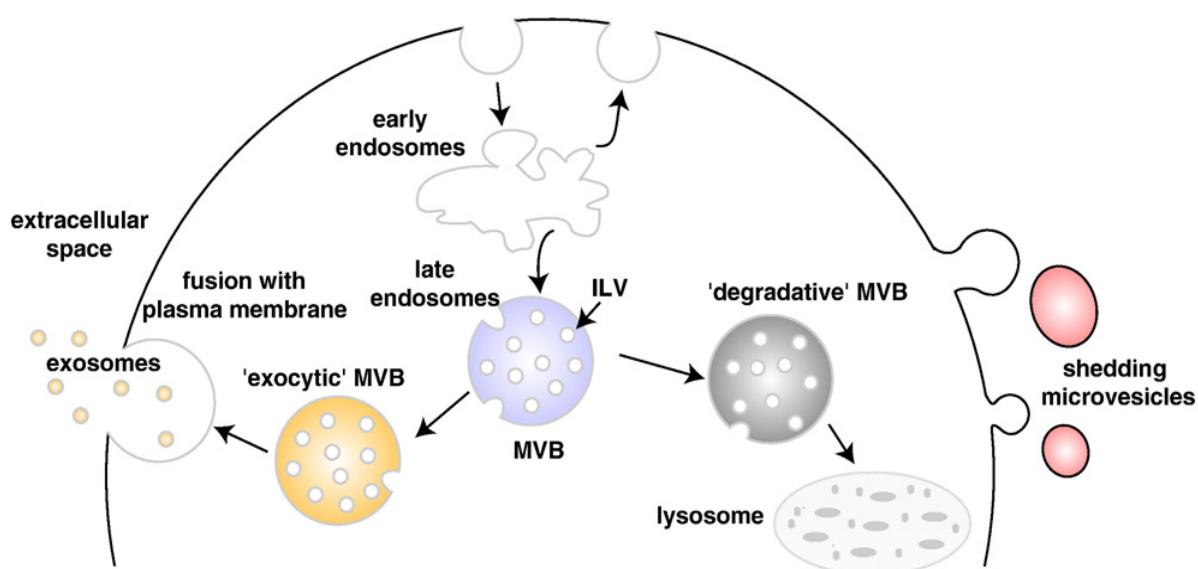


Figure 30 : Représentation schématique de la libération des exosomes dans le milieu extracellulaire.
(Mathivanan, Ji et al. 2010).

La fusion des exosomes avec la membrane plasmique cellulaire fait intervenir une GTPase (Rab27a) couplée à une protéine effectrice (Slp4-a). La famille des Rabs contrôle le trafic vésiculaire intracellulaire par le recrutement de protéines effectrices à la surface membranaire ou encore par la migration de certaines organelles tel l'endosome multivésiculaire jusqu'à la membrane plasmique cellulaire (Stenmark 2009; Thery, Ostrowski et al. 2009). La synaptogamin like protein de type 4a (Slp4a), présente dans les endosomes tardifs, agit de concert avec Rab27a pour permettre la fusion et la libération des exosomes dans le milieu extracellulaire (figure 31) (Fukuda and Kuroda 2002; Tsuboi and Fukuda 2006).

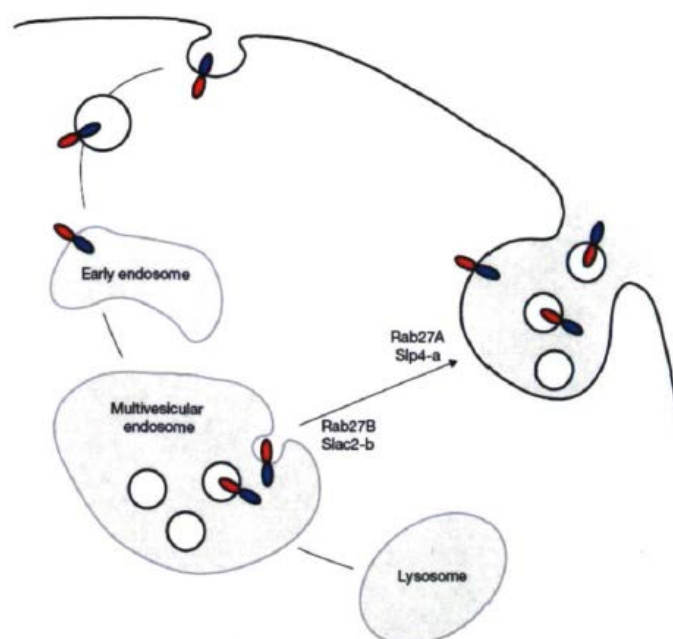


Figure 31 : Rôles de Rab27 dans le trafic vésiculaire. (Pfeffer 2009).

2. Contenu protéique des exosomes

La composition protéique des exosomes est influencée par les signaux extracellulaires et varie suivant le type cellulaire dont ils proviennent. Tel que mentionné précédemment, les exosomes peuvent être libérés par les cellules hématopoïétiques, mais aussi par les cellules tumorales et les cellules épithéliales (Ahn and Johnstone 1993). Les exosomes se retrouvent dans des fluides biologiques variés tels que le plasma, le sang ou encore les urines (Pisitkun, Shen et al. 2004; Keller, Rupp et al. 2007).

De ce fait, la composition protéique des exosomes est très variable. En effet, les exosomes libérés à partir des CPA, comme les LB et les CDs, sont riches en CMH-I/II, CD86 ou ICAM-1 qui sont des molécules jouant un rôle important dans la stimulation cellulaire. Les exosomes isolés à partir des urines contiennent eux des aquaporine-2 et des anhydrases carboniques (Raposo, Nijman et al. 1996; Escola, Kleijmeer et al. 1998; Thery, Regnault et al. 1999). L'état d'activation de la cellule est tout aussi important. En effet, les exosomes dérivés des CDs immatures, par exemple, contiennent moins de CMH-II, CD86 ou encore CD40, comparativement aux exosomes des CDs matures (Segura, Amigorena et al. 2005). Dans cette section, je vais me concentrer sur quelques familles de protéines ou marqueurs rencontrés fréquemment dans les exosomes (figure 32).

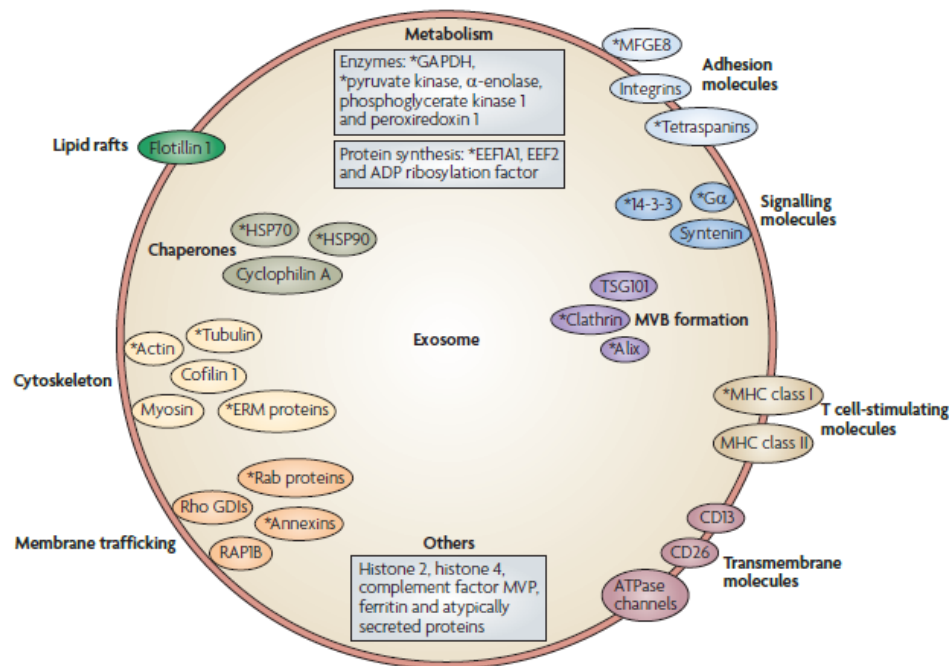


Figure 32 : Distribution du contenu protéique des exosomes. (Thery, Ostrowski et al. 2009).

Les membres de la famille des tétraspanines tels que CD37, CD63, CD81 sont fréquemment retrouvés dans les exosomes (Pols and Klumperman 2009). Il s'agit de protéines possédant quatre domaines transmembranaires, principalement localisées dans les membranes des endosomes tardifs. Les tétraspanines jouent un rôle dans l'adhésion (Nishiuchi, Sanzen et al. 2005), l'activation (Skubitz, Campbell et al. 1996), la différenciation cellulaire (Hemler 2003) ou encore dans l'évasion tumorale (Hemler 2003; Lekishvili, Fromm et al. 2008). Elles sont capables de s'associer entre elles ou encore avec d'autres protéines comme les intégrines pour former un complexe d'adhésion (Berdichevski and Odintsova 1999; Nishiuchi, Sanzen et al. 2005).

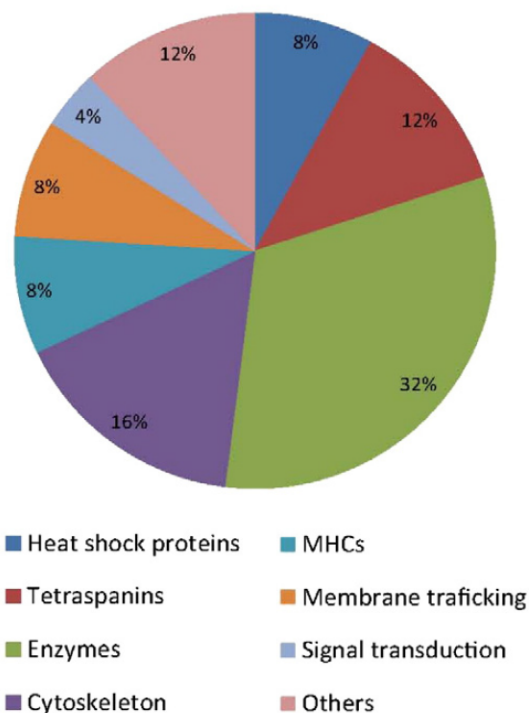
On retrouve aussi des protéines ancrées dans les membranes endosomales grâce aux ancres GPI (glycophosphatidylinositol) telles que l'acétylcholinestérase (AChE) ou encore les CD55, CD58 et CD59 (Rabesandratana, Toutant et al. 1998). On y retrouve également de nombreuses molécules jouant un rôle dans la biogenèse des exosomes, dont des GTPases telles que RABs, ARF ou Rho (Savina, Vidal et al. 2002; Thery, Ostrowski et al. 2009), des annexines (Thery, Boussac et al. 2001), ainsi que des sous-unités de la machinerie ESCRT-I (Buschow, Liefhebber et al. 2005), dont il a été question auparavant. L'ensemble de ces protéines joue un rôle dans le trafic cellulaire, le tri et le transport des protéines au niveau des endosomes tardifs (Katzmann, Babst et al. 2001), tout comme la protéine Alix qui joue plusieurs rôles dans la biogenèse des corps

multivésiculaires ou encore dans l'apoptose (Thery, Regnault et al. 1999; Thery, Boussac et al. 2001).

Le tableau V, ci-dessous, regroupe les 25 protéines qui ont été le plus identifiées sur des exosomes ainsi que leurs catégories selon leur fonction.

Tableau V. Liste des 25 protéines les plus fréquemment identifiées dans les exosomes ainsi que leur classement fonctionnel. (Kharaziha, Ceder et al. 2012).

	Protein name	Times identified
1	Heat shock protein 70	27
2	CD63/ Tetraspanin-30	27
3	B-Actin	24
4	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	20
5	Major histocompatibility complex, class II, DR alpha	18
6	Enolase 1	18
7	CD81/Tetraspanin-28	18
8	Heat shock protein 90	17
9	CD9	17
10	Annexin A2	16
11	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	15
12	Moesin	15
13	Pyruvate kinase , muscle	14
14	programmed cell death 6 interacting protein	14
15	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	14
16	cofilin 1 (non-muscle)	14
17	syndecan binding protein (syntenin)	13
18	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	13
19	major histocompatibility complex, class I, E	13
20	actin, gamma, cytoplasmic 1	13
21	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide	12
22	phosphoglycerate kinase 1	12
23	milk fat globule-EGF factor 8 protein	12
24	annexin VI	12
25	aldolase A, fructose-bisphosphate	12



3. Rôle des exosomes

Comme nous venons de le voir, la composition des exosomes varie selon le type et l'état d'activation de la cellule qui les secrète. Par conséquent, le rôle des exosomes sera tout aussi variable. Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser aux différents rôles des exosomes dans la réponse immunitaire et dans la pathogénèse virale.

a) Rôle dans la réponse immune

Les exosomes originaires des CPA telles que les CDs ou les LB portent à leur surface les molécules du CMH-I/II (Raposo, Nijman et al. 1996; Thery, Regnault et al. 1999; Buschow, Liefhebber et al. 2005), des protéines chaperonnes (HSP) (Wolfers, Lozier et al. 2001; Tytell 2005;

Vega, Rodriguez-Silva et al. 2008) ou des molécules de costimulation (CD86) (Segura, Amigorena et al. 2005) pouvant participer à l'induction de la tolérance ou à la présentation antigénique.

D'après Thery et al., les LT CD4 peuvent être activés directement ou indirectement par les exosomes provenant de CD8 (Thery, Duban et al. 2002). Après rencontre avec un Ag, les CD8 immatures libèrent des exosomes porteur d'un complexe CMH-peptide (Thery, Duban et al. 2002). Ces exosomes seront capturés par des CD4 n'ayant jamais été en contact avec l'Ag (CD8 réceptrices). Après maturation, les CD8 réceptrices deviennent compétentes pour la stimulation des LT naïfs (Thery, Duban et al. 2002). De cette manière, le transfert du complexe CMH-peptide entraîne une amplification de la réponse immune par une augmentation du nombre de cellules portant le complexe CMH-peptide (Andre, Chaput et al. 2004; Segura, Amigorena et al. 2005).

Karlsson et al. ont montré l'importance du CMH-II et des exosomes dans l'induction de la tolérance (Karlsson, Lundin et al. 2001). Brièvement, des rats ont été exposés aux Ag d'ovalbumine. Le sérum a été prélevé et centrifugé. Le surnageant et le culot ont été isolés et mis en présence des cellules épithéliales naïves. Le groupe de Karlsson et al. a observé que les cellules naïves mises en présence avec ces culots ont développé une tolérance à l'Ag d'ovalbumine contrairement aux cellules mises en présence du surnageant cellulaire ultracentrifugé. Après l'analyse du contenu du culot, ils observèrent un contenu enrichi en CMH. De plus, cette réponse reste dépendante des CMH (Karlsson, Lundin et al. 2001; Ostman, Taube et al. 2005). Ces molécules ont été appelées les tolérosomes, aujourd'hui connues sous le nom d'exosomes (Karlsson, Lundin et al. 2001).

La tolérance a aussi été corrélée avec la présence des protéines HSP. En effet, la recherche sur les cellules tumorales a montré que la présence des protéines HSP dans les exosomes brise la tolérance envers les Ag tumoraux et induit le rejet de la tumeur (Wolfers, Lozier et al. 2001). Effectivement, les protéines HSP forment un complexe stable avec les Ag tumoraux cytoplasmiques pouvant être transportés dans les vésicules. Ainsi, les complexes HSP-Ag sont exposés aux cellules du système immunitaire provoquant une réponse immunitaire spécifique (Wolfers, Lozier et al. 2001).

Finalement, la capacité des exosomes à induire la tolérance est exploitée dans les recherches sur les transplantations. Pêche et al. ont isolé des exosomes provenant de CD8

immatures d'une souris immunotransplantée. Les exosomes purifiés sont réinjectés à la même souris avec un inhibiteur de la maturation des CD. Ils ont observé une réponse immunitaire suite à une présentation antigénique. Effectivement, les exosomes purifiés sont riches en CMH. Ces derniers présentent les peptides du soi, favorisant la survie du greffon à la suite de la greffe (Peché, Renaudin et al. 2006).

b) Rôle en thérapie anti-tumorale et vaccination

Les exosomes peuvent aussi être utilisés pour l'immunothérapie. Le groupe de Laurence Zitvogel a mis en évidence le rôle des exosomes dans la thérapie anti-tumorale (Zitvogel, Regnault et al. 1998; Zitvogel, Fernandez et al. 1999). Les CD du patient sont isolées et stimulées avec l'Ag tumoral, les exosomes provenant de ces cellules sont ensuite purifiés et réinjectés au même patient. De cette manière, les CD ou les CPA pourront internaliser les exosomes contenant l'Ag tumoral dans la niche peptidique des CMH-I/II pour faire la présentation antigénique aux cellules avoisinantes. Par cette méthode, le nombre de CPA se trouve amplifié (Zitvogel, Regnault et al. 1998).

Toujours dans la recherche anti-tumorales, des chercheurs s'intéressent depuis plusieurs années aux exosomes pour une immunothérapie vaccinale contre le cancer de la peau (Zitvogel, Regnault et al. 1998; Lamparski, Metha-Damani et al. 2002; Escudier, Dorval et al. 2005; Morse, Garst et al. 2005). Il a été montré que l'injection d'exosomes, produit à partir de CD mises en contact avec l'Ag cible, augmente le nombre de cellules cytotoxiques dans le sang. Cette méthode s'avère être sécuritaire supprimant la croissance voire l'éradication totale de la tumeur (Zitvogel, Regnault et al. 1998). De plus, Lamparski et al., ont montré que l'isolement de grande quantité d'exosomes permettant une production massive de vaccin était possible (Lamparski, Metha-Damani et al. 2002).

Récemment, Schnitzer et al. ont utilisé la méthode de purification d'exosomes à partir des CD qui ont été stimulées avec des Ag provenant du pathogène du *Leishmania*. Il s'avère que les souris qui ont reçu les exosomes étaient immunisées contre le parasite (Schnitzer, Berzel et al. 2010). En effet, les exosomes interagissent directement avec les LT et les activent, ou encore, les exosomes sont capturés par les CD qui à leur tour font la présentation antigénique aux LT naïfs. Ce même genre d'étude a été réalisée contre le parasite *Toxoplasma gondi* (Aline, Bout et al. 2004; Beauvillain, Ruiz et al. 2007; Beauvillain, Juste et al. 2009).

c) Rôle anti-inflammatoire

Au cours d'une étude sur l'arthrite rhumatoïde, maladie inflammatoire qui touche les articulations, Kim et al. ont montré l'effet anti-inflammatoire que pourraient avoir les exosomes isolés à partir de CD₄ modifiées (Jellison, Kim et al. 2005). En effet, les CD₄ ont été transfectées préalablement avec un vecteur exprimant IL-10 ou traitées avec de IL-10 murine recombinante, une cytokine anti-inflammatoire. Ils ont observé que les exosomes, à eux seuls, pouvaient supprimer la réponse inflammatoire dans le modèle d'arthrite induit au collagène chez la souris DTH (Delayed-type hypersensitivity) (Jellison, Kim et al. 2005). Cette réponse est dépendante du CMH de classe II. Toutefois, à ce jour, elle reste la plus efficace et pourrait contribuer aux recherches cliniques pour l'élaboration de nouveaux traitements. Au sein de la même recherche, une autre préparation d'exosomes exprimant la protéine transmembranaire FasL, de la famille des TNF, inhibe l'inflammation lors d'une arthrite induit par immunisation au collagène chez la même population de souris (Kim, Bianco et al. 2006).

d) Rôle dans la pathogenèse virale

Plusieurs études décrivent le rôle des exosomes dans diverses pathogenèses virales. En effet, les exosomes participent à la transmission de plusieurs virus ou agents pathogènes tels que le virus de l'hépatite C (VHC), les virus herpétiques, le cytomégalo virus (CMV) et le VIH-1 (Fevrier, Vilette et al. 2004).

Masciopinto et al., ont montré que les VHC en s'attachant au CD81 des exosomes pouvaient circuler dans le milieu extracellulaire et utiliser ce récepteur pour infecter les cellules avoisinantes (Masciopinto, Giovani et al. 2004).

La famille des virus herpétiques tels que l'herpès simplex 1 (HSV-1) (Temme, Eis-Hubinger et al. 2010), le virus de l'herpès humain 6 (HHV-6) (Mori, Koike et al. 2008), le cytomégalo virus (HHV-5) (Walker, Maier et al. 2009) ou encore l'EBV (HHV-4) (Dukers, Meij et al. 2000) détournent le système immunitaire via les exosomes. Une étude récente sur le HHV-1 a montré que la présence de la glycoprotéine B (gB) induit une augmentation de la synthèse et de la libération des exosomes. De plus, la gB interagit avec les CHM-II au niveau des endosomes tardifs (Temme, Eis-Hubinger et al. 2010). De ce fait, le complexe gB-CMH-II est transféré aux cellules avoisinantes via la voie de libération des exosomes. Ainsi, HHV-1 module la réponse immunitaire en présentant les Ag viraux.

Il a été montré que le HHV-6 utilise la voie de biogenèse des exosomes pour sa maturation et libération (Mori, Koike et al. 2008). Effectivement, le HHV-6 bourgeonne dans les endosomes tardifs et est libéré simultanément avec les exosomes. De plus, les exosomes libérés dans le milieu extra-cellulaire expriment les glycoprotéines virales gB et gM permettant leurs présentations aux LT. Donc, le virus et la présence des gB et gM lorsque libérées dans le milieu extra-cellulaire entraînent une réplication massive du virus, et donc de sa propagation.

Walker et al. ont montré que des exosomes purifiée à partir de cellules épithéliales mises en contact avec le HHV-5 induit une réponse immune adaptative. En effet, la libération d'exosomes exprimant les antigènes viraux induit l'activation des LT CD4 via le CMH-II (Walker, Maier et al. 2009). Les exosomes dérivés de ces cellules contiennent le gB qui, comme pour le HHV-1, est présenté aux LT.

Finalement, l'EBV, quant à lui, inhibe l'activation des LT en induisant leur anergie (Dukers, Meij et al. 2000). En effet, les exosomes sécrétés par les cellules infectées, vont exprimer la protéine virale LMP1, qui est connue pour inhiber l'activation des LT par plusieurs types de stimuli.

e) Rôle des exosomes tumoraux

Il a été décrit des fonctions contradictoires des exosomes sécrétés par les cellules tumorales dans la réponse immune *in vitro*, d'une part en transférant les antigènes aux CDs pour permettre une cross-présentation, d'autre part en inhibant les effecteurs anti-tumoraux de la réponse immunitaire.

Les travaux de nombreux groupes qui ont étudié les effets de l'injection *in vivo* des exosomes dans des modèles murins, suggèrent que les exosomes pourraient favoriser la réponse immune anti-tumorale. Ces exosomes étaient administrés accompagnés d'un adjuvant puissant (Adachi, Kumar et al. 2006) et /ou purifiés à partir de cellules transgéniques exprimant l'IL-2 et l'IL-18 (Dai, Zhou et al. 2006). En général, les exosomes « normaux » seuls ne permettent pas l'induction de la réponse immune, or il a récemment été montré que les exosomes sécrétés par des lignées cellulaires de glioblastome, portant les protéines EGFRvIII et hsp70, induisent une réponse anti-tumorale *in vivo* en absence d'adjuvants (Graner, Alzate et al. 2009). A contrario, des exosomes issus d'autres lignées cellulaires tumorales de souris (carcinome, thymome et mélanome), injectés à des souris diminuaient l'activité des cellules NK (Liu, Yu et al. 2006) et

favorisaient la différenciation des cellules myéloïdes suppressives plutôt que les CD⁺ (Xiang, Liu et al. 2010). L'injection d'exosomes de carcinome ou de mélanome dans des souris, en l'absence de signal inflammatoire avant le challenge tumoral, accélère la croissance de la tumeur et favorise les métastases (Liu, Yu et al. 2006; Liu, Xiang et al. 2010), cette augmentation de métastases pourraient être due à l'effet des exosomes sur l'adhésion et la migration des cellules tumorales en plus de leur effet sur le système immunitaire (Jung, Castellana et al. 2009).

Les écarts observés des résultats publiés avec différentes tumeurs ne sont pas encore très clairs. Il serait possible que les conditions de culture des lignés cellulaires tumorales leur confèrent des propriétés immunes absentes chez les tumeurs primaires. En effet, un travail récent de Xiang et al. a montré que les exosomes de cellules tumorales cultivées *in vitro* deviennent capables, après plusieurs passages, d'activer le TLR2 dans les cellules myéloïdes, alors qu'ils favorisent leurs fonctions immunosuppressives, dans un mécanisme TLR2-indépendant, quand les cellules tumorales sont fraîchement injectées aux animaux (Xiang, Liu et al. 2010).

Des travaux récents, d'une extrême importance, ont porté sur le rôle joué par les exosomes tumoraux dans la dissémination métastatique et dans l'aggravation de l'immunosuppression. Le premier travail, réalisé par l'équipe de David Lyden, a exploré le rôle des exosomes de mélanome dans la formation de la tumeur primaire et dans les métastases. Ils ont montré que des exosomes dérivés de mélanomes hautement métastatiques induisent un état métastatique chez la tumeur primaire *in-vivo* en « éduquant » les progéniteurs de la moelle osseuse via le récepteur MET (récepteur tyrosine kinase). Cette équipe a, en effet, comparé les contenus protéiques d'exosomes dérivés de cellules de mélanome hautement et faiblement métastatiques chez la souris. Par ailleurs, elle a montré chez l'humain, qu'il existe une « signature du mélanome » dans les exosomes circulants qui consiste en l'expression de TYRP2 (Tyrosine Related Protein 2), VLA-4 (Very Late Antigen 4), HSP70, une isoforme de HSP90 et MET et qui pourrait être utilisée comme un marqueur de métastase (Peinado, Aleckovic et al. 2012). Un second travail, de l'équipe de Clotilde Théry, a porté sur le rôle de la GTPase Rab27a dans la progression de la tumeur. Il a été montré que rab27a joue un rôle pro-tumoral dans un modèle de cancer du sein métastatique en modulant le microenvironnement tumoral par la sécrétion de cytokines et d'exosomes, et de MMP-9. Il a également été montré, dans 2 modèles murins, que Rab27a est requis pour la sécrétion des exosomes ainsi que dans la sécrétion de la MMP-9 non-exosomale. Par ailleurs, il a été rapporté, que l'inhibition de Rab27a module de façon différentielle la croissance de 2 modèles

tumoraux provenant pourtant du même tissu (2 adénocarcinomes mammaires) avec une immunogénécité plus importante et moins de métastases pour un des deux modèles. Cette inhibition diminue la sécrétion d'exosomes par les 2 tumeurs de 50% mais la diminution de la croissance tumorale n'a été observée que pour une seule parmi les 2 tumeurs. Ces résultats montrent que les exosomes tumoraux peuvent promouvoir la progression tumorale *in-vivo*, mais qu'il ne faut pas généraliser à toutes les tumeurs et qu'il faut rester prudent et proposer pour chaque type de tumeur, voire à chaque individu, une thérapie personnalisée (Bobrie, Krumeich et al. 2012). Une troisième étude de l'équipe de Ghiringhelli a quant à elle montré une augmentation des effets immunosuppresseurs des cellules myéloïdes suppressives (MdSC) médiée par des exosomes dérivés de différentes lignées tumorales de souris. Il a également été montré, dans cette étude, que la diminution de sécrétion d'exosomes permettait l'augmentation de l'efficacité d'un traitement à la cyclophosphamide, et ce dans 3 modèles murins différents. De plus, des MdSC de patients cancéreux ayant reçu un traitement pour l'hyperpression artérielle, inhibant par ailleurs la formation d'exosomes, montrent des fonctions suppressives faibles (Chalmin, Ladoire et al. 2010).

Les effets des exosomes tumoraux *in vivo*, restent débattus dans la littérature. Bien que de nombreux groupes défendent aujourd'hui l'idée que les exosomes tumoraux inhibent plutôt qu'activent la réponse immune en se basant sur des effets observés *in vitro*, cependant on doit tenir compte du fait que les exosomes ont des actions différentes, selon le type de tumeur et/ou le stade de la progression tumorale (Chaput and Thery 2011).

La figure 33, ci-après, résume les fonctions majeures des exosomes tumoraux dans la réponse immunitaire. Comme décrit plus haut, certains de ces effets activent la réponse immune alors que d'autres l'inhibent, favorisant ainsi l'échappement immunitaire de la tumeur.

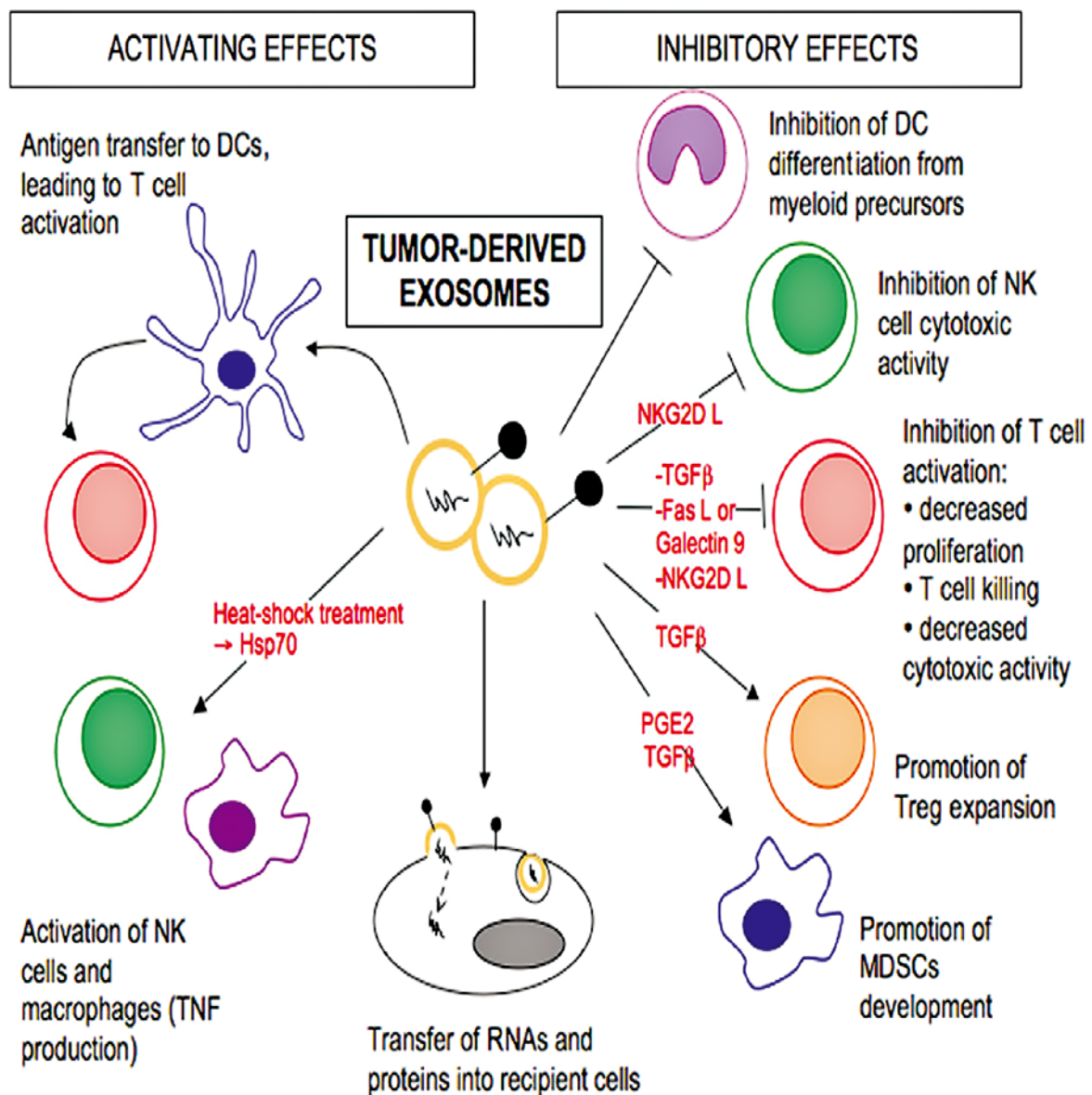


Figure 33: Fonctions immunitaires des exosomes tumoraux. (Bobrie, Colombo et al. 2011).

Une étude rapporte que les cellules tumorales de CNP sécrètent des exosomes aux propriétés immunosuppressives. Cette étude montre que les cellules épithéliales malignes issues de CNP sécrètent des exosomes HLA-II+ qui expriment LMP1 et/ou la galectine 9 (Gal-9); toutes deux possédant des propriétés inhibitrices sur la prolifération cellulaire T (Keryer-Bibens, Pioche-Durieu et al. 2006). Gal-9 est en effet très abondante dans les cellules de CNP, les tumeurs CNP xénogreffées sur des souris et les échantillons cliniques (Pioche-Durieu, Keryer et al. 2005). Son expression peut être induite par différentes cytokines, dont l'IFN-γ et l'IL-1β, et également par l'infection à EBV (Carter, Cahir-McFarland et al. 2002; Hirashima, Kashio et al. 2004). Gal-9 a été identifiée comme un agoniste spécifique de Tim-3, un récepteur à domaine de mort exprimé sur les cellules T CD4+ Th1 matures (Kryczek, Zou et al. 2006). De ce point de vue, des données

récentes confirment qu'il y a bien induction de l'apoptose des cellules T CD4+ par les exosomes de CNP, notamment via l'interaction Gal-9/Tim-3, ce qui suggère une nouvelle voie de subversion du système immunitaire aussi bien au niveau systémique que tumoral (Klibi, Niki et al. 2009). De plus, Gal-9 induit la différenciation des cellules T naïves en cellules Treg (Seki, Oomizu et al. 2008), ce qui renforce l'importance de cette lectine dans les phénomènes d'échappements à la réponse immune dans les CNP.

IV. Galectines

A. Structure et spécificité

Les lectines sont des protéines non-enzymatiques et non-immunoglobulines qui lient les glucides. Les galectines constituent une famille de lectines endogènes et sont nommées ainsi pour leur capacité à lier les β -galactosides (Barondes, Cooper et al. 1994). Les galectines et les galectines-like protéines sont présentes dans tous les règnes animaux et ont été bien conservées tout au long de l'évolution (Cooper and Barondes 1999). Par exemple, toutes les galectines affichent une séquence similaire du carbohydrate-recognition domain (CRD) ou domaine de reconnaissance des glucides qui est constitué d'environ 130 acides aminés avec une structure tertiaire globulaire formant une rainure à laquelle le glucide est lié (Leffler, Carlsson et al. 2004). Actuellement, il y a 15 galectines de mammifères connues dont 11 se trouvent chez l'homme, à savoir les galectines 1-4, 7-10, 12, 13 et 14 (Liu and Rabinovich 2005). Elles peuvent être subdivisées en trois groupes en fonction de leur organisation structurale (Tableau VI).

Tableau VI. Structure et classification des galectines humaines.

<i>Type</i>	<i>Structure</i>		<i>Galectine</i>
Prototype	un CRD		1, 2, 7, 10, 13, 14
Chimère	un CRD + un domaine non-lectine		3
Répétition en tandem	deux CRDs		4, 8, 9, 12

Les galectines contenant un seul CRD sont appelées les galectines prototypes (proto-type) et comprennent les galectines 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 et 15. Celles avec deux CRD distincts reliés par une région linker (tandem-repeat type) sont les galectines 4, 6, 9 et 12. Le troisième type est

les galectines de type chimère (chimera-type) ne possédant qu'un seul CRD en C-terminal plus un domaine « non-lectine » inhabituel riche en proline et en glycine, la galectine-3 est la seule représentante de ce dernier groupe (Rubinstein, Ilarregui et al. 2004). De multiples isoformes de la galectine-8 ont été récemment découvertes ce qui a relativement confondu cette classification puisque trois d'entre elles appartiennent au type tandem-repeat alors que trois autres sont des proto-type (Bidon, Brichory et al. 2001). En contrepartie, il n'existe aucun équivalent des galectines 5, 6, 11 et 15 chez l'homme.

Les ligands endogènes pour les galectines sont les chaînes saccharidiques de glycoprotéines ou des glycolipides. Les galectines montrent une préférence particulière pour les glycanes contenant le disaccharide ubiquitaire N-acétyllactosamine (Gal β 1-3GlcNAc ou Gal β 1-4GlcNAc) (Hirabayashi, Hashidate et al. 2002; Patnaik, Potvin et al. 2006). La plupart de ces ligands vont être trouvés dans le compartiment extracellulaire ou dans la lumière des organites cellulaires. Compte tenu de la grande variété des molécules glycosylées, les ligands potentiels pour les galectines seraient très nombreux. Cependant, la plupart des informations sur la spécificité d'un sucre pour les galectines provient des études biochimiques *in-vitro* où les structures glucidiques ne sont pas présentées dans leur contexte naturel de protéines ou de lipides associés à la membrane (de Melo, Butera et al. 2007).

Différents ligands pour la liaison des galectines ont été mis en évidence avec succès. Ils comprennent des glycoconjugués de la matrice extracellulaire (ECM) tels que la laminine (Barboni, Bawumia et al. 1999), la fibronectine (Ozeki, Matsui et al. 1995), l'élastine (Ochieng, Warfield et al. 1999) ainsi que des glycoprotéines de surface cellulaire, y compris les intégrines (Ochieng, Leite-Browning et al. 1998; Hadari, Arbel-Goren et al. 2000; Fukumori, Takenaka et al. 2003), l'antigène carcino-embryonnaire (CEA) (Ohannesian, Lotan et al. 1995) ou les lipopolysaccharides bactériens (LPS) (Gupta, Masinick et al. 1997).

Des récepteurs pour les galectines d'autres types cellulaires, notamment du système immunitaire, ont été identifiés notamment le CD43 et le CD45 chez les lymphocytes T (Hernandez, Nguyen et al. 2006) ou le CD66 chez les neutrophiles (Feuk-Lagerstedt, Jordan et al. 1999).

Certaines galectines peuvent interagir avec d'autres protéines indépendamment de leurs sites de liaison aux glucides ce qui étend leur potentiel de ligand. D'autres galectines, telle que la

galectine-10, possèdent en effet une faible affinité pour les galactosides et auraient peut être d'autres spécificités (Leffler, Carlsson et al. 2004).

B. Localisation cellulaire et distribution tissulaire des galectines

Bien que les galectines aient des caractéristiques de protéines cytosoliques elles peuvent non seulement être trouvées à l'intérieur des cellules, mais également dans l'espace extracellulaire. Le mécanisme de sécrétion des galectines n'est pas clair, puisqu'elles n'ont pas la séquence signal nécessaire à la voie de sécrétion classique via le réticulum endoplasmique et les vésicules de l'appareil de Golgi (Hughes 1999). Les mécanismes proposés comprennent le bourgeonnement de la membrane en exosomes qui vont ensuite se détacher de la cellule et libérer leur contenu dans l'espace extracellulaire (Nickel 2003). Une autre possibilité pour traverser les bicouches lipidiques a été décrite pour la galectine-3, elle consiste en l'interaction directe avec des phospholipides ou du cholestérol (Lukyanov, Furtak et al. 2005). L'unique séquence N-terminal non-lectine pourrait être responsable de ce phénomène (Menon and Hughes 1999). Par ailleurs, il a été démontré que la sortie de la galectine-1 de la cellule se faisait via l'interaction avec des récepteurs spécifiques (Seelenmeyer, Wegehling et al. 2005). Ces glycolipides contenant du β -galactoside transloquent entre les feuillet externe et interne de la membrane plasmique avec une galectine qui y est attachée, ce processus est catalysé par une enzyme de la membrane.

La localisation des galectines à l'intérieur des cellules peut être cytoplasmique ou nucléaire (Liu, Patterson et al. 2002; Wang, Gray et al. 2004). La galectine-9 présente une localisation membranaire inhabituelle et a été décrite en tant que transporteur d'urate (Lipkowitz, Leal-Pinto et al. 2004). Ceci indique que malgré l'absence de la séquence signal caractéristique des protéines transmembranaires, le repliement de ces molécules et l'incorporation dans la membrane cellulaire peut se produire.

La distribution tissulaire des galectines varie pour les différents membres de la famille (tableau VII). Plusieurs d'entre elles, telles que la galectine-1, -3 ou -8, sont exprimées dans une large gamme de tissus (Chiariotti, Salvatore et al. 2004) alors que d'autres ont une localisation plus restreinte. La galectine-7 par exemple, est caractéristique seulement des épithéliums stratifiés (Magnaldo, Fowles et al. 1998). D'autre part, la galectine-4 est limitée aux cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal (Huflejt and Leffler 2004). Une localisation similaire dans le tractus gastro-

intestinal a été rapportée pour la galectine-2 (Sturm, Lensch et al. 2004). La galectine-10, aussi appelé Charcot-Leyden cristal protéine (CTC), semble être spécifique des éosinophiles, des leucocytes basophiles (Dyer and Rosenberg 2001) et des Treg (Kubach, Lutter et al. 2007).

D'une manière intéressante, certaines galectines pourraient être induites dans des conditions pathologiques dans différents types de cellules, par exemple la galectine-7 dans les lymphomes agressifs T (Demers, Biron-Pain et al. 2007) ou la galectine-2 dans les plaques d'athérosclérose (Ozaki, Inoue et al. 2004). Il a également été suggéré que l'expression de certaines galectines pourrait être corrélée avec le stade du cycle cellulaire. La galectine-12, identifiée en premier temps en tant que spécifique du tissu adipeux (Hotta, Funahashi et al. 2001), a été rapportée plus tard dans le cœur, le pancréas, la rate, le thymus et les leucocytes périphériques (Yang, Hsu et al. 2001). Elle est particulièrement exprimée dans les cellules synchronisées à la phase G1 ou à la limite G1/S du cycle cellulaire

Tableau VII. Répartition tissulaire des galectines.

	Tissus	Cellules	Références
galectin-1	organes lymphoïdes, muscles, reins, cerveau, placenta, cornée	cellules épithéliales thymiques, neurones, lymphocytes T, macrophages, lymphocytes B	(Perillo, Uittenbogaart et al. 1997; Blaser, Kaufmann et al. 1998; Zuniga, Rabinovich et al. 2001; Camby, Le Mercier et al. 2006)
galectin-2	intestin, induite dans les plaques d'athérosclérose	cellules épithéliales, induite dans les cellules des muscles lisses, macrophages	(Hokama, Mizoguchi et al. 2004; Ozaki, Inoue et al. 2004; Hokama, Mizoguchi et al. 2008)
galectin-3	organes multiples (poumon, thymus, intestins, rein, pancréas, sein, prostate, cellules du sang)	cellules épithéliales, fibroblastes, chondrocytes, ostéoblastes, kératinocytes, neutrophiles, cellules dendritiques, basophiles, éosinophiles, mastocytes, monocytes, macrophages, induite dans les lymphocytes	(Openo, Kadrofske et al. 2000; Domic, Dabelic et al. 2006)
galectin-4	tube digestif (en particulier intestin et côlon); induite dans les cancers épithéliaux	cellules épithéliales	(Rechreche, Mallo et al. 1997; Kondoh, Wakatsuki et al. 1999; Huflejt and Leffler 2004)
galectin-7	épithéliums stratifiés (Épiderme, de la langue, œsophage)	kératinocytes, cellules épithéliales, induite dans le lymphome des lymphocytes T	(Madsen, Rasmussen et al. 1995)
galectin-8	ubiquitaire		(Gopalkrishnan, Roberts et al. 2000; Bidon, Brichory et al. 2001)
galectin-9	leucocytes du sang périphériques	Lymphocytes T, induite dans les fibroblastes, cellules endothéliales	(Tureci, Schmitt et al. 1997; Matsumoto, Matsumoto et al. 1998; Imaizumi, Kumagai et al. 2002)
galectin-10		éosinophiles, lymphocytes Treg	(Dyer and Rosenberg 2001; Kubach, Lutter et al. 2007)
galectin-12	tissu adipeux, cœur, pancréas, rate, thymus	Adipocytes, leucocytes	(Hotta, Funahashi et al. 2001; Yang, Hsu et al. 2001)
galectin-13	placenta		(Yang, Ying et al. 2002)
galectin-14	Poumon, tractus gastrointestinal, foie	éosinophiles	(Young, Barcham et al. 2009; Robinson, Pleasance et al. 2010)

C. Fonctions des galectines

En fonction de leur structure particulière, les galectines peuvent agir comme des molécules de liaison aux glucides bivalents ou polyvalents. En plus de celles qui possèdent déjà deux sites de liaison, les galectines qui ont un seul CRD forment des dimères non-covalents, tandis que la

galectine-3 agrège en oligomères via sa région non-lectine (Ahmad, Gabius et al. 2004). Une telle agrégation semble être nécessaire pour l'activité biologique puisque les formes monomériques n'induisent pas un signal intracellulaire malgré la liaison aux cellules (Karlsson, Lundin et al. 2001; Dias-Baruffi, Zhu et al. 2003).

La structure polyvalente des galectines leur permet de se lier à différents fragments glucidiques des molécules présentes à la surface des cellules et dans la matrice extracellulaire. Les galectines peuvent ainsi médier l'adhésion cellulaire, la migration et les interactions cellule-cellule (Liu and Rabinovich 2005). D'autre part le cross-linking des glycorécepteurs au sein de la même cellule peut initier la transduction du signal intracellulaire (figure 34). La capacité de réorganiser les glycoprotéines membranaires dans des radeaux lipidiques peut avoir des répercussions sur les événements de signalisation qui ne sont pas directement induits par les galectines telle que la signalisation du TCR (Demetriou, Granovsky et al. 2001; Miceli, Moran et al. 2001). Il empêche également l'endocytose des récepteurs piégés dans les réseaux de surface et régule ainsi la sensibilité des cellules à des stimuli (Rabinovich, Toscano et al. 2007). À cet égard, il est intéressant de noter que de nombreux récepteurs de facteurs de croissance (par exemple l'EGFR-épidermique, le FGFR des fibroblastes, l'insuline-like-IGFR, le PDGFR dérivé des plaquettes) sont riches en N-glycanes qui sont des cibles pour la liaison galectine (Lau, Cheng et al. 2007).

En plus de leurs rôles extracellulaires, les galectines peuvent également agir à l'intérieur de la cellule (figure 34) en participant à la maturation de l'ARN dans le noyau (Wang, Gray et al. 2004) ou à la régulation de la progression du cycle cellulaire (Yang, Hsu et al. 2001). Un autre exemple est la modulation de l'apoptose par l'interaction avec des membres de la famille Bcl-2 dans le cytoplasme (Yang, Hsu et al. 1996; Liu, Patterson et al. 2002). Ces fonctions des galectines sont généralement indépendantes de leur activité de liaison glucidique et s'appuient plutôt sur les interactions protéine-protéine (Rabinovich, Baum et al. 2002). D'une manière intéressante, la même galectine (par exemple, la galectine-3) peut avoir des effets différents et opposés sur une cellule selon qu'elle agisse à l'extérieur ou à l'intérieur de la cellule (Liu and Rabinovich 2005; Nangia-Makker, Nakahara et al. 2007). Dans le premier cas, elle peut déclencher la mort cellulaire (Rubinstein, Ilarregui et al. 2004) dans le second, elle protège la cellule de l'apoptose (Hoyer, Pang et al. 2004).

L'adhésion et la migration des cellules nécessite la reconnaissance coordonnée et obligatoire des composants de la matrice extracellulaire (ECM). Beaucoup de ces glycoprotéines, y compris la fibronectine et la laminine sont reconnus par les galectines. La présence de galectines peut faciliter l'adhésion cellulaire par pontage et réticulation des molécules d'adhésion avec la matrice ou, à l'inverse, provoquer un décollement par saturation des sites de liaison disponibles (Elola, Wolfenstein-Todel et al. 2007). La liaison de la galectine-1 ou de la galectine-8 à la β 1-intégrine a été démontré comme modulant l'adhésion cellulaire à la laminine et déclenchant la réorganisation du cytosquelette (Moiseeva, Williams et al. 2003).

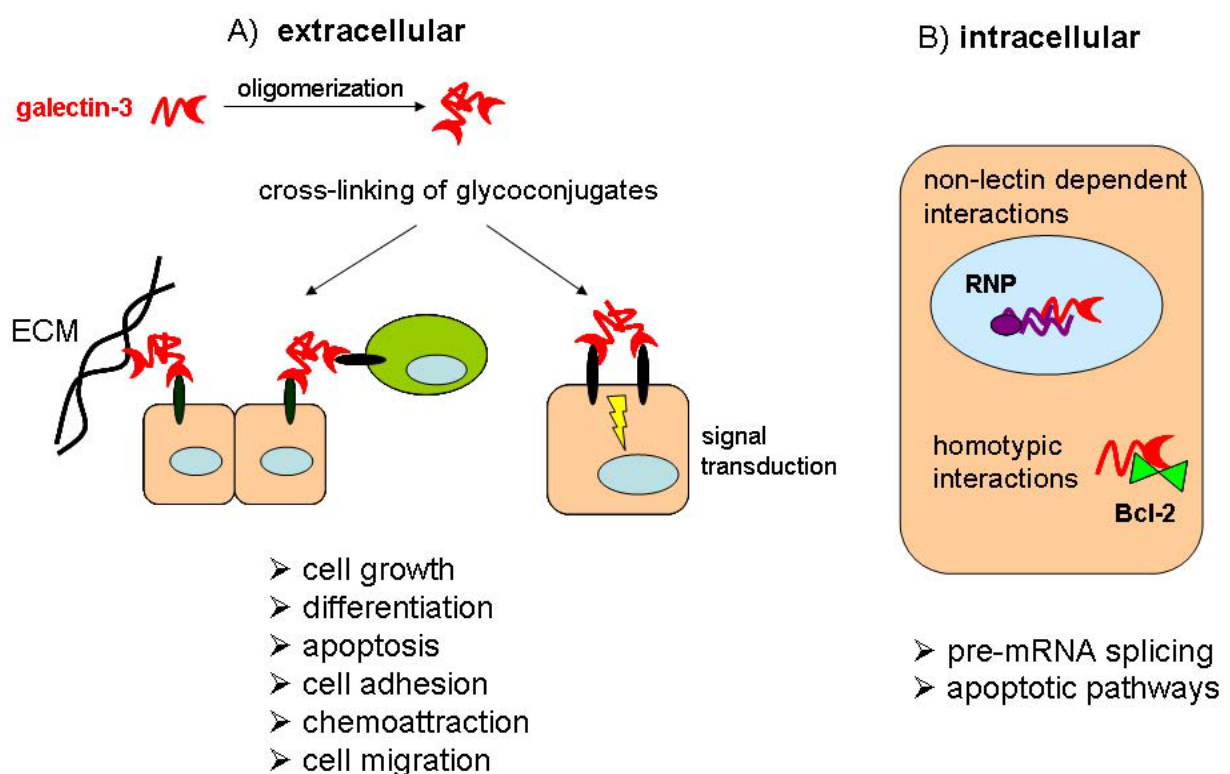


Figure 34 : Exemples d'actions biologiques des galectines. La figure montre des mécanismes d'action des galectines (cross-linking des molécules de surface ou interactions directes protéine-protéine) comme pour la galectine-3. Les effets biologiques régulés par les galectines vont de l'adhésion cellulaire à la migration en passant par la croissance cellulaire, la différenciation, l'activation ou encore l'apoptose.

De plus des intégrines à la surface cellulaire peuvent déclencher des signaux de régulation du cycle cellulaire. Par exemple, l'inhibition de l'adhésion cellulaire provoquée par la galectine-8 induit l'apoptose de carcinome humain (Hadari, Arbel-Goren et al. 2000). D'autre part, l'attachement aux protéines de la matrice extracellulaire induites par la galectine-3 peut protéger certaines cellules de la mort (Matarrese, Fusco et al. 2000). Les galectines peuvent également

régler les interactions cellule-cellule comme le montre une amélioration des interactions entre les cellules dendritiques et les T naïves dans les ganglions lymphatiques (Swarte, Mebius et al. 1998).

Les galectines jouent un rôle dans la différenciation cellulaire. Les variations du profil d'expression des galectines ont été rapportées au cours de la différenciation des cellules myéloïdes (Abedin, Kashio et al. 2003). La progression en lignées neutrophiles et éosinophiles est associée à une augmentation des transcrits de la galectine-10, tandis que la galectine-3 est up-régulée au cours de la différenciation des monocytes. La galectine-7, quant-à elle, est un marqueur de la différenciation des kératinocytes (Saussez and Kiss 2006) et apparaît au moment de la stratification de l'épiderme. Comme la dérégulation de la différenciation est une caractéristique du cancer, l'altération de l'expression des galectines retrouvées dans de nombreux cancers, pourrait être liée à la perturbation de la différenciation normale des cellules.

Des propriétés pro-apoptotiques ont été démontrées pour la majorité des galectines humaines notamment: la galectine-1 (Perillo, Uittenbogaart et al. 1997), la galectine-2 (Sturm et al, 2004), la galectine-3 (Fukumori, Takenaka et al. 2003), la galectine-7 (Kuwabara, Kuwabara et al. 2002), la galectine-9 (Wada, Ota et al. 1997; Kageshita, Kashio et al. 2002) et la galectine-12 (Hotta, Funahashi et al. 2001).

D. *Galectine-9*

La galectine-9 ou écalectine, décrite au départ pour son effet chimio-attractant des éosinophiles (Matsumoto, Matsumoto et al. 1998), apparait aujourd'hui comme un immunomodulateur polyvalent qui affecte de nombreux types cellulaires.

La galectine-9 est constituée de deux domaines de reconnaissance des glucides (CRD) reliés par un linker peptidique. Trois isoformes qui diffèrent par la longueur de cette région ont été identifiées (Chabot, Kashio et al. 2002) (figure 35). Ces isoformes proviennent de la différence d'épissage du transcrit original. La protéine pleine longueur peut être clivée post-transcriptionnellement par des enzymes telles que la thrombine (Nishi, Itoh et al. 2006). Outre son potentiel chimio-attractant, les données accumulées depuis les premières découvertes indiquent qu'elle a des fonctions beaucoup plus larges. Elle est exprimée dans les cellules endothéliales, les macrophages et les lymphocytes T (Spitzenberger, Graessler et al. 2001; Chabot, Kashio et al. 2002). Elle peut

être localisée à la fois en intracellulaire et, exceptionnellement pour une galectine, à la surface de la cellule. Sa libération de la surface de la cellule en une forme soluble nécessite l'action de certaines métalloprotéases matricielles (Hirashima, Kashio et al. 2004).

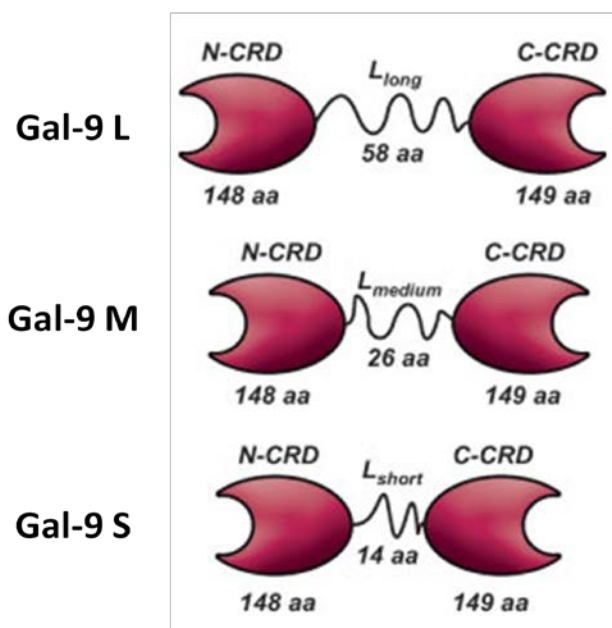


Figure 35 : Les isoformes de la galectine-9. La figure montre les trois isoformes naturelles de la galectine-9 avec différentes longueurs du « linker » inter-domaine (long L, moyen M et court S).

La galectine-9 présente également de nombreuses fonctions immunologiques telles que la régulation des interactions entre les cellules épithéliales thymiques et les thymocytes, dont elle induit l'apoptose (Wada, Ota et al. 1997). Comme la galectine-1, elle induit la mort cellulaire des lymphocytes T matures activés dans des voies caspases et calpaïne dépendantes (Kashio, Nakamura et al. 2003). Le récepteur de surface TIM3 (T cell immunoglobulin- and mucin domain-containing molecule) est crucial pour la fonction de la galectine-9, il est caractéristique de tous les lymphocytes T différenciés de type Th1 (van der Merwe and Davis 2003; Zhu, Anderson et al. 2005). Il a été montré que cette voie est dérégulée dans les maladies auto-immunes telles que le diabète ou la sclérose en plaques (Koguchi, Anderson et al. 2006). Il a également été montré que l'activation de la voie galectine-9/TIM3 joue un rôle important dans le rejet de greffe (Naka, Ponciano et al. 2009). En plus d'une activité pro-apoptotique la galectine-9 induit, dans un modèle murin, la différenciation des cellules T naïves en un phénotype régulateur tout en inhibant leur développement en Th17 (Seki, Oomizu et al. 2008) et stimule la maturation des cellules dendritiques associée à la production de cytokines de type Th1 (Dai, Nakagawa et al. 2005).

La galectine-9 est, par ailleurs, un facteur pronostic pour la progression des tumeurs solides ainsi que de leurs métastases. Il a en effet été mis en évidence que la perte de son expression est associée à la progression tumorale et à la formation de métastases dans différents types de cancers. En accord avec ces observations cliniques, des cellules tumorales transfectées avec la galectine-9 forment significativement moins de métastases, dans des modèles murins de mélanome et de cancer du colon, que les tumeurs parentales galectine-9 négatives. De plus, l'administration par voie intraveineuses de galectine-9 recombinante réduit significativement la formation de métastases chez des souris auxquelles il a été injecté des cellules « wild-type » de mélanome et de cancer du colon. Ces données indiquent que l'expression endogène de la galectine-9 ainsi que la galectine-9 recombinante inhibent la formation de métastases dans certains types de cancer.

Dans certains cancers, tels que des sarcomes, la galectine-9 enclencherait l'immunité anti-tumorale par la maturation des cellules dendritiques CD11+ qui à leur tour activeraient les CD4+TIM3+ et les CD8+TIM3+. Dans d'autres cancers la galectine-9 joue un rôle dans l'échappement immunitaire des tumeurs comme dans le cas du CNP où des exosomes galectine-9 positifs, qui sont relargués en grandes quantités, contribuent à l'échappement du CNP à l'immunité anti-tumorale (Klibi, Niki et al. 2009).

V. Carcinome du nasopharynx

A. Description

Les carcinomes nasopharyngés se développent en arrière des fosses nasales dans les muqueuses épithéliales au niveau de la partie supérieure du pharynx (Wei and Kwong 2010). Dans la forme typique, ils sont constitués de cellules épithéliales malignes très immatures et ont un caractère inflammatoire.

Selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé on en distingue trois types histologiques principaux : le type I est constitué par les carcinomes épidermoïdes kératinisants qui présentent un fort degré de différenciation (kératine extracellulaire), le type II regroupe les carcinomes épidermoïdes non kératinisants (absence de kératine extracellulaire) et le groupe III, les carcinomes indifférenciés. Une classification alternative a subdivisé les tumeurs en deux types histologiques qui sont les carcinomes épidermoïdes et les carcinomes indifferenciés du

nasopharynx (Tableau VIII). Cette seconde classification est corrélée avec la sérologie d'EBV : les patients qui ont un carcinome épidermoïdes ont un titre EBV réduit, alors que ceux avec un carcinome indifférencié du nasopharynx ont un titre plus important (Wei and Sham 2005).

Tableau VIII. Distribution des types histologiques du CNP en Amérique du nord et au sud de la Chine.

Région	Type I	Type II	Type III
Amérique du nord	25%	12%	63%
Sud de la Chine	2%	3%	95%

Certaines biopsies de CNP montrent un modèle histologique mixte. La classification la plus récente de l'OMS a pris en considération ce modèle mixte ainsi que l'association à EBV parmi les tumeurs de type II et de type III. Les types histologiques du carcinome du nasopharynx sont considérés aujourd'hui en tant que carcinomes épidermoïdes ou carcinomes non kératinisants alors que le second groupe est subdivisé en carcinomes différenciés et indifférenciés (Ferlito 1993). Cette classification est plus applicable dans la recherche épidémiologique et il a été montré qu'elle n'avait pas de rapport avec le pronostic. Les carcinomes indifférenciés présentent un taux de control local de la tumeur suite à un traitement ainsi qu'une incidence des métastases éloignées plus élevés comparés aux carcinomes différenciés (Reddy, Raslan et al. 1995; Marks, Phillips et al. 1998).

Les symptômes révélateurs de cette pathologie ne sont pas spécifiques du CNP, c'est leur association qui doit y faire penser. Il s'agit de la formation d'une tuméfaction cervicale, révélatrice d'une extension ganglionnaire, accompagnée de troubles de l'audition, d'otites sérieuses, d'obstruction nasale, de douleurs (Spano, Busson et al. 2003). Le diagnostic final se fait sur biopsie.

B. Epidémiologie

Les CNP représentent une entité très particulière parmi les tumeurs malignes d'origine épithéliale. Leur répartition géographique est tout à fait inégale et surprenante: ils sont rares dans la plupart des pays occidentaux et notamment en Europe (incidence annuelle inférieure à 1/100 000), mais fréquents dans certaines régions du globe. Les foyers de haute incidence se situent en Extrême-Orient, principalement en Chine du sud (incidence annuelle de 30-40/100 000 à Canton). Il existe également des zones d'incidence intermédiaire dont l'extension a longtemps été sous-

estimée: Afrique du Nord, Indonésie, Vietnam, Kenya, Groenland (incidence annuelle de 3 à 8/100 000) (figure 36). Ils sont associés de façon constante à EBV, quelle que soit l'origine géographique des patients.

Dans ces régions fortement peuplées, les CNP sont un problème de santé publique. En Afrique du Nord, ils représentent la première cause de cancers ORL tandis qu'en Chine du sud, ils constituent la troisième forme de cancer par ordre de fréquence chez les hommes avec un ratio homme/femme d'environ de 3/1. Dans les zones d'endémie les types II et III sont très majoritaires. Ces cancers surviennent entre 40 et 60 ans chez la plupart des patients mais on observe, en Afrique du Nord, un deuxième pic d'incidence vers 10-20 ans (Spano, Busson et al. 2003). Cette forme juvénile représente 20% des cas des CNP dans ces pays.

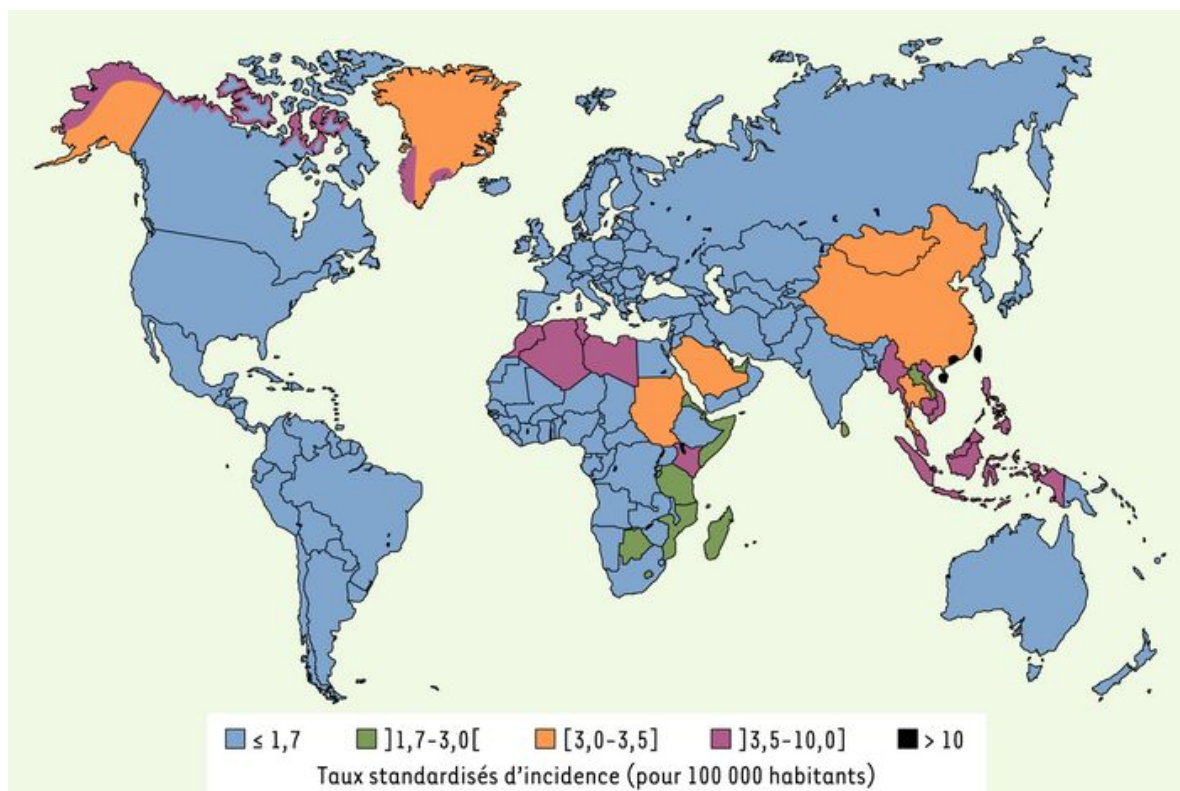


Figure 36 : Incidence des carcinomes nasopharyngés dans le monde chez les individus de sexe masculin : Incidence calculée pour 100000 habitants par an. Carte dessinée et prêtée par V. Gaboriau et M. Corbex (Genetic Epidemiology Unit, International Agency for REsearch on cancer) sur la base des données de GLOBOCAN 2000 et de données personnelles de J. Fribourg (Copenhague).

C. *Etiologie*

La distribution tout à fait surprenante des CNP pourrait s'expliquer par les effets conjugués, variables suivant les populations concernées, de facteurs de prédisposition génétique et de

facteurs de risque environnementaux. Par ailleurs la présence d'EBV dans les cellules épithéliales est un facteur important de la formation de ces tumeurs. Un des problèmes majeurs demeure la définition du précurseur du CNP qui est rare et encore mal-connu.

Je fais ici la distinction entre les facteurs non viraux et les facteurs viraux qui nous intéressent plus dans ce travail.

1. Facteurs étiologiques non viraux

a) Facteurs génétiques

L'accumulation d'anomalies génétiques et épigénétiques est nécessaire au processus de la tumorigenèse. Malgré un grand nombre d'anomalies découvertes durant ces vingt dernières années, définir les événements critiques qui contribuent à l'initiation et la progression du CNP demeure un énorme challenge pour les chercheurs. Certaines études ont tenté d'élucider les événements moléculaires impliqués dans la survenue du CNP. L'activation de la télomérase et la surexpression de bcl2 sont constamment retrouvées dans les lésions dysplasiques ainsi que dans les carcinomes invasifs. Ces modifications sont importantes dans le maintien de la fonction de l'immortalité et l'augmentation de la survie des cellules épithéliales prédisposées au cancer (Bei, Jia et al. 2012).

En extrême orient, il a été mis en évidence l'existence de cas d'agrégation familiale. Ces familles présentent des cas multiples de CNP sur plusieurs générations (Zeng and Jia 2002). Des études de liaisons ont été réalisées pour plusieurs séries de familles Chinoises présentant des cas multiples. Elles ont abouti à des résultats discordants. La bande 21 sur le bras court du chromosome 3 portant probablement des gènes suppresseurs de tumeur ressort de l'une de ces études (Xiong, Zeng et al. 2004). Par ailleurs des études cas/témoins ont été réalisées. Dans ces enquêtes il n'y a pas de lien de parenté entre les patients et les individus sains qui appartiennent à la même classe d'âge et à la même catégorie sociale. Des polymorphismes dans le gène de l'enzyme Cytochrome P4502E1 ont été ainsi décrits et associés à un risque plus élevé de développer un CNP (Hildesheim, Anderson et al. 1997; Jia, Pan et al. 2009). Un des locus concernés correspondrait au gène de la protéine HSP70-2 dont un polymorphisme particulier est associé à un risque plus élevé de développer un CNP (Jalbout, Bouaouina et al. 2003).

De nombreux gènes de l'immunité ont été également associés à un risque élevé de développer un CNP. La plupart des études se sont focalisées sur les HLA de classe I et II, et ont

utilisé une approche de typage sérologique afin de déterminer le groupe de HLA le plus fréquent. De nombreux polymorphismes de cytokines et des protéines de surfaces sur les cellules immunitaires ont également été examinés. Les modifications de certaines interleukines étaient associées à un risque de CNP en Chine, telles que IL-1A, IL-1B, IL-2, IL-8, IL-10, IL-12, IL-16 et IL-18. L'association de l'IL-8 et de l'IL-12 ayant également été retrouvée chez les Tunisiens (Bei, Jia et al. 2012).

b) Facteurs environnementaux

Un certain nombre de facteurs environnementaux sont considérés comme favorisant la formation d'un CNP, en particulier la consommation d'aliments conservés dans la saumure en Asie et celle de graisses rances en Afrique du Nord. Le manque d'aération des logements est aussi un facteur de risque. D'autres facteurs environnementaux plus difficiles à mettre en évidence sont sans doute impliqués. Ils sont liés au mode de vie particulier des populations vivant dans les zones d'endémie (consommation d'aliments épissés, modes de sevrage particulier...) (Jeannel, Hubert et al. 1990).

Des carcinogènes environnementaux tels que les N-nitrosamines, les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les amines aromatiques, qu'on retrouve dans les poissons salés, dans de nombreux aliments conservés et dans le tabac, contribueraient à la forte incidence des CNP dans les régions endémiques. Certaines enzymes, qui jouent un rôle majeur dans le métabolisme de ces carcinogènes, ont été étudiées pour leur association au risque de survenue du CNP. Différentes enzymes de la superfamille des CYP ont donc été testées, parmi lesquelles l'enzyme CYP2A6 pour laquelle la conversion de l'allèle (1B) et la délétion de l'allèle (1C) ont été associées à un risque plus élevé de CNP chez les thaïlandais (Tiwawech, Srivatanakul et al. 2006) alors qu'aucune association avec le CNP n'a été retrouvée avec les polymorphismes génétiques de CYP1A1 (allèles m1 et m2) ou de CYP2A13 chez les taïwanais (Cheng, Chien et al. 2003) ainsi que chez les chinois du sud (Jiang, Jia et al. 2004).

2. Facteur étiologique viral

La présence d'EBV dans les cellules épithéliales est un facteur important de la formation de ces tumeurs. Les arguments en faveur du rôle oncogène du virus dans ces tumeurs sont les suivants :

- une des caractéristiques majeures du CNP, outre sa répartition épidémiologique et son caractère inflammatoire, est son association constante au virus d'Epstein Barr. En effet les CNP sont associés

à EBV de façon systématique pour les types II et III (Nicholls, Agathangelou et al. 1997). Pour les types I, l'association est fréquente dans les zones d'endémie mais rare en dehors de ces zones. Il s'agit alors de cancers liés à l'intoxication alcool-tabagique. Au final, la quasi-totalité des CNP sont associés à EBV. Les CNP sont donc un modèle très propice à l'association virus-cancer.

- on ne trouve pas de particules virales au sein des tumeurs, mais le génome d'EBV est présent dans le noyau des cellules tumorales et certains gènes viraux s'expriment. Or ces protéines virales ou ARN viraux ont une activité oncogène (Niedobitek 2000). Les activités oncogènes des protéines d'EBV ont été décrites auparavant.

- dans le tissu tumoral, une souche virale est sélectionnée, elle présente souvent des caractéristiques immunologiques particulières, notamment pour le gène de LMP1 (Edwards, Sitki-Green et al. 2004).

- une équipe a mis en évidence la présence d'EBV dans des lésions pré-invasives de CNP. Une seule et même souche se retrouve dans toutes les cellules et certains gènes d'EBV s'expriment déjà (Pathmanathan, Prasad et al. 1995). Cependant ce point n'est pas clairement établi dans la mesure où une autre équipe n'a pas réussi à reproduire ces observations (Niedobitek, Agathangelou et al. 1996).

- des altérations sérologiques s'observent chez les patients avant que la tumeur ne soit détectable cliniquement. Il s'agit de l'apparition d'anticorps IgA et de l'augmentation des anticorps IgG dirigés contre les protéines EA (early antigen) et VCA (viral capsid antigen) d'EBV (Tiwawech, Srivatanakul et al. 2006).

La répartition par zone d'endémie de cette maladie laisse penser que toutes les souches d'EBV, n'ont peut être pas le même pouvoir oncogène.

Le rôle d'EBV dans le développement du CNP dépend de la compréhension du « quand et comment » EBV infecte les cellules épithéliales. On sait clairement que la cavité orale est la porte d'entrée du virus, et que le virus se répand via les sécrétions oropharyngées. L'idée de cellules épithéliales en infection persistante est soumise à controverse dans la mesure où l'on n'a pas encore identifié de manière univoque de cellules épithéliales oropharyngées en infection persistante chez le porteur sain. Les CNP peuvent survenir à partir de cellules épithéliales en infection persistante qui subiraient d'autres événements génétiques comme ceux présentés pour le modèle du développement des Lymphomes de Burkitt. Alternativement, l'infection à EBV dans les cellules épithéliales de personnes à risque peut avoir lieu plus tardivement dans leur vie,

certaines études suggérant qu'une exposition précoce du nasopharynx aux carcinogènes environnementaux rendrait l'épithélium plus sensible à l'infection par EBV (Knox, Li et al. 1996). Ainsi, le CNP n'évoluerait pas à partir de cellules épithéliales déjà infectées par EBV, mais représenterait une infection rare de cellules épithéliales rendues plus susceptibles due à une exposition aux carcinogènes, ou à d'autres changements pré-néoplasiques. Bien que le stade précis auquel a lieu l'infection à EBV ne soit pas connu, il est clair que toutes les cellules tumorales dans tous les CNP associés à EBV portent un génome viral monoclonal (Niedobitek, Young et al. 1992; Pathmanathan, Prasad et al. 1995).

Le profil d'expression des gènes de latence est intermédiaire à celui de LB (latence I) et des LH (latence II). EBNA1 et les EBERs sont toujours présents quelque soient les cas de CNP EBV+, les transcrits de LMP2A et -2B sont amplifiables dans la plupart des tumeurs, et LMP2A peut jouer un rôle sur la croissance des cellules épithéliales (Morrison and Raab-Traub 2005) ; cependant cette protéine n'est détectée que dans 50% des cas (Heussinger, Buttner et al. 2004). L'ARNm de LMP1 est plus difficilement détectable et la protéine n'est actuellement identifiée que dans 35% des cas (Young, Dawson et al. 1988; Niedobitek, Young et al. 1992). La présence de LMP1 dans les lésions pré-invasives suggère cependant que l'expression de LMP1 est nécessaire dans les lésions précoces, mais pas essentielle à l'établissement du carcinome. La prolifération des cellules épithéliales induite par EBV augmente le risque que d'autres événements génétiques surviennent contribuant ainsi à la tumorigenèse.

L'expression occasionnelle de la protéine lytique BZLF1 a été détectée dans des échantillons de CNP (Cochet, Martel-Renoir et al. 1993) ; cependant aucune autre protéine du cycle lytique n'a été retrouvée ni même la présence d'ADN linéaire ce qui implique que les cellules tumorales ne sont pas permissives à la réplication virale (Gulley, Amin et al. 1995). Cependant, on enregistre fréquemment la présence d'IgA anti-VCA, EA, ou encore anti-MA chez les patients CNP, qui peuvent être utilisés comme tests pour le screening des patients des zones endémiques de CNP (Almand, Resser et al. 2000). De même, les taux d'ADN libres dans le sérum, peuvent servir au diagnostique, au pronostic et comme information thérapeutique pour les patients CNP (Mellor, Keskin et al. 2002). Nous ne savons pas très bien si l'ADN retrouvé est de l'ADN nu ou encapsidé, mais sa résistance à la DNase et les masses tumorales relativement faibles comparativement au taux d'ADN sérique suggèrent que le virus pourrait survenir d'une réplication active plutôt que des cellules tumorales mourantes. Malgré tout, la place réelle de la réplication virale comme

marqueur de substitution en lien étroit au CNP reste incompris, ce qui suggère des rôles encore inconnus de la réplication lytique d'EBV dans la pathogenèse du CNP.

Dans tous les cas, et comme dans la plupart des cancers humains, le CNP est une pathologie multifactorielle, et c'est la concomitance de plusieurs de ces facteurs qui, chez un individu donné, provoque l'apparition d'une tumeur.

D. *Microenvironnement tumoral*

Dès les premières observations concernant le CNP, il a été noté une altération de la réponse immune à EBV associée à un titre élevé en IgA dirigées contre le virus (Henle and Henle 1976). Cela impliquait alors que la réponse immune, au site même de développement tumoral, avait changé et que la tumeur elle-même pouvait conditionner son microenvironnement pour faciliter sa croissance. Plusieurs études supportent l'idée que la suppression immune locale, plutôt qu'une déficience systémique du contrôle d'EBV, contribuerait au développement du CNP. Ces études montrent en effet que les cellules T CD4+ et T CD8+ EBV spécifiques issues de la circulation périphérique de patients présentant un CNP pouvaient être réactivées (Pardali and Moustakas 2007; Klibi, Niki et al. 2009). L'étude de Jiang Li et al montre ainsi que bien que les T CD4+ et les T CD8+ spécifiques de plusieurs épitopes de latence II soient présents et réactivables à partir du sang périphérique, la cytotoxicité et la sécrétion cytokinique des TIL, en réponse à ces mêmes épitopes sont très affaiblies (Pardali and Moustakas 2007). Une première piste concernant cette détérioration concerne la présence, en nombre important, de cellules T regulatrices CD4+CD25+FoxP3+ dans la circulation mais également au site tumoral, ce qui réduirait ainsi la réponse cellulaire à EBV même après un homing correct au site tumoral (Mottet and Golshayan 2007; Pardali and Moustakas 2007). L'autre piste concerne les mécanismes d'altération de la réponse immune directement dirigés par les protéines d'EBV. Des études réalisées sur les populations japonaises ont montré que les cellules de CNP pourraient utiliser de nombreux mécanismes classiques d'échappement immunitaires, comme un dysfonctionnement des molécules HLA de classe I et l'apoptose médiée par la voie Fas/FasL. Cette étude montre également que l'expression de FasL peut être considérée comme un marqueur indépendant de mauvais pronostic et qu'elle serait associée à une sur-régulation de l'IL-10 dans les cellules de CNP EBV+ (Ogino, Moriai et al. 2007).

E. Traitements

1. Traitements conventionnels

Globalement les CNP sont des cancers qui répondent très bien à la radiothérapie et à la chimiothérapie de première ligne, mais les récurrences sont fréquentes et résistantes aux traitements. Les récurrences sont environ de 10 à 20 % pour les stades les moins sévères et de 60 à 80 % pour les stades les plus avancés. La chirurgie étant le plus souvent irréalisable, le traitement de référence est la radiothérapie. Ce traitement est souvent accompagné d'une chimiothérapie première ou d'une chimiothérapie concomitante à la radiothérapie. Les drogues les plus utilisées sont le cisplatine, la bléomycine, la doxorubicine, l'épirubicine, le 5-fluorouracil, le méthotrexate et la mitoxantrone (Chan and Lo 2002; Spano, Busson et al. 2003).

2. Stratégies d'immunothérapie

Nous nous proposons dans cette section de donner les principaux résultats des essais d'immunothérapie, dirigés contre le CNP associé à EBV, menés ces dernières années dans le monde.

Le concept d'immunothérapie est basé sur le développement d'une thérapie sélective, cette stratégie vise l'activation du système immunitaire afin d'aboutir à l'éradication de la tumeur en affectant le moins possible les cellules normales. Elle se traduit par l'amplification, sur le plan qualitatif et quantitatif, des effecteurs de la réponse immunitaire. Les approches de cette thérapie peuvent être variées. On peut distinguer les approches d'immunothérapie adoptive et active.

Les antigènes de latence virale exprimés par les cellules malignes des tumeurs associées à EBV représentent des cibles potentielles pour le système immunitaire, et différentes stratégies d'immunothérapie demeurent envisageables. Il est à noter que le CNP présente une immunosuppression plus importante et une fréquence des cellules T spécifiques d'EBV plus faible que celles observées chez les sujets sains ayant une sérologie EBV-positif.

Adapter les protocoles d'immunothérapie développés pour le contrôle des latences de types III à celui des latences de type II représente un challenge puisque par définition le profil d'expression des antigènes viraux est restreint, excluant d'emblée les antigènes immunodominants (famille d'EBNA3), et que la fréquence des effecteurs reconnaissant LMP1, LMP2 ou EBNA1 est très faible dans les CTL générés à partir de cocultures avec les LCL utilisés

comme CPA (Bollard, Aguilar et al. 2004). Cependant, ces antigènes sous-dominants peuvent servir pour le développement de protocoles d'immunothérapie (tableau IX).

Le CNP se développe à partir des cellules épithéliales du nasopharynx et l'association à EBV est quasi constante quelque soient les formes (indifférenciée ou non-kératinisante) (Raab-Traub 2002). Cette association étroite suppose que le transfert adoptif de *CTL* EBV spécifique serait une option thérapeutique d'intérêt. Les CNP ont un profil de latence II, et le répertoire T spécifique des 3 protéines de cette latence semble largement intact dans le sang périphérique des patients (Chua, Huang et al. 2001; Whitney, Chan et al. 2002; Klibi, Niki et al. 2009), ce qui ouvre des perspectives intéressantes pour ce genre d'immunothérapie (Stephens and Mason 2000; Straathof, Bollard et al. 2005).

Deux essais ont été réalisés par l'équipe de Rooney. Dans le premier, dix patients ont été inclus: 6 patients avec une maladie en rechute ou réfractaire et 4 patients avec un stade avancé au diagnostic mais en rémission au moment de l'administration des *CTL*. Parmi les 6 premiers patients, 2 ont été mis en réponse complète (à 11 et 23 mois) et 1 en réponse partielle (à 12 mois), 1 présente une maladie stabilisée (sur plus de 14 mois) et 2 étaient non-répondeurs. Les 4 patients en rémission le sont restés après l'infusion (Straathof, Bollard et al. 2003). Dans le second essai, plus récent, 23 patients ont été inclus : 8 patients en rémission et 15 patients avaient une maladie active au moment de l'administration des *CTL*. Parmi les 8 premiers patients, 5 demeurent sans maladie (à 25-82 mois) et 3 ont une récurrence (à 2, 14 et 60 mois). Parmi les 15 autres patients, 5 ont été en réponse complète, 2 en réponse partielle, 3 présentent une maladie stabilisée et 5 étaient non-répondeurs (Louis, Straathof et al. 2010).

Tableau IX. Historique des essais cliniques d'immunothérapie contre les CNP.

Etude	N	Immunothérapie	Résultats
Chua et al., 2001	4	CTL autologues	↓charges EBV plasmatique (3/4)
Lin et al., 2002	16	Vaccination par CD LMP2 pulsées	↑CTL LMP2 (9/16) dont 2 RP
Straathof et al., 2005	10	CTL autologues	4/4 RC maintenue ; 2/6 RC, 1/6 RP, 1 MS, 2 NR
Comoli et al., 2004	1	CTL allogéniques	MS
Comoli et al., 2005	10	CTL autologues	2 RP, 4 MS, 4 NR
Louis et al., 2009	8	Acm anti-CD45 + CTL autologues	↑CTL (8/8) dont 1 RC et 2 MS
Louis et al., 2010	23	CTL autologues	5/8 RC maintenue, 7/15 RC ou RP,
Toh et al., 2011	21	Greffe de cellules souches allogéniques	5/15 RC, 2/15 RP ; 7/21 RP, 3/21 MS
Secondino et al., 2012	11	CTL autologues	2/11 RP, 1/11 RM, 3/11 MS
Smith et al., 2012	24	CTL autologues	↑CTL (16/22) dont 10 MS

CTL, Lignée T cytotoxique EBV spécifiques; MS, Maladie stabilisée ; RC, Réponse Complète ; RP, Réponse Partielle ; RM, Réponse Mineure ; NR, Non Répondeur ; CD, Cellules Dendritiques ; Acm, Anticorps monoclonal (testé pour une lymphodéplétion spécifiques transitoire).

En 2005, l'équipe de Comoli a publié les résultats d'un essai de thérapie cellulaire à base de lignées autologues de CTL EBV spécifiques sur des patients de maladie réfractaire aux traitements conventionnels. Les lignées de CTL ont pu être réalisées pour tous les patients et la fraction cellulaire a été surtout enrichie en cellules T CD8+ cytotoxiques pour les LCL, et des cellules CNP. Le contrôle de la progression de la pathologie a été obtenu pour 6 des 10 patients traités dont 2 ont obtenu une réponse partielle et 4 une stabilité de la maladie. L'analyse de la réponse cellulaire, en termes de production d'IFN- γ , a montré qu'il y avait une augmentation de la fréquence des CTL EBV spécifiques, notamment ceux dirigés contre LMP2 (Comoli, Maccario et al. 2005). Ce même groupe, lors d'une étude préliminaire en 2004, a traité un patient avec des CTL EBV-spécifiques d'origine allogénique (donneur HLA identique). Ceci a permis une stabilisation transitoire de la maladie. Les biopsies ont permis de mettre en évidence une augmentation des

lymphocytes T CD8 infiltrant la tumeur (Comoli, De Palma et al. 2004). Dans une étude plus récente, cette même équipe a montré qu'une chimiothérapie lympho-déplétante préparative n'améliorait pas les résultats de la thérapie cellulaire. Ils ont en effet traité 11 patients avec des CTL spécifiques de la protéine LMP2. Les résultats montrent que 2 patients ont obtenu une réponse partielle (à 5 et 8 mois), 3 une stabilité de la maladie (à 4, 8 et 16 mois), 1 une réponse mineure à 12 mois alors que 5 présentent toujours une progression de la maladie (Secondino, Zecca et al. 2011).

Une approche différente a été suivie par l'équipe de Tan dans le cadre d'un essai clinique de phase II, 21 patients présentant une maladie avancée avec des métastases. Elle consiste à la greffe non-meloablative de cellules souches du sang périphérique (PBSC) d'origine allogénique (donneur HLA identique ou donneur de la même fratrie avec un seul Ag-discordant). Le taux de réponse à la maladie est de 47%, 7 patients ont obtenu une réponse partielle, 3 une maladie stable, 4 patients étaient en vie à 2 ans et 3 un contrôle prolongé de la maladie à 344, 525 et 550 jours (Toh, Chia et al. 2010).

L'équipe de Rooney a travaillé, sur un essai clinique visant à augmenter d'emblée la fréquence des CTL infusés *in vivo*, ceci via une lymphodéplétion partielle ciblée en amont du traitement par l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-CD45 (Louis, Straathof et al. 2009). Des résultats encourageants ont été obtenus sur 8 patients en récurrence de CNP, pour lesquels une lymphodéplétion transitoire a pu être confirmée en association à une augmentation de l'IL-15 systémique. La fréquence des CTL EBV spécifiques a augmenté chez tous les patients et même de manière persistante pour 3 d'entre eux. Parmi ces 3 patients, 1 a été mis en rémission complète à 24 mois et 2 présentent une maladie stable à 12 et 15 mois (Louis, Straathof et al. 2009).

Un des problèmes récurrents énoncés par les investigateurs est le manque de spécificité épitopique des lignées générées, ainsi qu'une limitation quantitative et un déséquilibre de représentativité des cellules T CD4+ par rapport aux T CD8+. Ces deux obstacles majeurs tendent aujourd'hui à être résolus par différentes approches notamment des stratégies d'immunothérapie active, qui consiste à améliorer la reconnaissance des antigènes tumoraux par le système immunitaire.

L'équipe de Rickinson a proposé un essai thérapeutique testant l'efficacité d'un vaccin représenté par des cellules dendritiques pulsées avec des peptides dérivés de LMP2 réalisé sur 16 patients présentant une rechute locale ou des métastases après traitement conventionnel. Une réponse lymphocytaire des T CD8+ spécifiques a été obtenue chez 9 patients, et deux patients ont présenté une réponse partielle (Borza and Hutt-Fletcher 2002). Par ailleurs, des CTL EBV-spécifiques d'origine autologue ont été utilisées dans 3 essais cliniques chez des patients présentant une maladie de mauvais pronostic, récurrente ou réfractaire au traitement conventionnel. Les doses de CTL administrées variaient entre 2×10^7 et 3×10^8 cellules/m². Dans le premier essai (Chua, Huang et al. 2001), les 4 patients présentaient une masse tumorale importante. L'administration des CTL s'est accompagnée d'une augmentation de la fréquence des précurseurs EBV spécifiques et d'une diminution de la charge virale plasmatique mais sans effet clinique.

Outre l'utilisation des CD pulsées, des stratégies d'immunothérapie utilisant des vecteurs viraux afin de présenter des peptides d'EBV ont été évaluées. Dans ce contexte, l'équipe de Khanna avait récemment traité 22 patients présentant une récurrence de la maladie ou des métastases, avec des CTL autologues spécifiques de LMP1, LMP2 et EBNA1 générées à l'aide d'un vecteur adénoviral. L'expansion de CTL spécifiques d'EBV a réussi chez 16 patients qui ont reçu de 3 à 8 perfusions à raison de $2,3 \times 10^7$ cellules en moyenne. Les résultats montrent que 10 patients ont obtenu une stabilité de la maladie (à 63-420 jours) et 4 une progression de la maladie (à 38-64 jours) (Smith, Tsang et al. 2012).

Ces travaux apportent ici une alternative complémentaire notamment en remplacement de la chimiothérapie qui reste une thérapie non-spécifique et potentiellement toxique pour le patient. Cependant, ces approches d'immunothérapie doivent être améliorées et adaptées aux patients pour un bénéfice thérapeutique optimal, par exemple un vaccin polypeptidique basé sur des peptides immunogènes sélectionnés et restreints au système HLA du patient serait une approche prometteuse (Masmoudi, Toumi et al. 2007). Enfin, une meilleure compréhension des mécanismes d'échappement au système immunitaire et des interactions entre la tumeur et son hôte au niveau du microenvironnement tumoral, aideraient à concevoir des stratégies qui permettraient de contrer les résistances aux thérapies existantes (Masmoudi, Toumi et al. 2007).

VI. Objectifs de la thèse

Nous avons vu en introduction que EBV est impliqué dans plusieurs pathologies tumorales, notamment le CNP où s'expriment les antigènes de latence de type II. Cependant, la protéine EBNA1 est mal reconnue par les lymphocytes T CD8 alors que LMP1 est peu immunogène pour ces lymphocytes. Par conséquent, le contrôle immunitaire des tumeurs exprimant une latence de type II d'EBV repose essentiellement sur l'existence de LT CD4 spécifiques. Outre des LT CD4 classiques de type Th1, il existe des LT CD4 à activité cytotoxique, capables de reconnaître et de lyser des cibles exprimant des épitopes dérivés des antigènes de latence. Les approches d'immunothérapie dirigées contre le CNP doivent donc favoriser en priorité les réponses lymphocytaires T CD4 EBV-spécifiques. Cependant, privilégier une approche d'immunothérapie basée sur la stimulation d'une réponse T CD4 spécifique doit tenir compte de la sous-population des T CD4 immunosuppressive (Treg) et éviter sa stimulation puisque, dans le CNP, il existe un environnement immunosuppresseur aggravé par un recrutement important de ces cellules associées à un mauvais pronostic chez les patients. De plus, il a récemment été montré que les cellules de CNP sécrétaient des exosomes, détectés dans le plasma des patients, contenant des quantités élevées de galectine-9. De manière très intéressante, il a pu être montré que ces exosomes induisaient une mort des cellules T CD4+ Th1. Ainsi, la production massive d'exosomes par les CNP pourrait être un obstacle potentiel à une approche d'immunothérapie ciblant les T CD4 de par leurs propriétés immunosuppressives. A ce jour, il n'a jamais été décrit d'interaction entre ces deux acteurs majeurs de l'immunosuppression dans le CNP.

Dans ce contexte, les principaux objectifs de ma thèse ont consisté dans une première partie à étudier l'impact des exosomes tumoraux de CNP sur le phénotype et la fonctionnalité des Treg afin de déterminer s'il existe une coopération entre ces deux composantes immunosuppressives afin de mieux comprendre leur implication dans les mécanismes d'échappement du CNP au système immunitaire et leur rôle dans la progression tumorale. Dans une seconde partie, nous avons exploré dans le contexte du CNP les moyens de favoriser l'expansion et l'efficacité des effecteurs anti-tumoraux, notamment des lymphocytes T CD4+ Th1 anti-EBV, en proposant une stratégie d'immunothérapie peptidique se basant sur l'utilisation d'un cocktail de peptides, dérivés des antigènes de latence de type II d'EBV, contenant des épitopes T CD4 promiscuous capables d'être présentés par plusieurs molécules HLA II.

ARTICLE 1

ARTICLE 1**Les exosomes dérivés du carcinome du nasopharynx recrutent les lymphocytes T régulateurs humains, favorisent leur prolifération et augmentent leur activité régulatrice**

Nasopharyngeal Carcinoma-Derived Exosomes Recruit, Expand and Up-Regulate Biological Activities of Human Regulatory T cells

JNCI, Manuscrit en révision 2013

Dhafer Mrizak, Nathalie Martin, Clément Barjon, Anne-Sophie Jimenez-Pailhes, Rami Mustapha, Toshiro Niki, Véronique Pancré, Yvan de Launoit, Pierre Busson, Olivier Morales* and Nadira Delhem*.

* Co-dernier auteur

Résumé

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) et les exosomes sont retrouvés en quantité importante dans le carcinome du nasopharynx humain (CNP) et joueraient un rôle dans la prévention du rejet des cellules malignes. Dans cette étude, la capacité des exosomes (dérivés des lignées de CNP (NPC-Exo)) et du CCL-20 à favoriser le recrutement des Treg a été évaluée(i) *in vitro* par des expériences en chambre de Boyden et (ii) *in vivo* dans un modèle de souris SCID xénotransplantées avec un CNP humain et immunisées avec des anticorps monoclonaux anti-CCL20 (mAb). L'impact des NPC-Exo sur le phénotype et la fonction des Treg a été déterminé en utilisant des techniques adaptées (FACS, Q-PCR, ELISA et MLR). Toutes les expériences ont été effectuées en comparaison avec des exosomes isolés du plasma de donneurs sains (HD-Exo).

La chimiokine CCL20 permet le recrutement des Treg humains en intra-tumoral. Les NPC-Exo favorisent également le recrutement des Treg ($p < 0,001$), qui peut être significativement être inhibé par un mAb anti-CCL20 bloquant ($p < 0,001$). NPC-Exo sont capables aussi de recruter les lymphocytes T conventionnels CD4⁺CD25⁻, de médier leur conversion en cellules CD4⁺CD25^{high} fonctionnelles dans un mécanisme TGF- β 1 dépendant. NPC-Exo augmentent significativement ($p < 0,05$) l'expansion des Treg humains en induisant la génération de Treg Tim3^{low} et l'augmentation de l'expression du CD25 et du FoxP3. Finalement, NPC-Exo induisent une sur-expression de marqueurs cellulaires associés au phénotype du Treg (Lselectin, ICAMI, OX40), à sa fonction (TNF- α , Tbet, Granzyme B) et son recrutement (CCR6). Ces résultats sont confirmés par une plus forte suppression de la prolifération des cellules répondantes ($p < 0,001$), et la sécrétion de cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF- β 1).

Les interactions entre les NPC-Exo et les Treg représentent un nouveau mécanisme pouvant être impliqué dans la régulation de la tolérance périphérique par les tumeurs et dans l'échappement immunitaire dans le CNP humain.

Contexte et objectifs de l'étude

Un des paradoxes dans la pathogenèse du CNP est la persistance du virus et l'émergence d'un processus malin dans le contexte d'une inflammation locale et d'une infiltration leucocytaire majeure dans la tumeur primaire, associée à la production de plusieurs protéines virales immunogènes. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, il est clairement décrit dans les pathologies associées à EBV et plus particulièrement dans le CNP, l'existence de mécanismes importants d'échappement de la tumeur au système immunitaire. Par ailleurs, le groupe de Pierre Busson a récemment décrit, chez les patients ayant un CNP, une production importante d'exosomes tumoraux porteurs de la Galectine-9 capable de se lier au récepteur Tim3 présent principalement sur les lymphocytes T CD4⁺ Th1, entraînant leur mort par apoptose. En outre, il a été décrit un recrutement important de lymphocytes T régulateurs (Treg) chez les patients ayant un CNP, ces Treg représentant environ 12% des lymphocytes infiltrant la tumeur. Or l'implication importante des exosomes tumoraux et des Treg contribuent à créer un microenvironnement immuno-suppresseur persistant dans le CNP, ce pourrait constituer un frein aux différentes stratégies d'immunothérapie. A ce jour, l'existence d'interactions potentielles entre ces deux facteurs immunosuppresseurs n'a jamais été décrite.

Dans ce contexte, les principaux objectifs de cette étude ont été (i) d'explorer in vitro le potentiel immunosuppresseur des exosomes de CNP dans le contexte des Treg et (ii) d'étudier l'impact des exosomes sur le phénotype, l'expansion, le recrutement et la fonction des Treg.

Méthodologie et Principaux résultats

Dans un premier temps, nous avons confirmé par Q-PCR la sur-expression de la chimiokine CCL20 dans les lignées CNP parmi d'autres chimiokines (CCL- 4, 17, 18 et 22) connues pour attirer les Treg. Afin d'évaluer *in vivo* le rôle joué par la CCL20 dans le recrutement des Treg au sein de la tumeur, nous avons mis en place un modèle murin immunodéficient humanisé et xénotransplanté par une tumeur de CNP humain (SCID-hu-CNP). Ces souris ont été reconstituées par des PBMC humains enrichies avec 10% de Treg marqués par un colorant vital fluorescent (VT680). Nous avons secondairement neutralisé, le CCL20 par l'injection intra-péritonéale d'un anticorps monoclonal bloquant (anti-CCL20). De façon très intéressantes, des expériences de mesure de la fluorescence *in vivo*, réalisées directement sur les souris (grâce à l'imagerie du petit animal : Lumina IVIS), ont montré une diminution du recrutement des Treg dans les tumeurs des souris ayant reçu l'anti-CCL20. De plus, des expériences d'immuno-histo-fluorescence, réalisées sur les coupes congelées de ces tumeurs xénotransplantées, ont confirmé cette diminution significative du recrutement des Treg. Par ailleurs, nous avons pu montrer par une analyse en cytométrie de flux

(FACS), une augmentation des Treg humains de phénotype CD4⁺CD25⁺CD127^{low} dans le sang des souris du même groupe.

Dans une seconde partie de l'étude, nous avons montré par western-blot et ce pour la première fois que les exosomes de CNP (Exo-CNP) présentent la CCL20 alors qu'elle n'est pas exprimée dans les exosomes de donneurs sains (Exo-DS). L'utilisation d'une gamme de CCL20 recombinante nous a permis d'estimer la quantité de cette chimiokine à moins de 300 pg/μg d'exosomes. Cette expression a été confirmée par des expériences de microscopie électronique couplée à un marquage immunogold. De plus, des analyses par RT-qPCR ont montré une augmentation de l'expression du gène du récepteur de la CCL20 (CCR6) sur les Treg en présence des exosomes de CNP, suggérant une augmentation de la bio-disponibilité des Treg au CCL20 par rétrocontrôle positif.

Nous avons également montré que ces exosomes CCL20⁺ recrutent fortement les Treg, d'une manière CCL20-dépendante. En effet, des expériences de chimioattraction en chambre de Boyden montrent que la CCL20 recombinante et les Exo-CNP attirent fortement les Treg et que l'addition d'un anti-CCL20 neutralisant inhibe significativement ce recrutement. Les Exo-DS, quant à eux, attirent faiblement les Treg et le traitement par l'anti-CCL20 ne modifie pas cette attraction.

D'une manière intéressante, nous avons montré que les Exo-CNP peuvent également exercer une chimio-attraction modérée sur les TCD4 conventionnels CD4⁺CD25⁻. Dans ce contexte, nous avons évalué leur capacité à convertir ces TCD4 conventionnels en Treg CD4⁺CD25^{high}. Une analyse cytofluorométrique a montré un « shift » d'une fraction des CD4⁺CD25⁻ en CD4⁺CD25^{high} après 72 h et 120 h de traitement avec les Exo-CNP, et pas avec les Exo-Ds. Nous avons pu montrer (i) par ELISA que la conversion des T CD4⁺ conventionnels en Treg était dépendante de la production de la cytokine immunosuppressive, TGF-β et (ii) par MLR sur des PBMC autologues que les cellules « converties » CD4⁺CD25^{high} étaient dotées de propriété immunosuppressives.

En outre, les Treg sont décrits comme étant anergiques *in vitro*, or l'addition des exosomes de CNP stimule significativement la prolifération des Treg d'une manière dose-dépendante. Dans les mêmes conditions, les exosomes de DS ont un effet opposé à celui observé avec les exosomes de CNP et semblent inhiber l'expansion des Treg. De plus, des analyses par cytométrie de flux montrent une augmentation significative et dose-dépendante de la fraction CD4⁺CD25^{high} parmi les Treg en présence des exosomes de CNP, phénotype généralement correspondant à une population fortement suppressive. Enfin, nous avons étudié l'effet des exosomes de CNP sur l'expression du FoxP3, marqueur important des Treg, et avons montré que son expression augmente significativement chez

les Treg co-cultivés avec les Exo-CNP. A contrario, les exosomes de DS n'ont aucun effet sur la fraction CD4⁺CD25^{high} ou sur l'expression du FoxP3.

Et enfin, nous avons évalué par MLR sur des PBMC autologues, l'effet des exosomes sur l'activité immunosuppressive des Treg, montrant une augmentation significativement de cette activité suppressive qui n'est pas observé en présence des Exo-DS. L'augmentation de cette activité suppressive par les exosomes est accompagnée par une augmentation de la sécrétion de l'IL-10 et du TGF- β , principales cytokines immunosuppressives.

Conclusion

En conclusion, ce travail a montré pour la première fois, que les exosomes de CNP potentialisent le phénotype supprimeur des Treg, en favorisant leur expansion et leur différenciation, en augmentant leur capacité suppressive et en induisant leur chimioattraction. La mise en évidence d'une coopération entre les exosomes de CNP et les Treg est très importante car elle pourrait être impliquée dans la régulation de la tolérance périphérique des tumeurs et représenter ainsi un nouveau mécanisme d'échappement du CNP au système immunitaire.

----- Message original -----

Sujet:JNCI-13-1436: Complete Required Online Forms

Date :Thu, 31 Oct 2013 11:32:04 -0400

De :jncimanuscripts@oup.com

Pour :nadira.delhem@ibl.fr

Dear Dr. Delhem,

The Journal of the National Cancer Institute has **provisionally accepted** "Nasopharyngeal Carcinoma-Derived Exosomes Recruit, Expand and Up-Regulate Biological Activities of Human Regulatory T cells" by Dhafer Mrizak, Nathalie MARTIN, Clément BARJON, Anne-Sophie Jimenez-Pailhes, Rami MUSTAPHA, Toshiro Niki, Véronique PANCRE, Yvan de Launoit, Pierre BUSSON, Olivier MORALES, and Nadira Delhem. Before your revised manuscript will be reviewed, you must complete the following form(s) which are available via the link(s) below:

Corresponding Author Declarations:

<http://jnci.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A2O3JPR1A2lBK5w5A3B3F2A9XphacuWkkGYkQITJFTAZ>

Electronic Disclosure Form:

<http://jnci.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A1O2JPR6A1lBK5w1A4C7F4A9XphacuWkkGYkQITJFTAZ>

Please do not hesitate to contact the editorial office if you have any questions regarding these required forms.

Sincerely,

Carmen J. Allegra, M.D.
Editor-In-Chief
Journal of the National Cancer Institute
Oxford University Press

Nasopharyngeal Carcinoma-Derived Exosomes Recruit, Expand and Up-Regulate Biological Activities of Human Regulatory T cells

Dhafer Mrizak (1), Nathalie Martin (1), Clément Barjon (2), Anne-Sophie Jimenez-Pailhes (2), Rami Mustapha (1), Toshiro Niki (3.4), Joël Guigay (5), Véronique Pancré (1), Yvan de Launoit (1), Pierre Busson (2), Olivier Morales* (1) and Nadira Delhem* (1)

Running Title: NPC-derived exosomes increase Treg suppressive phenotype

Affiliations of authors:

- (1) CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, Université Lille-Nord de France, Institut Pasteur de Lille, IFR142, Lille, France
- (2) CNRS UMR 8126, Equipe "Microenvironnement tumoral, exosomes et microARN dans les tumeurs solides", Institut Gustave Roussy, Villejuif, France
- (3) GalPharma Co., Ltd. 884-3-302, Fuseishi-Cho, Takamatsu-shi, Kagawa 761-8071 Japan
- (4) Department of Immunology, Kagawa University. 1750-1 Ikenobe, Miki-Cho, Kagawa 761-0793 Japan
- (5) Department of head and Neck Oncology, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

Key Words: Exosomes, NPC, EBV, Regulatory T cells, Immune evasion.

Corresponding Authors:

Nadira Delhem, PhD

Institut de Biologie de Lille

1 rue du Professeur Calmette, 59021 Lille Cedex

Phone : +33 3 20 87 12 53

Fax : +33 3 20 87 10 19

Email: nadira.delhem@ibl.fr

Olivier Morales, PhD

Institut de Biologie de Lille

1 rue du Professeur Calmette, 59021 Lille Cedex

Phone : +33 3 20 87 12 51

Fax : +33 3 20 87 10 19

Email: olivier.morales@ibl.fr

ABSTRACT

Background: Regulatory T cells (Treg) and exosomes have been detected in human nasopharyngeal carcinoma (NPC) and may play a role in preventing the rejection of malignant cells.

Methods: The capacity of exosomes derived from NPC cell lines (NPC-Exo) and CCL20 to facilitate Treg recruitment was tested in-vitro using boyden chamber assays and in-vivo using a xenotransplant SCID mouse model, both in the presence and absence of anti-CCL20 monoclonal antibodies (mAb). Impact of NPC-Exo on Treg phenotype and function was determined using adapted assays (FACS, Q-PCR, ELISA and MLR). All experiments were performed in comparison with exosomes derived from plasma of healthy donors (HD-Exo).

Results: CCL20 chemokine allowed the intra-tumoral recruitment of human Treg. NPC-Exo also facilitated Treg recruitment ($p \leq 0.001$), that can be significantly inhibited by anti-CCL20 blocking mAb ($p \leq 0.001$). NPC-Exo were also able to recruit conventional $CD4^+CD25^-$ T cells and mediate their conversion into functional $CD4^+CD25^{high}$ cells through a TGF- β 1 dependent mechanism. NPC-Exo significantly enhanced ($p \leq 0.05$) the expansion of human Treg inducing the generation of Tim-3^{Low} Treg and increasing the expression of $CD25^{high}$ and FoxP3^{high}. Finally, NPC-Exo induced an overexpression of cell markers associated with Treg phenotype (Lselectin, ICAM1, and OX40), properties (TNF- α , Tbet, Granzyme B) and recruitment capacity (CCR6). These results were consistent with a stronger suppression of responder cells proliferation ($p \leq 0.001$), and the secretion of immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF- β 1).

Conclusion: Interactions between NPC-Exo and Treg represent a newly defined mechanism that may be involved in regulating peripheral tolerance by tumors and in supporting immune evasion in human NPC.

INTRODUCTION

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is an epithelial tumor of the nasopharynx associated with Epstein-Barr virus (EBV) (1, 2). Although NPC is rare in most of the world, it is endemic particularly in Southeast Asia suggesting a multifactorial etiology of NPC involving EBV infection, genetic predisposition, environmental factors and other factors still unknown (3-8).

An important biologic feature of NPC is the presence of a massive lymphoid infiltrate in the primary tumor, which is likely favored by inflammatory cytokines produced by malignant NPC cells (9-12). Several studies support the idea of local immune suppression that could explain the lack of efficiency of immune effector cells even after the correct homing. The presence of abnormal quantities of regulatory T cells (Treg) within the tumor site and peripheral blood is a clear indication of this immune suppression (13). Recent findings confirm the consistent production of galectin-9 (Gal-9) by NPC cells (14), in association with exosomes (15). Gal-9 is a β -galactoside binding lectin, produced by many cell types, and whose expression can be induced by different stimuli, such as pro-inflammatory cytokines (16) and even EBV infection (17). Tim3, a death inducing receptor expressed in mature Th-1 cells, has been shown to be a binding partner for Gal-9 (18). Klibi et al. have recently reported that Gal-9 containing exosomes selectively detected in the plasma of NPC patients or mice xenografted with NPC tumor lines, were able to induce apoptosis of EBV specific Th-1 lymphocytes through this Gal-9/Tim3 interaction. Their findings support the idea that NPC exosomes exert Th-1 suppressive functions at both the tumoral and systemic levels (19).

The specific mechanism of Treg recruitment within NPC and the putative interaction between NPC-derived exosomes and human Treg have not yet been addressed. So here, we

intended to investigate the existence of intercellular cross-talk between the tumor and immune cells that might regulate anti-tumor immune response. We showed, for the first time, that CCL20 chemokine plays a crucial role in the recruitment of human Treg into NPC tumor. We also reported that NPC-Exo have unique immunoregulatory properties. They induce Treg expansion and up-regulate their suppressive functions. They also promote the conversion of $CD4^{+}CD25^{-}$ T cells into Treg and enhance Treg chemoattraction via CCL20. Interactions of NPC-derived exosomes with Treg represent a newly defined mechanism that might be involved in regulating peripheral tolerance by tumor cells and in supporting immune evasion of human NPC.

MATERIAL AND METHODS

Isolation of T-cell Subsets

Human blood samples were collected from healthy adult donors with informed consent obtained in accordance with Institutional Review Board approval from the Institut de Biologie de Lille; Mononuclear cells (PBMC) were isolated from peripheral blood samples by density gradient centrifugation using Ficoll (GE healthcare, Uppsala, Sweden). Treg and CD4⁺ CD25⁻ conventional T cells (Tconv) were isolated from PBMC, using T cell isolation kits (Miltenyi Biotech, Germany). The purity of both isolated cells was >95%.

Exosomes Isolation

EBV-positive NPC tumor cell lines (C15 and C17) were xenografted and permanently propagated by subcutaneous passage in SCID mice as previously described (19). In accordance with institutional guidelines, homozygous CB-17 scid/scid (SCID) mice derived from breeding stocks provided by J.P Decavel (Institut Pasteur de Lille: IPL), were housed under specific pathogen-free conditions at the animal facility of the IPL (Lille, France). Exosomes from the C15 and C17 xenografts culture media (C15-Exo) were obtained as previously described (19). Exosomes from NPC patients and healthy donor's serum (HD-Exo) were also isolated using the same basic method as that use for C15 and C17 exosomes.

Electron Microscopy

C15-Exo or HD-Exo was diluted (1/10) in PBS and placed on a formvar-coated 200 mesh copper grids which were rinsed in distilled water, contrasted with 2% phosphotungstic acid (PTA) in distilled water for 1min, and dried over a paper towel. For CCL20 immuno-staining; with the exception of negative controls; diluted exosomes were blocked using 1% BSA buffer and rinsed in PBS before addition of primary mouse anti-human CCL20 monoclonal antibody

(mAb) at 0.2 $\mu\text{g/mL}$ (PeproTech Inc, Rocky Hill, USA) diluted 1:50 in PBS. Grids were rinsed once with PBS before adding of the secondary antibody; 10 nm gold bead anti-mouse mAb; and then 3 times after. Grids were then fixed with glutaraldehyde 1%, washed with distilled water, contrasted with 2% PTA in distilled water for 1min, and dried over paper towels. Images were obtained with a Hitachi H7500 transmission electron microscope (TEM) equipped with a wide-field 1024x1024-pixel digital camera from AMT Advantage HR (Elexience, France).

Humanized SCID Mice Model

Anesthetized SCID mice were subcutaneously xenotransplanted with NPC tumors induced by C15 cells. The protocol was approved by the local Ethical Committee of the IPL performed with required permission and approval of the regional governing ethical board (approval number CEEA 152010). After the development of visible tumors (about 6 to 8 weeks), mice were splenectomized and reconstituted or not by intraperitoneal injection of $20 \cdot 10^6$ PBMC isolated from healthy donor blood and enriched by 10% of autologous Treg labelled with VivoTag 680 (VT680; Ex: 670 $\pm$ 5 nm; MW: 1240 gmol^{-1}) (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). The mice also received, or not, intra-peritoneal injection of 200 μg of anti-CCL20 mAb (PeproTech). At day 3, fluorescence analysis was assessed at 10 and 15 mm high with IVIS LUMINA XR reader (Caliper Life Sciences). Images were then analyzed under the Living Image 4.1 software (Caliper Life Sciences) and results were obtained after spectral unmixing according to manufacturer's instructions.

Immuno-histo-fluorescence

Tumors were fixed in 4% paraformaldehyde solution at 4°C and then protected overnight under 30% sucrose solution. Tumors were then frozen in OCT compound (VWR, Leuven, Belgium) and cut with a cryotom (Frigocut E2800, Leica, France) to obtain 5 μm slices.

Tumor slices were post-fixed 5 min under a pre-cooled acetate solution, rinsed with PBS (pH=7.4) and distilled water bath. Blocking was done under a 3% BSA (Sigma France) PBS solution for 1 hour at room temperature (RT), in a humid chamber. Tumor slides were then stained with 1/5000 DAPI (Invitrogenn, St Aubin, France) solution for 10min in the dark, then rinsed and finally fixed with 4% PFA solution. After final rinse, tumor slides were attached using Mowiol solution. Fluorescence analysis was assessed with confocal microscopy and images were analyzed under Zen software.

Migration Assay

Treg and CD4⁺CD25⁻ T cells were harvested and suspended at a concentration of 10⁶ cells/mL in RPMI 1640. The chemotaxis protocol was performed as previously described (23). Assays were performed either with increasing concentrations of exosomes (0.1, 1 and 10 µg/mL) in the presence or absence of blocking anti-CCL20 mAb (PeproTech) at concentrations ranging from 0.1 to 10 µg/mL. RPMI and 10⁻⁷ of SDF1α (PeproTech) were used as both negative and positive chemotaxis control respectively. Human recombinant CCL20 (0.05 µg/mL) (PeproTech) in presence or absence of blocking anti-CCL20 (10 µg/mL) was also used as specific control. Each condition was performed in triplicate. Cells that migrated through the filter were counted in the inferior well. Results were expressed as index of chemotaxis compared with negative control.

Statistical Analyses

SigmaStat software were used for data treatment and statistical analysis. All quoted *P*-values are two-sided, with *P* > .001 (*) and *P* < .001 (**) being considered statistically significant and highly significant respectively.

RESULTS

Phenotypic and functional characteristics of exosomes

Electron microscopy showed that C15-Exo have homogeneous sizes between 30 and 60 nm (Fig.1A). The protein content of C15-Exo was assayed by western-blot (Fig.1B) and compared with (i) LCL (EBV⁺ Lymphoblastoid Cell Lines) proteins, (ii) LCL-derived exosomes and (iii) C17 (another NPC cell line-derived exosome), used as positive control. As expected, both NPC-Exo expressed the oncolytic EBV protein LMP-1, HLA-Dr α , tetraspanin CD63 and Gal-9, whereas they did not express Grp94. By contrast, Gal-9 was not detected in HD-Exo (Fig.1B).

As previously described, only C15-Exo and not HD-Exo significantly suppressed Tconv cell proliferation mainly after 120 h culture at 1 μ g/mL ($p = 0.034$) and 10 μ g/mL ($P = 0.048$) concentrations (Fig.1C₁). In fact, a significant proliferation increase was observed with HD-exo mainly after 48 h of culture at 0.1 and 1 μ g/mL ($P = 0.009$) concentrations (Fig. 1 C₂).

CCL20 facilitates the recruitment of Treg within the tumor

We confirmed that C15 NPC cell lines express several Treg attracting chemokine genes, among which CCL20 remains the major one with an 8 to 10 fold increase (Fig.2A₁). A humanized NPC mouse model was established under well-defined protocol (Fig.2A₂) to analyze in-vivo recruitment of intra-tumoral Treg by CCL20.

Fluorescence analysis performed directly on mice showed a preferential recruitment of Treg within the tumor of mice which have received PBMC supplemented with VT 680 labeled-Treg. Interestingly; we observed a decrease of this recruitment in similarly reconstituted mice having also received anti-CCL20 mAb (Fig.2B₁). Immuno-histo-fluorescence on the frozen NPC xenotransplants showed a significant decrease of Treg recruitment in the same mouse

group confirming the previous result (Fig.2B₂). Furthermore, we noted by FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) analysis, an increase in the frequency of human Treg having CD4⁺CD25⁺CD127^{low} phenotype in the blood of the same mice group (Fig.2C). We also showed an increase of CD4⁺, CD8⁺ and NK cells in the same group. All these FACS analysis were summarized in Table II showing the percent of different human immune cells populations in blood of reconstituted mice which received or not anti-CCL20 mAb.

NPC-derived exosomes express the CCL20

Western Blot analysis revealed the presence of CCL20 in C15-Exo and not HD-Exo. Using a standard range of varying CCL20 concentrations, the expression of this chemokine was semi-quantitatively estimated at less than 300 pg/μg of exosomes (Fig.3A₁). Furthermore, this expression was confirmed by electron microscopy, showing immunogold staining on C15-Exo and not HD-Exo (Fig.3A₂). Moreover, RT-QPCR analysis showed an increase of CCL20-receptor (CCR6) gene expression in Treg in presence of C15-Exo (Fig.3A₃).

CCL20⁺ NPC-Exo preferentially recruit human Treg

Compared to the negative control, human recombinant CCL20; like the positive control (SDF1α); could significantly attract Treg ($P < .001$). This effect was significantly blocked ($P < .001$) by specific anti-CCL20 mAb. Moreover, C15-Exo had a similarly significant chemoattractive effect when comparing to the control ($P < .001$), yet when pre-treated with anti-CCL20 mAb this effect was significantly decreased in a dose-dependent manner ($P < .001$). Finally a slight chemoattractive effect was observed with HD-Exo which was not affected by anti-CCL20 mAb pre-treatment.(Fig.3B).

NPC-Exo recruit $CD4^+CD25^-$ T lymphocytes and induce their conversion into $CD4^+CD25^{high}$ Treg cells.

As seen above, NPC-Exo were able to significantly attract human Treg in a dose-dependent manner (from $P = 0.01$ to $P = 0.002$). However and very interestingly, C15-Exo could also induce a weak chemoattraction of Tconv cells (Fig.4A). In this context, we evaluated the ability of NPC-Exo to convert Tconv cells into $CD4^+CD25^{high}$ Treg. Biparametric FACS analysis shows a shift in the $CD4^+CD25^-$ cell fraction phenotype towards the $CD4^+CD25^{high}$ after 72 h and 120 h of treatment with 10 $\mu\text{g/mL}$ of C15-Exo (Fig.4B₁). However, no variations could be observed in the same $CD4^+CD25^-$ fraction with HD-Exo treatment neither at 72 h nor 120 h (Fig.4B₃). Using increasing concentrations of C15-Exo we demonstrated via FACS analysis a significant conversion ($P = 0.008$) of $CD4^+CD25^-$ into $CD4^+CD25^{high}$ T cells after 72 h of treatment (Fig. 4B₂). No significant change was observed with HD-Exo treatment at the tested times and concentrations (Fig. 4B₄).

Moreover, along with this conversion, we observed; after 48 and 72 h of treatment; an increase of TGF- β 1 production which was proportional to the added dose of exosome (Fig.5A). Finally, the regulatory potential of these “converted” $CD4^+CD25^{high}$ T cells was assessed via MLR with autologous PBMC. A dose dependent regulatory effect was observed with these cells being more capable of suppressing PBMC proliferation as their ratio in the population increases (Fig 5B).

NPC-Exo expand human Treg and promote their regulatory phenotype

As previously described the anergic state of Treg in-vitro could be overcome under proliferative conditions (20). Here we show that incubation of Treg with increasing concentrations C15-Exo could induce a proliferative condition in a dose-dependent manner

with the increase in proliferation being significant from 1 µg/mL ($P = 0.0048$) (Fig.6A₁). Contrary to C15-Exo, HD-Exo induced a decrease in Treg proliferation being significant at 10 µg/mL ($P = 0.003$) in the same experimental conditions (Fig.6A₂).

Using biparametric FACS analysis to assess the cellular phenotype after this proliferation, we observed an increase of the CD4⁺CD25^{high} fraction among the Treg population after 48 h of treatment with 10 µg/mL of C15-Exo (Fig.6B₁). No change could be detected following HD-Exo treatment (Fig.6B₁). Using increasing concentrations of C15-Exo we demonstrated via FACS analysis a significant increase of the CD4⁺CD25^{high} fraction after 48 h of treatment in a dose-dependent manner (Fig. 6B₂). No significant change was observed with HD-Exo treatment at the tested concentrations (Fig. 6B₂).

Finally we studied the effect C15-Exo on Foxp3 (Forkhead box P3) expression. FACS analysis of Treg after treatment with 10 µg/mL of C15-Exo for 48 hours revealed an increase of FoxP3 expression. No change was detected following HD-Exo treatment (Fig.6C₁). In fact, normalized values of CD4⁺CD25⁺FoxP3^{high} expression on Treg, obtained by tri-parametric FACS analysis, confirmed that treatment with 10 µg/mL of C15-Exo induced an increase of this fraction, whereas HD-Exo did not affect it (Fig.6C₂).

NPC-Exo increase the suppressive function of human Treg.

In order to assess the effect of NPC-Exo on the suppressive function of Treg, we started by evaluating the change in the genetic expression of some Treg and cell death related markers as well as that of some immunosuppressive and pro-inflammatory cytokines. In fact, 48 h after treating Treg with C15-Exo, transcriptomic analysis showed an increase in the expression of the selected genes relative to that of non-treated Treg used as internal control: OX40 (2 folds),

L Selectin (3.5 fold), ICAM1 (6 fold), Tbet (2 fold), TNF- α (2 fold), Granzyme B (22 fold), TGF- β 1 (2 fold) and IL-10 (3.5 fold), IL-2 (2 fold) and IL-15 (7 fold) (Fig 7A)

This change of suppressive activity was also assessed by MLR of autologous activated PBMC and Treg. Under our experimental conditions, ex-vivo isolated Treg could innately suppress PBMC proliferation by about 15% to 30%. However, following the addition of C15-Exo, this suppressive activity was significantly enhanced in a dose dependent manner (Fig.7B₁). No effect could be observed following HD-Exo treatment (Fig.7B₂).

Finally, we studied Treg cytokine release profile to further assess this change in suppressive activity. Comparing the MLR with C15-Exo to the MLR without exosomes we observed an increase of IL-10 secretion by 36.5% and 31.7 % in the presence of 0.1 and 1 μ g/mL of C15-Exo respectively. The change in the secretion was less significant with 10 μ g/mL of C15-Exo (Fig.7C). An increase of TGF- β 1 was also observed after 48 h of treating Treg alone with C15-Exo (Fig. 7D).

DISCUSSION

The emergence of a malignant process producing several immunogenic viral proteins in a context of local inflammation and heavy leukocytic infiltration remains a major paradox of NPC pathogenesis. For a long time, the search for local immunosuppressive factors has been disappointing (10, 24). This lack of explanation was, in part, compensated by recent findings that confirm the consistent production of Gal-9 by NPC cells (14) in association with exosomes (15).

Exosomes are produced and stored in multivesicular bodies. In accordance with the literature, we confirmed that they have a characteristic size of 30-100 nm and express specific proteins of the endosomal compartments. Many studies have explored their formation, the expression of specific molecules on their surface and their possible functions, mainly to define their immunogenic or immunosuppressive characteristics (25, 26). It has been demonstrated that tumor derived exosomes are abundant in the blood and malignant effusions derived from cancer patients. Recent evidence has revealed that tumor exosomes can exert a broad array of detrimental effects on the immune system, ranging from apoptosis of activated cytotoxic T cells, impairment of dendritic cell maturation from monocytes to induction of myeloid-suppressive cells and Treg. Exosomes released by tumors may thus be implicated in elucidating a tolerogenic response as well as other immunological mechanisms. As a result of the abundant and aberrant release of exosomes by tumors, tumor-derived exosomes may enable the circumvention of immunoregulatory antigen delivery pathways and evade immunosurveillance (27-29).

Several studies support the idea that it is a local immune suppression rather than a systemic immune deficiency that contributes to NPC tumor development. Tumors evade immune surveillance by generating an immunosuppressive micro-environment mostly induced by immunosuppressive cytokine release such as IL-10 or TGF- β 1 (30-32), or tumor

growth factor such as VEGF (33) and by inducing and/or maintaining peripheral Treg (34). Most of the studies implicate Treg as the main effector of tumor immune escape (35). Treg massively infiltrate tumors -as well as draining lymph nodes- probably attracted by excessive tumor antigens in a pro-inflammatory environment (36). One key aspect of this attraction is the secretion by tumor cells and tumor infiltrating macrophages of several chemokines such as CCL4, CCL11, CCL17, CCL20 or CCL22 known to attract CCR3, 4, 6 or 8 positive Treg (36,37). It should be noted that normally Treg proliferation does not take place in thymus but rather in secondary lymphoid organs mostly from the conversion of conventional CD4⁺CD25⁻FoxP3⁻ T cells (38) in a TGF- β 1 dependent manner (32).

Our findings demonstrate for the first time that Treg are selectively recruited to NPC by CCL20 chemokine. These findings further emphasize the need to develop new therapeutic strategies based on Treg targeting. We are the first to report the unique immunoregulatory potential of NPC-Exo defined by their ability to induce Treg expansion and up-regulate their suppressive functions. They also promote the conversion of CD4⁺CD25⁻ T cells into Treg and enhance Treg chemoattraction via CCL20. Very interestingly, we have confirmed the main results with plasma-derived exosomes from NPC patients (supplementary data) suggesting that the previous findings would be physiologically relevant *in vivo*.

NPC-Exo interaction with Treg could present a novel mechanism for regulating tumor induced peripheral tolerance leading to human NPC immune system evasion. The data obtained indicates that NPC-Exo could enhance innate regulatory potential of Treg at several levels and use them in the formation of a tumor microenvironment allowing immune suppression and escape from host immune-surveillance.

Acknowledgments:

This work received the financial support from the “Association de Recherche contre le Cancer”, the “Fondation de Recherche Médical”, OSEO and the Nord-Pas-de Calais Region. This work was also supported by SIRIC ONCOLille.

We thank Han Wong and Niels Wandrille for their technical assistance, and Jean-Pierre Decavel, Thierry Chassat and Anthony Mouray for their technical support.

BIBLIOGRAPHY

1. Bray F, Haugen M, Moger TA, Tretli S, Aalen OO, Grotmol T. Age-incidence curves of nasopharyngeal carcinoma worldwide: bimodality in low-risk populations and aetiologic implications. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(9):2356-65.
2. Chan AT. Nasopharyngeal carcinoma. *Ann Oncol* 2010;21 Suppl 7:vii308-12.
3. Yap YY, Hassan S, Chan M, Choo PK, Ravichandran M. Epstein-Barr virus DNA detection in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;136(6):986-91.
4. Liebowitz D. Nasopharyngeal carcinoma: the Epstein-Barr virus association. *Seminars in oncology* 1994;21(3):376-81.
5. Lu SJ, Day NE, Degos L, et al. Linkage of a nasopharyngeal carcinoma susceptibility locus to the HLA region. *Nature* 1990;346(6283):470-1.
6. Zheng X, Yan L, Nilsson B, Eklund G, Drettner B. Epstein-Barr virus infection, salted fish and nasopharyngeal carcinoma. A case-control study in southern China. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 1994;33(8):867-72.
7. Gallicchio L, Matanoski G, Tao XG, et al. Adulthood consumption of preserved and nonpreserved vegetables and the risk of nasopharyngeal carcinoma: a systematic review. *International journal of cancer* 2006;119(5):1125-35.
8. Hildesheim A, Wang CP. Genetic predisposition factors and nasopharyngeal carcinoma risk: A review of epidemiological association studies, 2000-2011 Rosetta Stone for NPC: Genetics, viral infection, and other environmental factors. *Seminars in cancer biology*.
9. Busson P, Braham K, Ganem G, et al. Epstein-Barr virus-containing epithelial cells from nasopharyngeal carcinoma produce interleukin 1 alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987;84(17):6262-6.
10. Huang YT, Sheen TS, Chen CL, et al. Profile of cytokine expression in nasopharyngeal carcinomas: a distinct expression of interleukin 1 in tumor and CD4+ T cells. *Cancer research* 1999;59(7):1599-605.
11. Tang KF, Tan SY, Chan SH, et al. A distinct expression of CC chemokines by macrophages in nasopharyngeal carcinoma: implication for the intense tumor infiltration by T lymphocytes and macrophages. *Human pathology* 2001;32(1):42-9.
12. Teichmann M, Meyer B, Beck A, Niedobitek G. Expression of the interferon-inducible chemokine IP-10 (CXCL10), a chemokine with proposed anti-neoplastic functions, in Hodgkin lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *The Journal of pathology* 2005;206(1):68-75.
13. Lau KM, Cheng SH, Lo KW, et al. Increase in circulating Foxp3+CD4+CD25(high) regulatory T cells in nasopharyngeal carcinoma patients. *British journal of cancer* 2007;96(4):617-22.

14. Pioche-Durieu C, Keryer C, Souquere S, et al. In nasopharyngeal carcinoma cells, Epstein-Barr virus LMP1 interacts with galectin 9 in membrane raft elements resistant to simvastatin. *Journal of virology* 2005;79(21):13326-37.
15. Keryer-Bibens C, Pioche-Durieu C, Villemant C, et al. Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. *BMC cancer* 2006;6:283.
16. Hirashima M, Kashio Y, Nishi N, et al. Galectin-9 in physiological and pathological conditions. *Glycoconjugate journal* 2004;19(7-9):593-600.
17. Carter KL, Cahir-McFarland E, Kieff E. Epstein-barr virus-induced changes in B-lymphocyte gene expression. *Journal of virology* 2002;76(20):10427-36.
18. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nature immunology* 2005;6(12):1245-52.
19. Klibi J, Niki T, Riedel A, et al. Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Blood* 2009;113(9):1957-66.
20. Miroux C, Morales O, Ghazal K et al. In vitro effects of cyclosporine A and tacrolimus on regulatory T-cell proliferation and function. *Transplantation* 2012; 94(2):123-27.
21. Moralès O, Depil S, Mrizak D, et al. EBV Latency II-derived peptides induce a specific CD4⁺ cytotoxic T-cell activity and not a CD4⁺ regulatory T-cell response. *J immunoth* 2012; 35(3):254-66.
22. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4):402-8.
23. Chenivesse C, Chang Y, Azzaoui I et al. Pulmonary CCL18 recruits human regulatory T cells. *J Immunol* 2012; 1;189(1):128-37.
24. Ho SY, Guo HR, Chen HH, Hsiao JR, Jin YT, Tsai ST. Prognostic implications of Fas-ligand expression in nasopharyngeal carcinoma. *Head & neck* 2004;26(11):977-83.
25. Chaput N, Thery C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Seminars in immunopathology* 2011;33(5):419-40.
26. Taylor DD, Gercel-Taylor C. Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *British journal of cancer* 2005;92(2):305-11.
27. Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature reviews* 2009;9(8):581-93.
28. Whiteside TL. Tumour-derived exosomes or microvesicles: another mechanism of tumour escape from the host immune system? *British journal of cancer* 2005;92(2):209-11.
29. Valenti R, Huber V, Iero M, Filipazzi P, Parmiani G, Rivoltini L. Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression. *Cancer research* 2007;67(7):2912-5.
30. Curiel TJ. Treg and rethinking cancer immunotherapy. *The Journal of clinical investigation* 2007;117(5):1167-74.
31. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual review of immunology* 2006;24:99-146.
32. Liu VC, Wong LY, Jang T, et al. Tumor evasion of the immune system by converting CD4⁺CD25⁻ T cells into CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol* 2007;178(5):2883-92.
33. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nature medicine* 1996;2(10):1096-103.
34. Wada J, Suzuki H, Fuchino R, et al. The contribution of vascular endothelial growth factor to the induction of regulatory T-cells in malignant effusions. *Anticancer research* 2009;29(3):881-8.

35. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature reviews* 2006;6(4):295-307.
36. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *International journal of cancer* 2010;127(4):759-67.
37. Mailloux AW, Young MR. Regulatory T-cell trafficking: from thymic development to tumor-induced immune suppression. *Critical reviews in immunology* 2010;30(5):435-47.
38. Valzasina B, Piconese S, Guiducci C, Colombo MP. Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4+CD25- lymphocytes is thymus and proliferation independent. *Cancer research* 2006;66(8):4488-95.
39. Chang KP, Hao SP, Chang JH et al. Macrophage inflammatory protein-3alpha is a novel serum marker for nasopharyngeal carcinoma detection and prediction of treatment outcomes. *Clin Cancer Res.* 2008;14(21):6979-87.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1. Phenotypical and functional characterization of NPC and HD derived-exosomes. **A.** Electron microscopy of a C15-Exo suspension contrasted with 2% phosphotungstic acid (PTA). In section (a) the diameter of 2 vesicles was measured. Scale bar represents 100 nm. The image is representative of 4 independent experiments. **B.** Equal amounts of LCL proteins or LCL, C15, C17 or HD exosomes were analyzed by Western blotting for HLA DR, CD63 and Grp94 as common markers and for LMP1 and galectin-9 as NPC-specific markers. **C.** CD4⁺ T cells were isolated from blood of healthy donors, then activated by anti-CD3 and anti-CD28 mAbs and incubated with increasing amounts of **1.** C15-Exo or **2.** HD-Exo. Proliferation was measured using [³H]thymidine incorporation assay during the last 18 hours and values were obtained as counts per minute (cpm). Assays were performed after 48 and 120 h of culture. The results present normalized cpm values of triplicate wells of 3 independent experiments $\pm$ standard deviation (SD) bars.

Figure 2. Impact of CCL20 on Treg recruitment into NPC tumor. **A. 1.** Gene expression analysis (RT-Q-PCR) of several chemokines associated with Treg chemotaxis performed on C15 cells. Results are presented as means of 3 independent experiments expressed in $1/\Delta Ct \pm$ SD bars. **2.** Schematic representation of the established humanized NPC mouse model. Freshly isolated Treg ($4.10^6/\text{mL}$) were incubated with 30 mg/mL of VT680. The VT680 labeled-Treg were washed twice in PBS before being added to autologous PBMC at a 9(PBMC):1(Treg) ratio. Confocal microscopy under Zen software (upper right image) was used to assess Treg labelling in the various cell mixes before their use in C15-SCID-Hu mice model for CCL20 chemotactic cell migration assay. Mice only received one intra-peritoneal (i.p.) injection of anti-CCL20 or IgG1 isotype control. Using this experimental protocol four groups of C15 sub-cutaneously (s.c.) xenotransplanted SCID mice were established: **(i)** a control group only receiving IgG1 isotype control without PBMC and anti-CCL20 (n=5); **(ii)**

a group only receiving PBMC enriched with 10% of Treg (n=5); **(iii)** a group only receiving PBMC enriched with 10% of VT 680 labeled Treg (n=5) and **(iv)** a group receiving both PBMC enriched with 10% of VT 680 labeled-Treg and anti-CCL20 (n=5). Three days later tumors were analyzed in-vivo. Mice were then ethically sacrificed and extracted tumors and blood were analyzed using immune-fluorescence (IF) and FACS respectively. **B. 1.** Fluorescence measurements in-vivo (IVIS-LUMINA RX) at 2 levels (10 and 15 mm) of 4 mice groups, from left to right **(i)** non-reconstituted **(ii)** reconstituted with PBMC + 10% of Treg **(iii)** reconstituted with PBMC + 10% of VT 680 labeled Treg + anti-IgG1 mAb and **(iv)** reconstituted with PBMC + 10% of VT 680 labeled Treg + anti-CCL20 mAb. **2.** Confocal analysis of 5 μ m tumor slices stained with DAPI (blue). White arrows on the left image indicate the presence of VT680 labeled-Treg. **C. 1.** FACS analysis of human cells in mice blood. **2.** dot plots illustrating the percentage of human $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ (Treg) found in groups **(iii)** and **(iv)**.

Figure 3. Treg recruitment by NPC derived-CCL20⁺ exosomes. **A. 1.** Semi-quantitative western blot detecting CCL20 on C15-Exo and HD-Exo, compared to a range of human recombinant CCL20 proteins. **2.** Electron microscopy after immunogold staining of purified C15-Exo (0.05 to 0.15 μ g/mL) (left panel) and HD-Exo (0.015 to 0.065 μ g/mL)(right panel) pre-incubated with primary anti-CCL20 mAb. **3.** Gene expression analysis of CCR6 (CCL20 receptor) by RT-QPCR, in Treg $\pm$ 10 μ g/mL of C15-derived exosomes after 48 h of culture. **B.** Chemotactic potential of C15-derived exosomes on $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T cells assessed in Boyden chamber, using RPMI medium as negative control and SDF1- α and recombinant CCL20 as positive controls. Results are presented as means of quadruplicates of 4 independent experiments expressed in index of chemotaxis related to medium $\pm$ SD.

Figure 4. Recruitment of $CD4^+CD25^-$ T cells and conversion into Treg by NPC-derived exosomes. **Figure 4.** Chemotaxis assays were performed in Boyden chamber with different

doses of C15-Exo (0.1, 1 and 10 $\mu\text{g/mL}$), RPMI medium as negative control and SDF1- α as positive control. Results are presented as means of quadruplicates wells of 4 independent experiments expressed in index of chemotaxis related to medium $\pm$ SD bars. **B.** Purified $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T cells were cultured $\pm$ C15-Exo or HD-Exo (10 $\mu\text{g/mL}$), then analyzed by FACS after 72 h and 120 h of culture. Data represents the frequency of $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$ cells within $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ initial cells and shows in **1.** and **2.** that C15-Exo significantly increases the frequency of $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$ fraction after 72 h and 120 h of culture compared to control and in **3.** and **4.** that HD exosomes treatment does not change it. **1.** and **3.** are representative of 5 independent experiments while **2.** and **4.** results are presented as means of 5 independent experiments expressed in normalized values of frequency of $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$ cells $\pm$ SD bars.

Figure 5. Functionality of converted $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T cells. **A.** TGF- β 1 secretion after 48 h or 72 h treatment of $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T cells with increasing concentration of C15-Exo or HD-Exo. Results present the means in pg/mL of duplicate of 3 independent experiments $\pm$ SD bars. **B.** $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ cells we pre-incubated for 48 h with increasing amounts (0.01 to 10 $\mu\text{g/mL}$) of C15-Exo before being co-cultured for 48 h with autologous PBMC at varying PBMC : $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ ratios ranging from 1:0.5 to 1:3 and activated by anti-CD3 and anti-CD28 mAbs. Proliferation was determined by [^3H]thymidine incorporation for the last 18 hours. Results are presented as means of triplicates of 5 independent experiments expressed in normalized values of proliferation from cpm $\pm$ SD bars.

Figure 6. Impact of NPC-derived exosomes on Treg phenotype. Purified $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{FoxP3}^+\text{CD127}^{\text{low}}$ Treg were cultured for 48 h with increasing amounts of C15-Exo or HD-Exo. After which, their phenotypic changes were assessed by studying proliferative potential (**A**), membranous markers (**B**) and intracellular markers (**C**) **A.** Effects of C15-Exo or HD-Exo on Treg cell proliferation. Treg were expanded polyclonally using

anti-CD3 (100 ng/mL), anti-CD28 (100 ng/mL) mAbs, high dose of interleukin (IL)2 (300 U/mL) and irradiated (4000 Gy) autologous PBMC (2:1 ratio) for 48 hours in standard medium (0) or in contact of increasing concentration of C15-Exo (**A1.**) or HD-Exo (**A2.**). Results are presented as means of triplicates wells of 5 independent experiments. Proliferation assays were determined by [^3H]thymidine incorporation and estimated in normalized values form cpm. **B. 1.** Characterization of membranous markers of isolated Treg after 48 h culture in the absence (control) or presence of 10 $\mu\text{g/mL}$ of C15-Exo or HD-Exo. Cells were analyzed by flow cytometry. The number in the upper-right quadrant indicates the percentage of $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$ Treg cells within the $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T cell population. **2.** Results represent the means of 5 independent experiments expressed in normalized values of frequency of $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$ fraction within C15-Exo or HD-Exo treated Treg $\pm$ SD bars. **C. 1.** FoxP3+ expression in untreated Treg (blue line), C15-Exo (10 $\mu\text{g/mL}$) treated Treg (orange line) and HD exosomes treated Treg (red line). Representative results of 3 independent experiments. **2.** Results present the means of normalized values of frequency of $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^{\text{high}}$ fraction within Treg of 3 independent experiments $\pm$ SD bars.

Figure 7. Impact of NPC-derived exosomes on Treg functions. **A.** Gene expression analysis (Q-PCR) of several markers associated with Treg immunosuppressive phenotype and function after 48 h of incubation with 10 $\mu\text{g/mL}$ C15-Exo. Results are expressed as relative gene expression ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) and presented as means of 4 independent experiments $\pm$ SD bars. **B.** Co-culture of PBMC and Treg in the presence of increasing amounts of either C15-Exo (**B1.**) or HD-Exo (**B2.**) Results represent the means of normalized values of proliferation of 4 independent experiments $\pm$ SD bars. **C.** IL-10 amounts were determined by ELISA of the supernatants of Treg, PBMC and PBMC+Treg cultured for 48 hours in the presence of increasing amounts of C15-Exo. Results represent the means of duplicate wells of 3 independent experiments expressed in pg/mL $\pm$ SD bars. **D.** TGF- β 1 amounts determined by

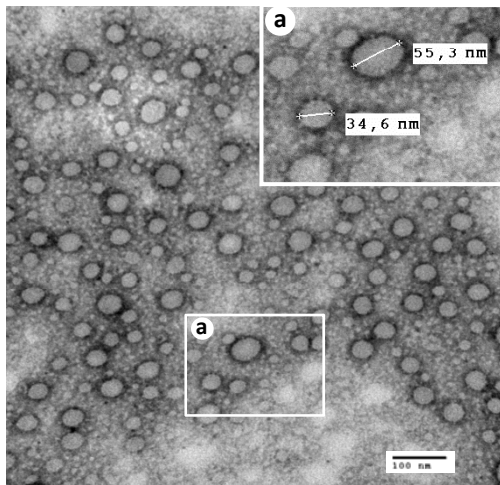
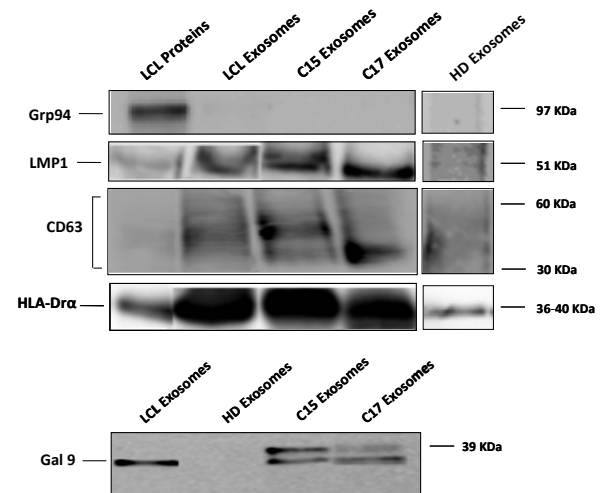
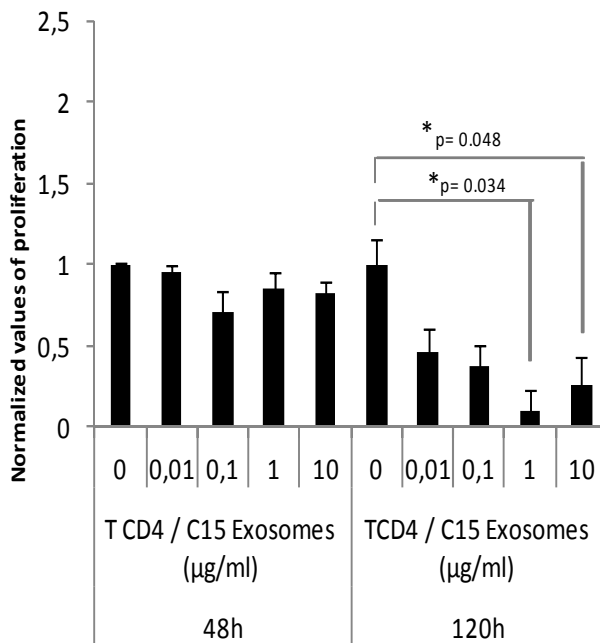
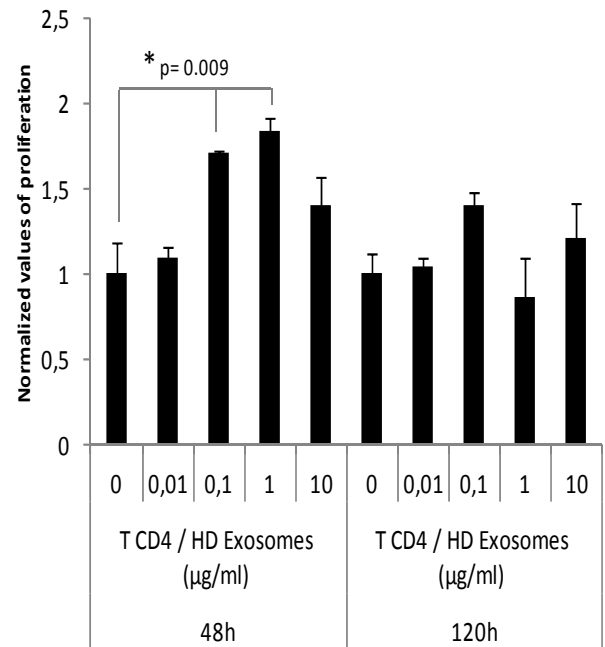
ELISA of supernatants of Treg cell cultured for 48 h with C15-Exo or HD-Exo. Results represent the means of duplicate wells of 3 independent experiments expressed in pg/mL $\pm$ SD bars.

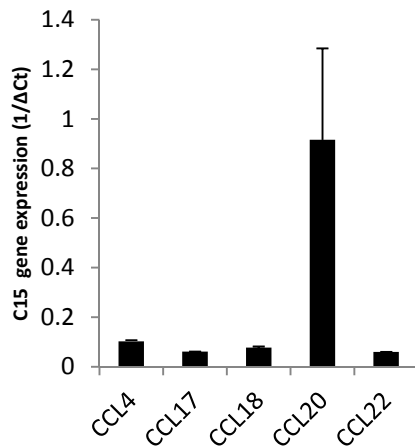
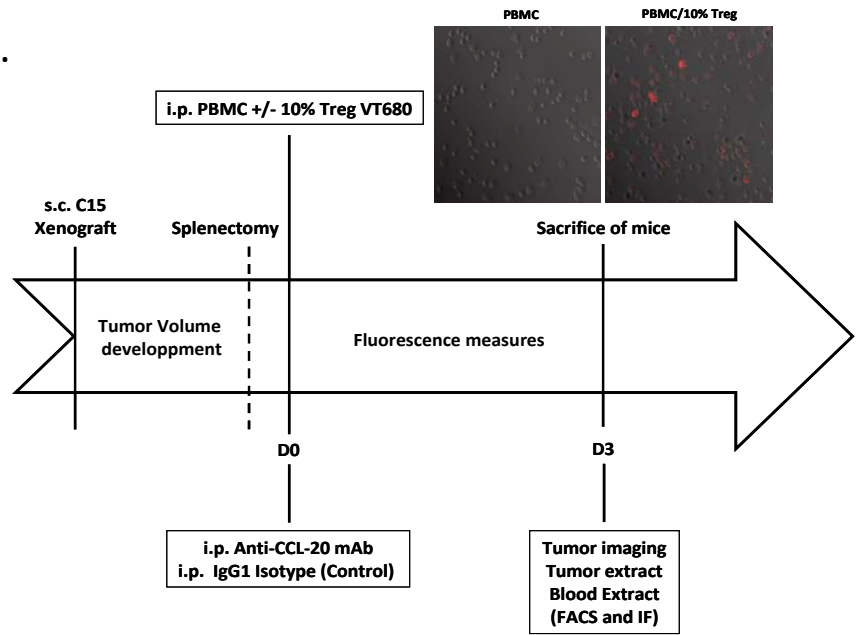
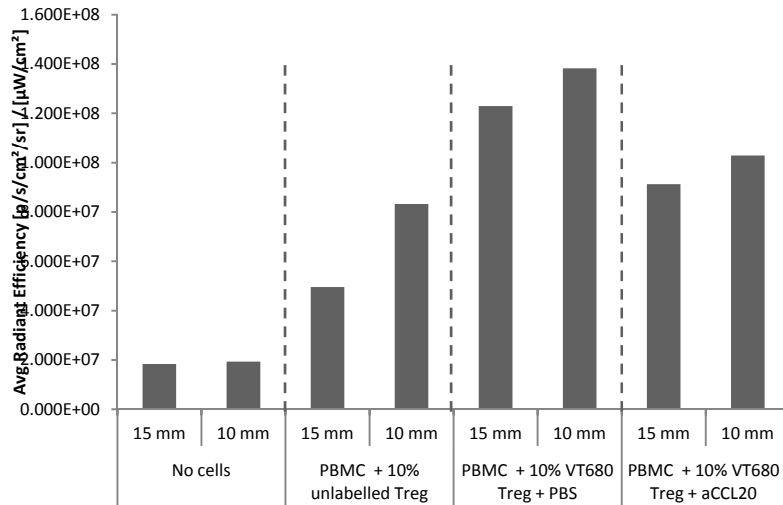
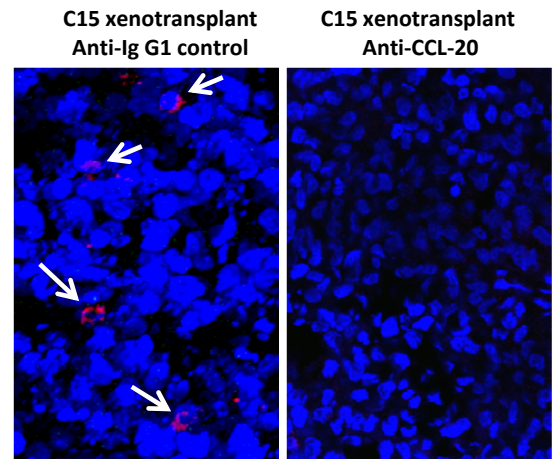
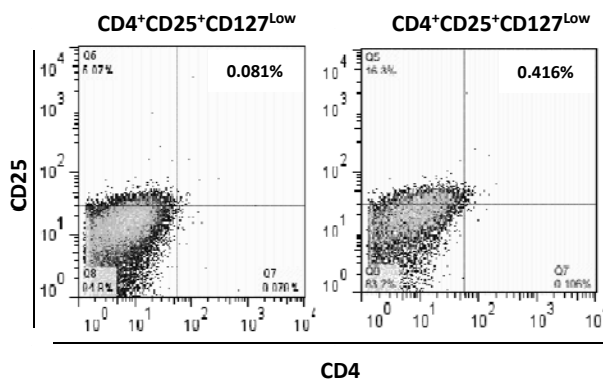
Table I : Primer Sequences

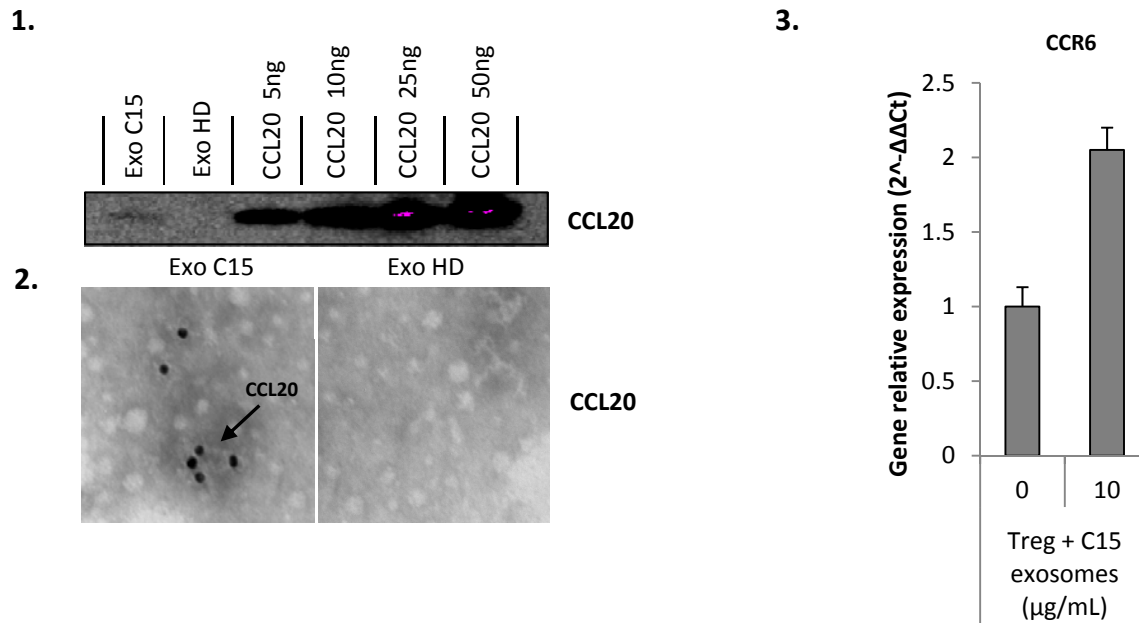
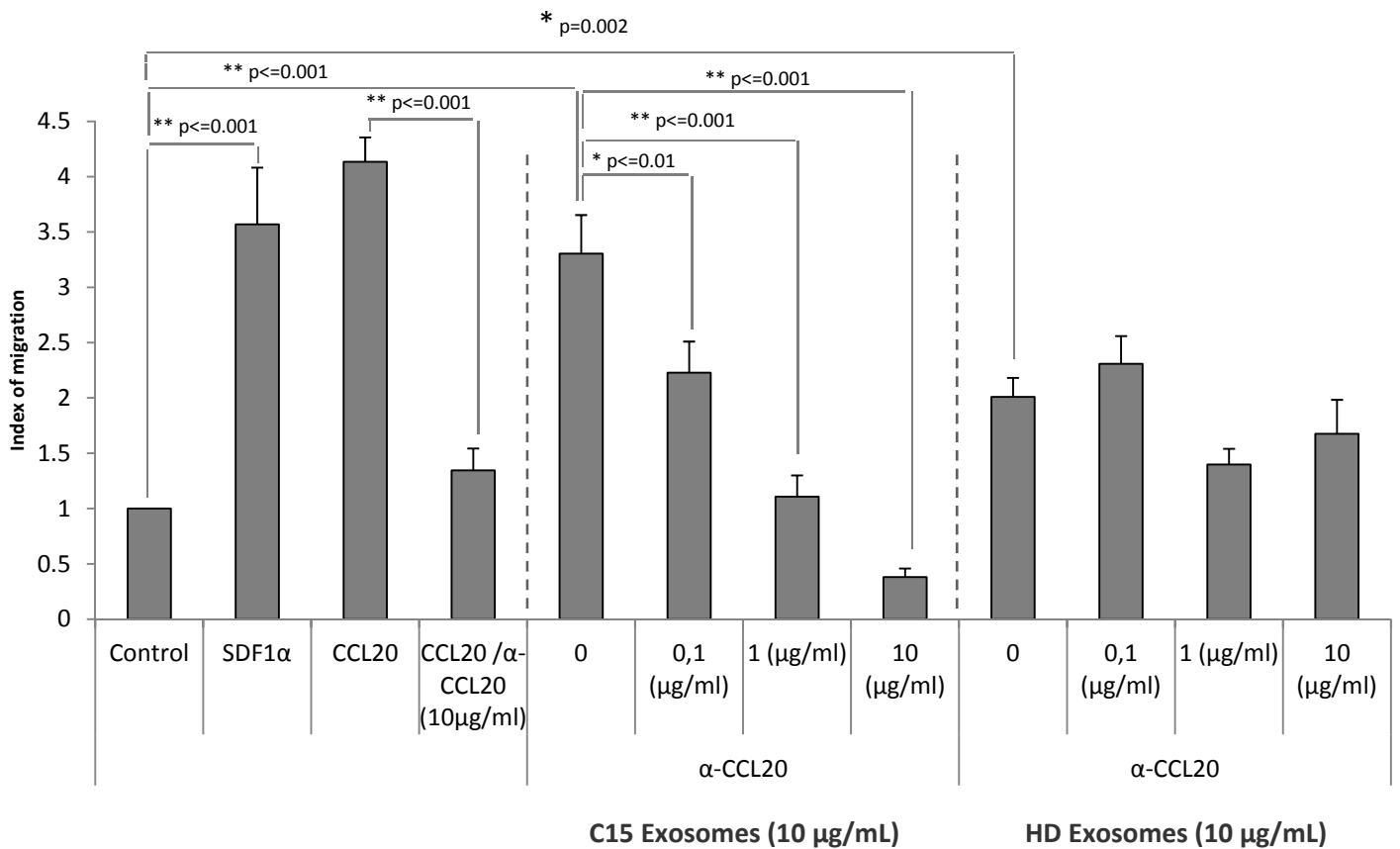
Gene		primer sequences	Hybridization T°c
hIL-2	S	ACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTAC	59°
	AS	TCCAGAGGTTTGAGTTCTTCTCTAGA	59°
hIL-10	S	GAGAACCAAGACCCAGACATCAA	59°
	AS	CCACGGCCTTGCTCTTGTT	60°
hIL-15	S	TTTCCATCCAGTGCTACTTGTGTT	59°
	AS	CATTACCCAGTTGGCTTCTGT	60°
hTNF-α	S	ATCTTCTCGAACCCCGAGTGA	60°
	AS	GGAGCTGCCCCCTCAGCTT	59°
hTGF-β1	S	CGAGCCTGAGGCCGACTAC	60°
	AS	CGGAGCTCTGATGTGTTGAAGA	59°
hGranzyme B	S	CGCCCCCTACATGGCTTATCTT	59°
	AS	CCCCCAAGGTGACATTTATGG	60°
hI-CAM-1	S	CCCTGATGGGCAGTCAACA	59°
	AS	GCAGCGTAGGGTAAGGTTCTTG	59°
hTBET	S	GATGCGCCAGGAAGTTTCAT	59°
	AS	CTCTCCGTCGTTACCTCAAC	58°
hOX40	S	ACGACGTGGTCAGCTCAA	59°
	AS	AGCGGCAGACTGTGTCCTG	59°
hCCR-6	S	CCATTCTGGGCAGTGAGTCA	59°
	AS	TTTAGCAACTTGCACGTGGC	58°
L-selectine	S	GATCCTTTAAATCCTTCCATGAAACG	67°
	AS	CCTGGAGTTAGAAAGAAAGGAGAGCGTA	69°
hCCL- 4	S	GACTGTCCTGTCTCTCCTCATGCTA	60°
	AS	AAGCTTCCTCGCGGTGTAAGA	60°
hCCL- 17	S	GGGCTTCTCTGCAGCACATC	60°
	AS	GGTACCACGTCTTCAGCTTTCTAA	59°
hCCL- 18	S	CCGGCAGATCTGTGCTGACCC	60°
	AS	CCCTCCTGGGCCACCAAGTT	60°
hCCL- 20	S	GGGCTTCTCCTGGCTGCTTTG	59°
	AS	GAATACGGTCTGTGTATCCAAGACA	60°
hCCL- 22	S	TTGCTGTGGCGCTTCAAG	58°
	AS	CAGACGGTAACGGACGTAATCAC	59°
LMP-1	S	AACAAAGGAGGTGACCAGGG	59°
	AS	ACCCAAAAGCAGCGTAGGAA	59°

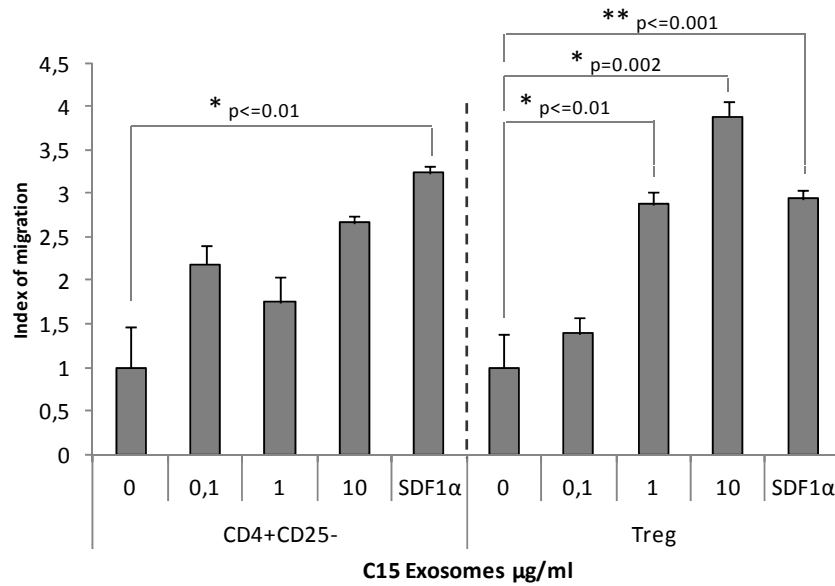
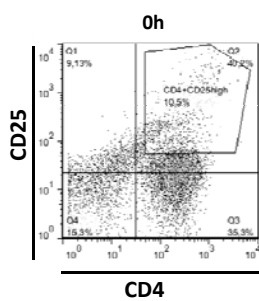
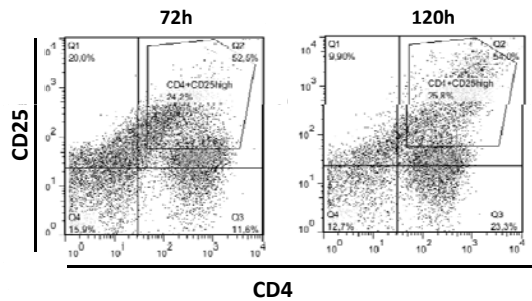
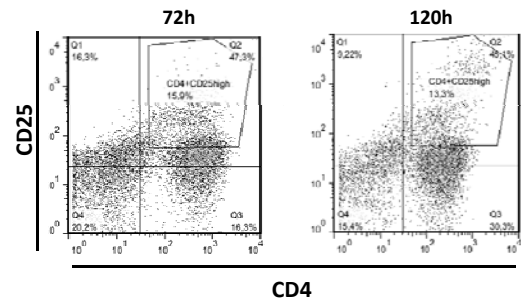
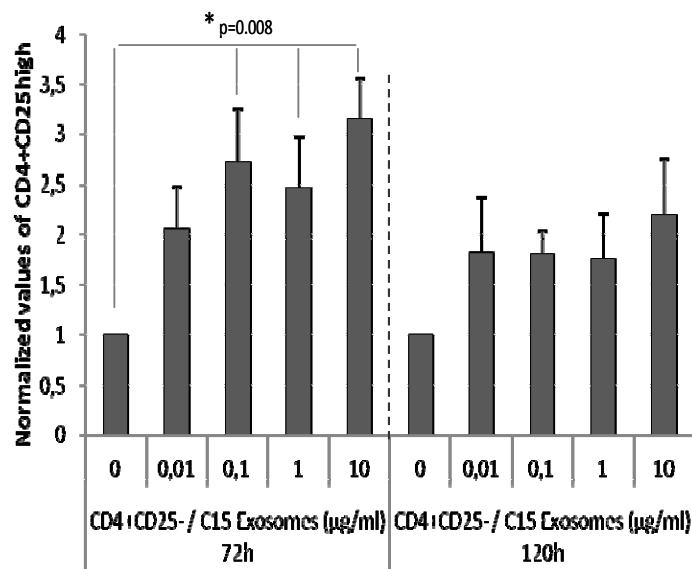
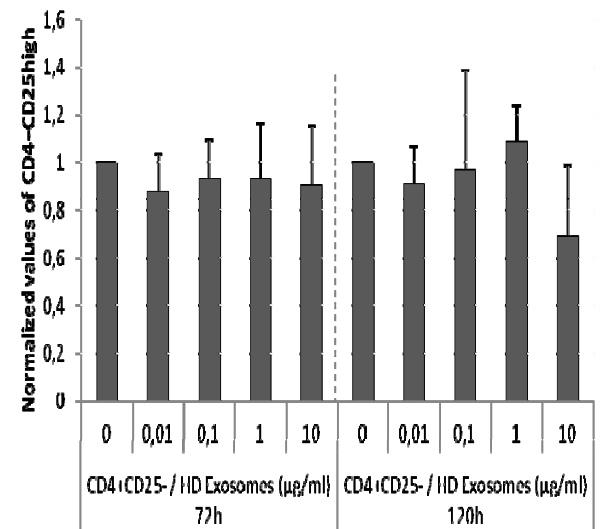
Table II: Percent of human immune cells population in reconstituted SCID mice

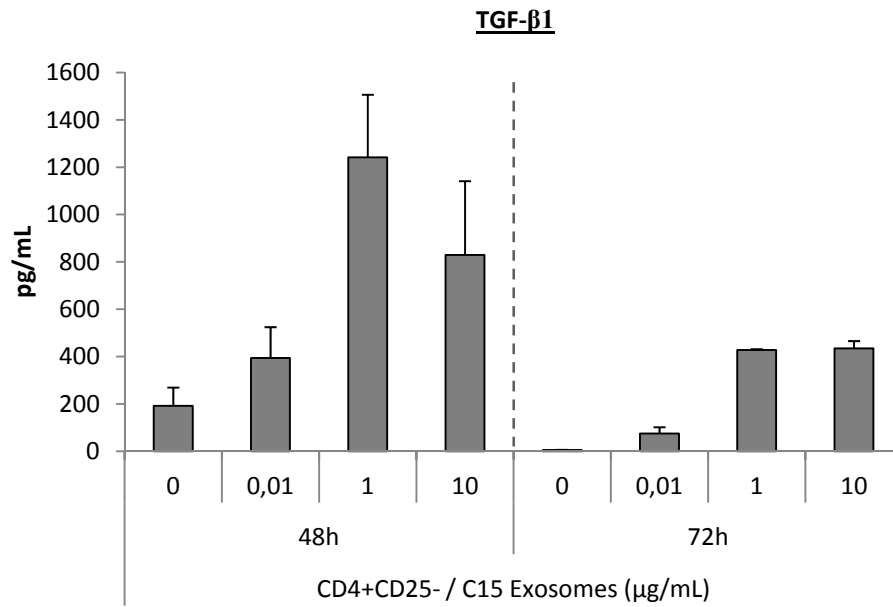
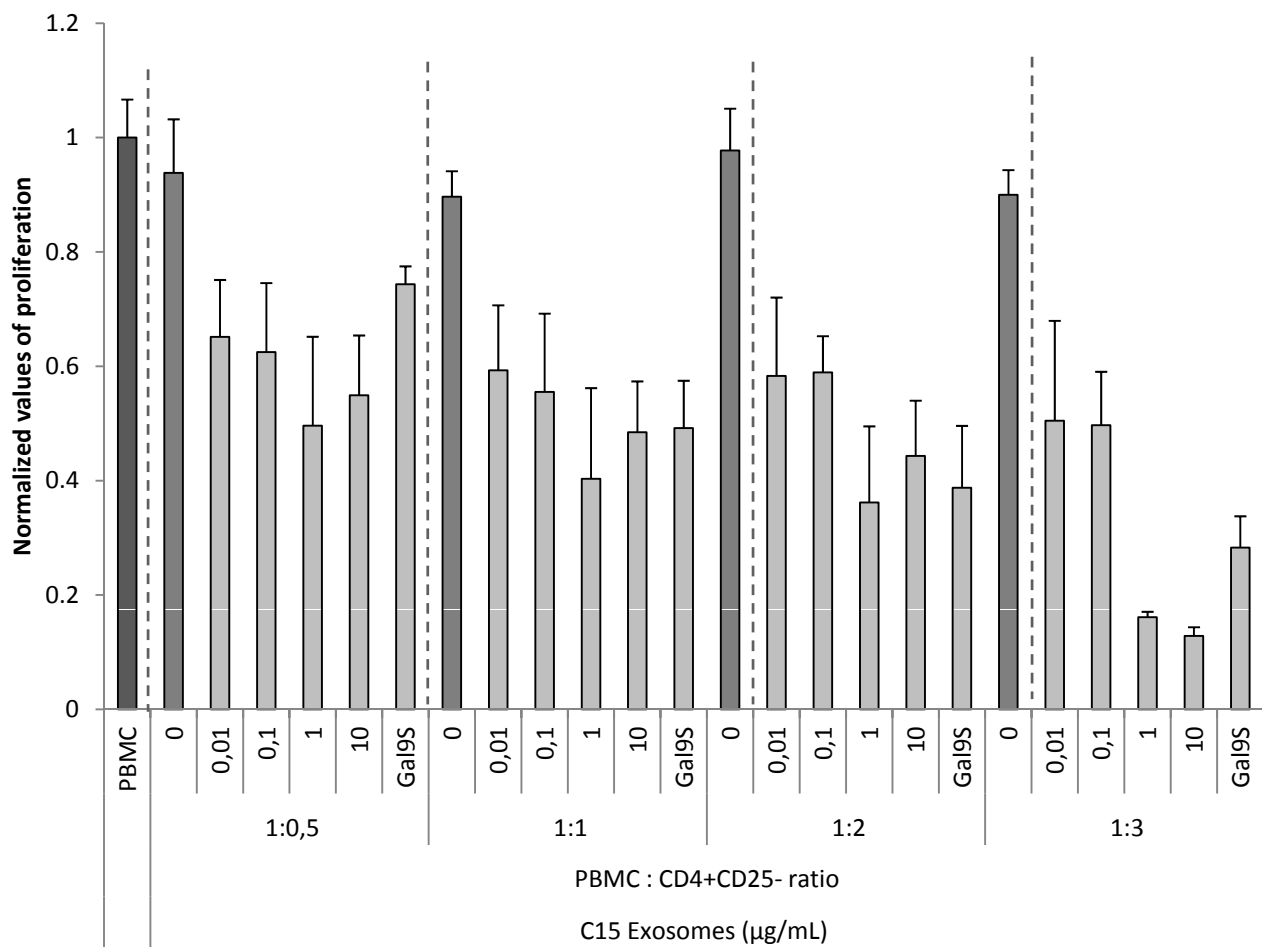
	PBMC/Treg anti-IgG1	PBMC/Treg anti-CCL20	<i>Fold</i>
CD4⁺ T cells	4,28%	14,50%	3,33
CD8⁺ T cells	0,05%	0,17%	3,4
CD20⁺ B cells	0,07%	0,10%	1,42
CD16⁺CD56⁺ NK cells	1,18%	4,92%	4,16
CD4⁺CD25⁺CD127^{Low} Treg	0,08%	0,42%	5,25

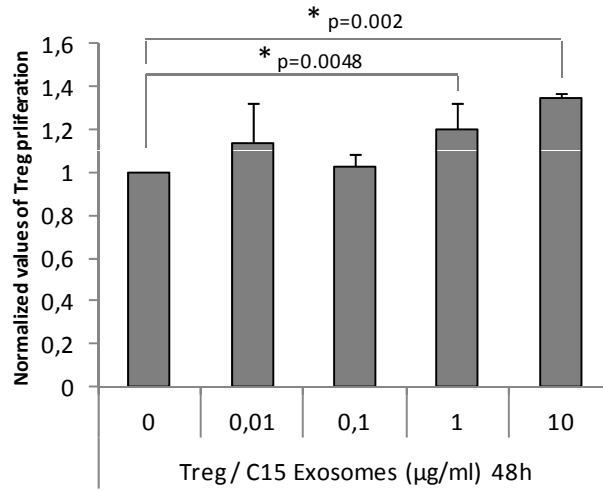
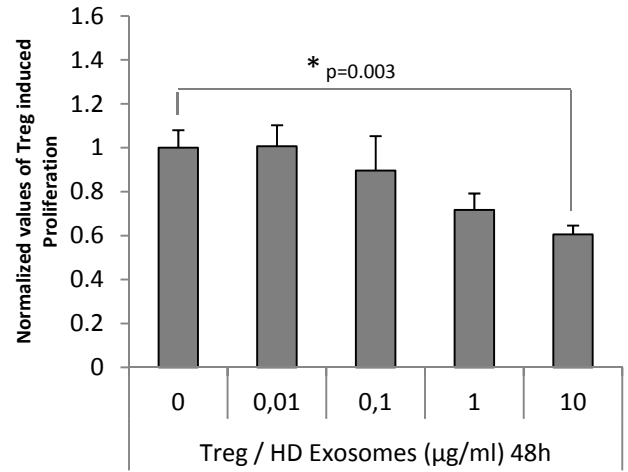
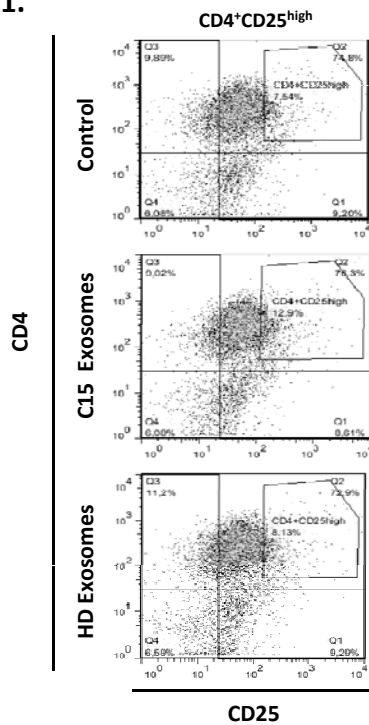
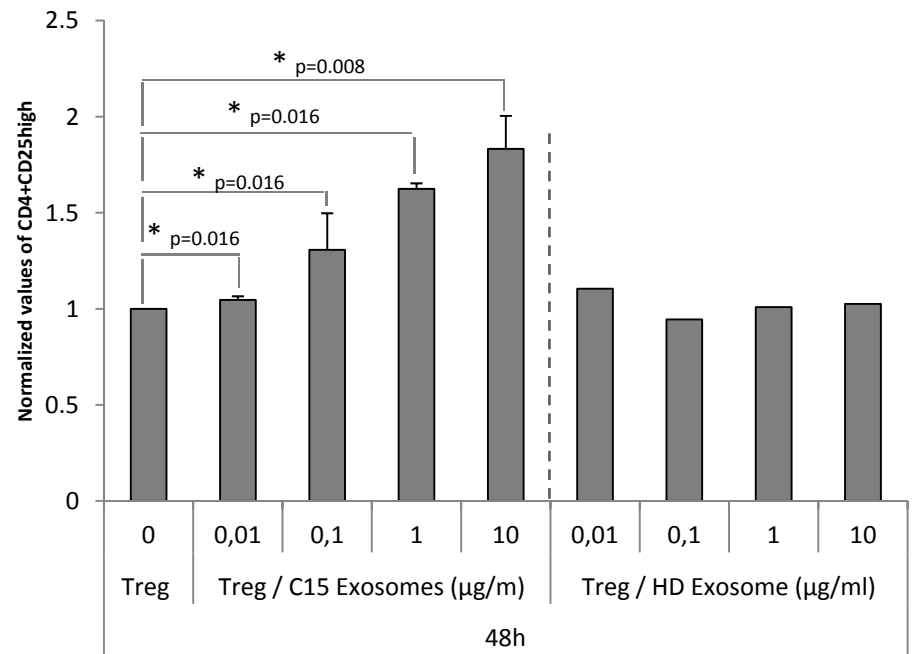
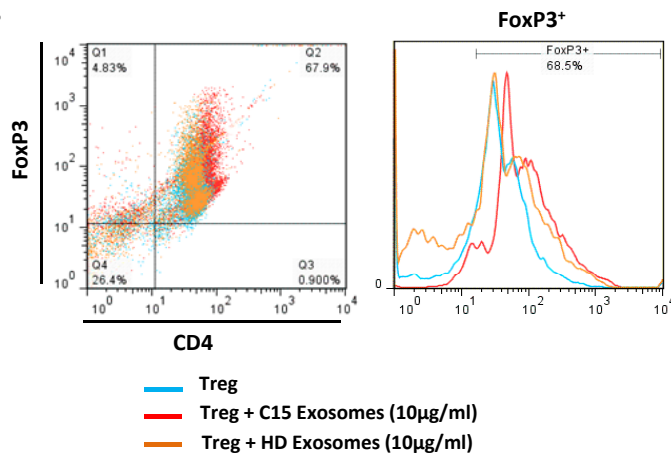
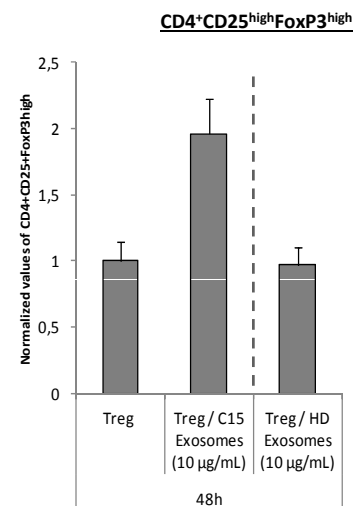
A.**B.****C.****1.****2.****Figure 1**

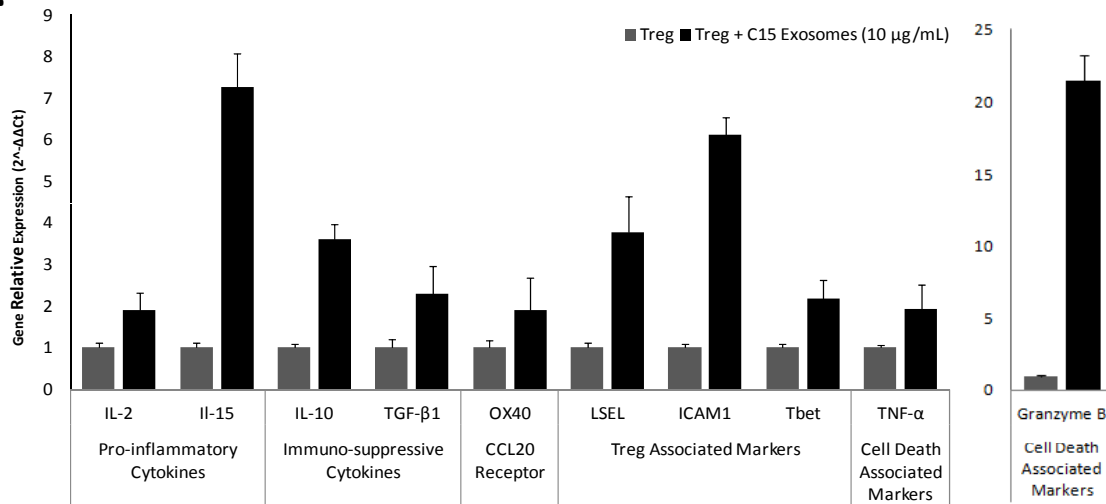
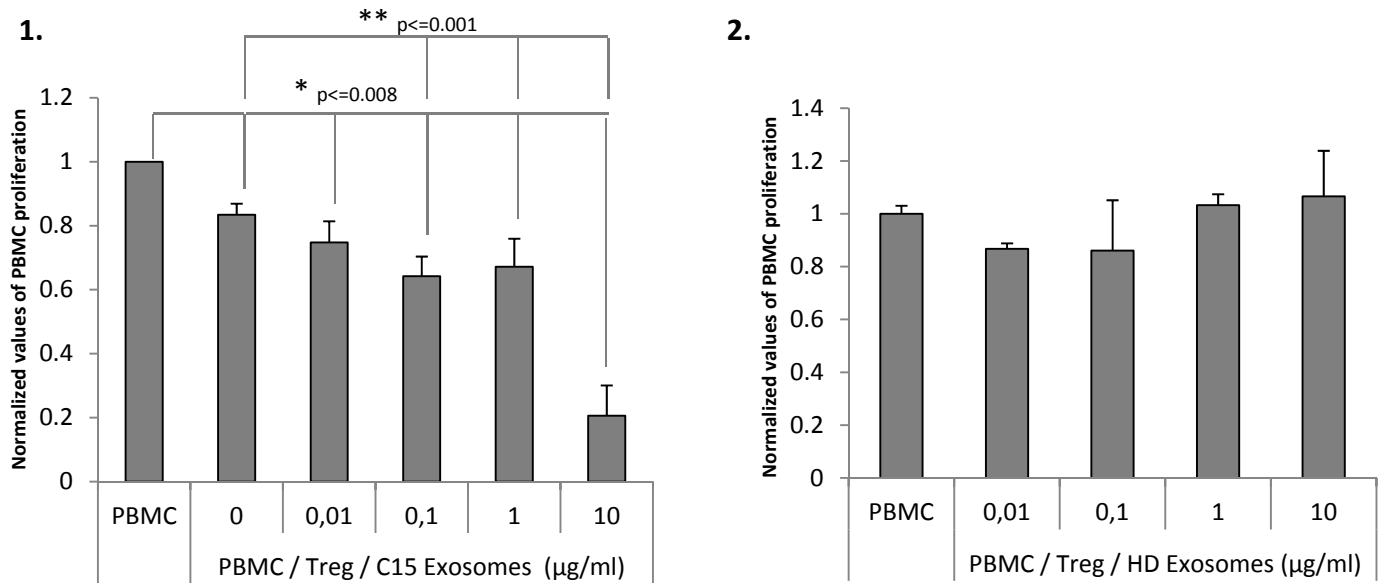
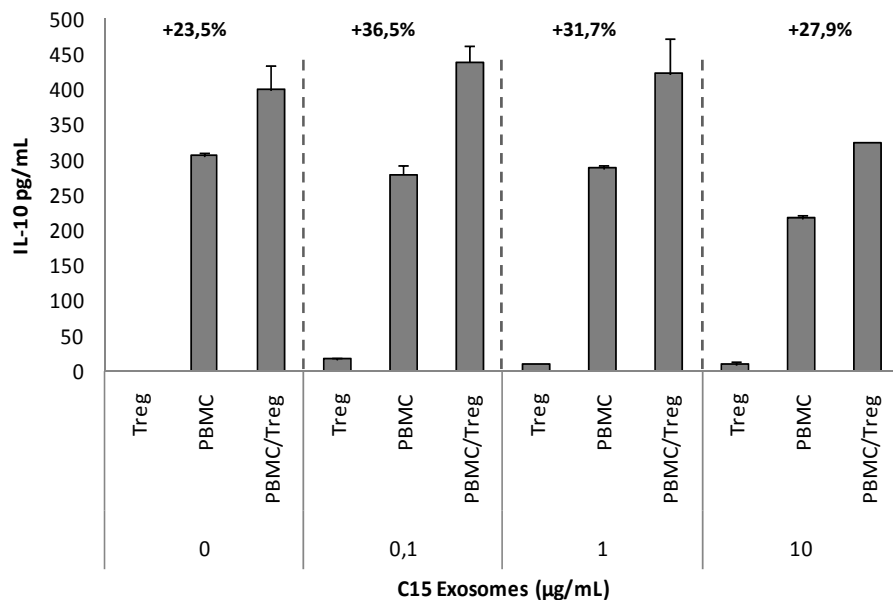
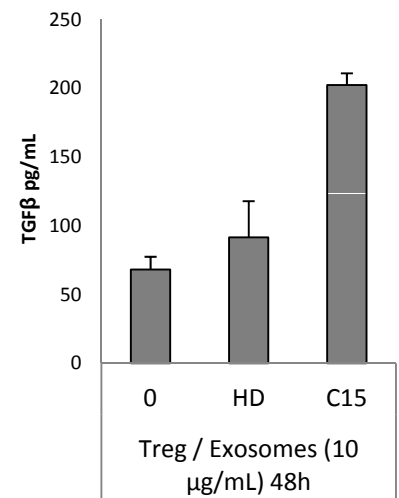
A.**1.****2.****B.****1.****2.****C.****1.****Figure 2**

A.**B.****Figure 3**

A.**B.****1.****Control****C15 Exosomes****3.****HD Exosomes****2.****4.****Figure 4**

A.**B.****Figure 5**

A.**1.****2.****B.****1.****2.****C.****1.****2.****Figure 6**

A.**B.****C.****D.****Figure 7**

SUPPLEMENTARY DATA

Results:

NPC-derived exosomes down-regulate Tim-3 expression on Treg:

We used RT-QPCR experiments in order to quantify Tim3 gene expression on both human isolated CD4⁺ and Treg cells, after incubation with increasing concentrations of C15-derived exosomes (from 0.01 to 10 µg/mL). Very interestingly, we observed a down-regulation of Tim3 gene expression in a dose-dependent manner, in treated Treg compared to non treated Treg. In contrast, we did not observe this decrease in Treg treated with HD-derived exosomes, in which there is even a slight increase of Tim3 gene expression. (Fig.8A).

These results were confirmed by biparametric FACS analysis. Indeed, we analyzed the membranous Tim3 expression by FACS, on both human isolated CD4⁺ and Treg cells, after incubation with increasing concentrations of C15-derived exosomes (from 0.01 to 10 µg/mL). At first, we noted a sub-basal expression of Tim3 in Treg compared to CD4⁺ T cells (Fig.8B₁). In addition, after 48 h of incubation with 10 µg/mL of C15-derived exosomes, we confirmed the decreased expression of Tim3 in Treg, while these exosomes have no effect on the expression of Tim3 in CD4⁺ T cells. In addition, HD exosomes have no impact on the expression of Tim3, nor on Treg or CD4⁺ T cells (Fig.8B₂).

All biparametric FACS analysis, performed with increasing concentrations of C15-Exo or HD-Exo (from 0.01 to 10 µg/mL), were summarized in Figure 8B wherein data from 5 individual experiments are normalized relatively to untreated cells at the same time point. Considering C15-Exo or HD-Exo treatment on CD4⁺ T cells, we did not observe any variations whatever the dose of treatment (Fig. 8B₃). In contrast, we confirmed, after 48 h of treatment with C15-derived exosomes, a significant decrease of Tim3 expression on Treg ($p=0.08$), whereas no modification was observed with HD-derived treatment (Fig. 8B₄).

C15 exosomes-clarified media do not recruit human Treg nor increase their suppressive function

In order to investigate the effect of C15-Exo clarified media on the recruitment of Treg and to evaluate the impact of CCL20 on this recruitment, we have performed chemotactic assays using Boyden chamber. Compared to the negative control, human recombinant CCL20 could significantly attract Treg ($P < .001$). Moreover, C17-clarified media did not induce the chemotactic of human Treg when comparing to the control, yet when pre-treated with anti-CCL20 mAb we observed a very slightly and not significant decrease ($p=0.22$) of Treg recruitment. This result is not surprising insofar as one can find the CCL20 in soluble form (39). We can reasonably assume that a very little fraction of CCL-20 shall persist in the clarified supernatant during the purification of NPC exosomes explaining the small effect observed (Fig.9A).

We also investigate the effect of clarified media of NPC exosomes on the suppressive function of Treg, evaluating the suppressive activity by MLR of autologous activated PBMC and Treg. Under our experimental conditions, ex-vivo isolated Treg could innately suppress PBMC proliferation of about 15% to 30%. However, contrary to NPC-derived exosomes, the addition of increasing protein concentrations of clarified media of C15 exosomes (from 0.01 μg to 10 $\mu\text{g/mL}$), did not induce any changes in the suppressive activity of Treg. This result confirmed the specific effect of NPC-derived exosomes (Fig.9B).

NPC-Plasma-derived exosomes express the CCL20 and preferentially recruit human Treg

We have first assessed the quality of exosomes isolated from the plasma of NPC patients (Plasma-Exo) by electron microscopy showing that Plasma-Exo have homogeneous sizes between 18 and 30 nm (Fig.10A). The protein content of Plasma-Exo was also assayed by

western-blot and compared with a range of C15-derived exosomes. As expected, Plasma-Exo presented the Tetraspanin CD63 (Fig.10B).

We have also confirmed the presence of CCL20 on NPC plasma-derived exosomes by electron microscopy as observed on NPC-derived exosomes (Fig.10C). In order to assess the effect of Plasma-Exo on the recruitment of Treg and to evaluate the impact of CCL20 expression on this recruitment, we have performed chemotactic assays using Boyden Chamber. Compared to the negative control, human recombinant CCL20 could significantly attract Treg ($P < .001$). Moreover, Plasma-Exo had a dose-dependent chemotactic effect compared to the control (up to five times when using 10 $\mu\text{g/mL}$), yet when pre-treated with anti-CCL20 mAb this effect was significantly decreased ($P = 0.003$) (Fig.10D)

Finally, in order to evaluate the effect of Plasma-Exo on the suppressive function of Treg, we have evaluated the suppressive activity by MLR of autologous activated PBMC and Treg. Under our experimental conditions, ex-vivo isolated Treg could innately suppress PBMC proliferation of about 15% to 30%. Following the addition of Plasma-Exo (from 0.01 μg to 20 $\mu\text{g/mL}$), this suppressive activity was significantly enhanced in a dose dependent manner (Fig.10E).

C17-derived exosomes express the CCL20 and recruit human Treg

We have first assessed the quality of exosomes isolated from C17 xenograft tumor (C17-Exo), by electron microscopy showing that C17-Exo have homogeneous sizes between 30 and 60 nm (Fig.11A). The protein content of C17-Exo has been already assayed by western-blot and presented in Fig.1B.

In a second time, to confirm the functional suppressive activity of C17-derived exosomes on immune cells, we have performed a proliferation test with conventional CD4⁺ T cells (Tconv). As previously described with C15-Exo, co-culture of Tconv with C17-Exo also

induced a suppression of Tconv cell proliferation mainly after 120 h culture from 0.01 $\mu\text{g/mL}$ concentrations, even if this decrease seemed to be less important (Fig.11B).

We have also confirmed the presence of CCL20 on C17-derived exosomes by electron microscopy as observed on C15 and Plasma-derived exosomes (Fig.11C). However, the immunogold staining of CCL20 appeared quantitatively less important than that observed in C15 and plasma-derived exosomes. In order to assess the effect of C17-Exo on the recruitment of Treg and to evaluate the impact of CCL20 expression on this recruitment, we have performed chemotactic assays using Boyden chamber. Compared to the negative control, human recombinant CCL20 could significantly attract Treg ($P < .001$). Moreover, C17-Exo had a dose-dependent chemotactic effect when comparing to the control, yet when pre-treated with anti-CCL20 mAb this effect was decreased, quite significantly ($p=0.07$). However, we noted that this decrease is less important than the effect obtained with C15-derived exosomes or Plasma-Exo (Fig.11D), probably due to the fact that CCL-20 seemed to be less present in C17-Exo than in C15-Exo or Plasma-Exo (based on the electron microscopy observation: Fig. 11C compared to Fig.1A and Fig.10C)

C17-derived exosomes induce the conversion $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T lymphocytes into $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$ Treg cells.

As seen above, C17-Exo were able to attract human Treg in a dose-dependent manner. However and very interestingly, C17-Exo could also induce a weak chemotactic of Tconv cells (data not shown). In this context, we evaluated the ability of C17-Exo to convert Tconv cells into $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$ Treg. Biparametric FACS analysis shows a shift in the $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ cell fraction phenotype towards the $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$ after 72h and 120h of treatment essentially with 10 $\mu\text{g/mL}$ of C17-Exo (Fig.11E).

C17-derived exosomes increase the suppressive function of human Treg.

Finally, in order to assess the effect of C17-Exo on the suppressive function of Treg, we have evaluated the suppressive activity by MLR of autologous activated PBMC and Treg. Under our experimental conditions, ex vivo isolated Treg could innately suppress PBMC proliferation of about 15% to 30%. However, following the addition of C17-Exo, this suppressive activity was significantly enhanced in a dose dependent manner (Fig.11F). Interestingly, even if this effect is statistically significant, we have noted that it is less pronounced than the effects induced by C15-derived exosomes or Plasma-derived exosomes, suggesting a possible implication of LMP1 latency protein in this suppressive effect.

C17-derived exosomes do not express LMP-1 latency protein

In Figure 1B we can distinguish a band that could correspond to the LMP1 protein in C17-derived exosomes. But, looking closely we can see that the band is slightly lower than that of the positive control (C15-derived exosomes and LCL proteins) and this can induce doubt about the expression of LMP1 in C17-derived exosomes .

To affirm or deny this controversial result, we first conducted a Q-PCR with specific primers for LMP1 both on LMP1-positive NPC cell line (C15) and LMP1-negative NPC cell line (CNE1), compared to C17 cell line. We have obtained in all cases an amplification of the LMP1 gene, however, the analysis of the dissociation curves show clearly that the dissociation peak of C17 and CNE1 (LMP1⁻) are both aligned, but are not aligned with this of C15 (LMP1⁺), suggesting a non-specific amplification of LMP1 gene in C17 nor CNE1 (Fig. 12A).

In a second step to confirm this hypothesis, we have performed immunoprecipitation combined to western blotting in tumor protein extracts from the C15 and C17 xenografts. As

shown in experiment based on IP and western blotting on C15 and C17 tumor protein extracts, it is obvious that the LMP1 protein is absent in C17 in contrast to C15 (Fig.12B).

Legends:

Figure 8. Impact of C15-derived exosomes on Tim3 expression. **A.** RT-QPCR analysis of Tim3 gene expression on Treg $\pm$ increasing amounts of C15-Exo. **B.** Purified TCD4⁺ and Treg were cultured $\pm$ 10 μ g/mL of C15-Exo or HD-Exo. **1.** The frequency of Tim3⁺ cells and the level of Tim3 expression were determined by FACS at isolation and 48 h. Histograms represent an overlay of TCD4⁺ (dark grey) and Treg (light grey) Tim3 expression levels at isolation day, TCD4⁺ has a higher expression of Tim3 comparing to Treg. **2.** Tim3 expression, after 48 h of incubation, on TCD4⁺ and Treg (dark grey) C15-Exo or HD-Exo (light grey). Results are presented as one representative experiment of 3 independent experiments. **3.** The data summarizes the Tim3 expression level on TCD4⁺ $\pm$ increased concentrations of C15-Exo or HD-Exo. **4.** Data summarize the Tim3 expression level on Treg $\pm$ increased concentrations of C15-Exo or HD-Exo. For both, results are presented as means of 3 independent experiments expressed in normalized values of frequency of Tim3⁺ cells $\pm$ SD.

Figure 9. Impact of C15-clarified media on recruitment and suppressive function of Treg. **A.** Chemotactic potential of C15-clarified media exosomes on CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells assessed in Boyden chamber, using RPMI medium as negative control and recombinant CCL20 as positive control. Results are presented as means of quadruplicates of 2 independent experiments expressed in index of chemotaxis related to medium $\pm$ SD. **B.** Co-culture of autologous PBMC and Treg (MLR) in the presence of increasing protein concentrations of C15-clarified media. Results represent the means of normalized values of proliferation of 2 independent experiments $\pm$ SD bars.

Figure 10. Impact of NPC-Plasma-derived exosomes on recruitment and suppressive function of Treg. **A.** Electron microscopy of NPC-Plasma-Exo suspension contrasted with 2% phosphotungstic acid (PTA). Scale bar represents 100 nm. The image is representative of 2 independent experiments. **B.** Equal amounts C15-derived and Plasma-derived exosomes were analyzed by Western blotting for CD63 as common marker of exosomes. **C.** Representative electron microscopy after immunogold staining of purified Plasma-Exo (0.05 to 0.15 $\mu\text{g/mL}$) pre-incubated with primary anti-CCL20 mAb. **D.** Chemotactic potential of Plasma-derived exosomes on $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD127}^{\text{low}}$ T cells assessed in Boyden chamber, using RPMI medium as negative control and recombinant CCL20 as positive control. Results are presented as means of quadruplicates of 2 independent experiments expressed in index of chemotaxis related to medium $\pm$ SD. **E.** Co-culture of autologous PBMC and Treg (MLR) in the presence of increasing amounts of Plasma-Exo. Results represent the means of normalized values of proliferation of 3 independent experiments $\pm$ SD bars.

Figure 11. Impact of C17-derived exosomes on T CD4^+ lymphocyte proliferation. **A.** Electron microscopy of a C17-Exo suspension contrasted with 2% phosphotungstic acid (PTA). Scale bar represents 500 nm. The image is representative of 2 independent experiments. **B.** Proliferation was measured using [^3H]thymidine incorporation assay during the last 18 hours and values were obtained as counts per minute (cpm). Assays were performed after 48 and 120 h of culture. The results present normalized cpm values of triplicate wells of 2 independent experiments $\pm$ standard deviation (SD) bars. **Impact of C17-Exo on recruitment of Treg.** **C.** Representative electron microscopy after immunogold staining of purified C17-Exo (0.05 to 0.15 $\mu\text{g/mL}$) pre-incubated with primary anti-CCL20 mAb. **D.** Chemotactic potential of C17-derived exosomes on $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD127}^{\text{low}}$ T cells assessed in Boyden chamber, using RPMI medium as negative control and recombinant CCL20 as positive control. Results are presented as means of quadruplicates of 2 independent

experiments expressed in index of chemotaxis related to medium $\pm$ SD. **Impact of C17-Exo on conversion of CD4⁺CD25⁻ T cells into CD4⁺CD25^{high}.** E. Purified CD4⁺CD25⁻ T cells were cultured $\pm$ C17-Exo (from 0.01 to 10 μ g/mL), then analyzed by FACS after 72 h and 120 h of culture. Data represents the frequency of CD4⁺CD25^{high} cells within CD4⁺CD25⁻ initial cells and shows that C17-Exo increase the frequency of CD4⁺CD25^{high} fraction after 72 h and 120 h of culture compared to control. Results are presented as means of 3 independent experiments expressed in normalized values of frequency of CD4⁺CD25^{high} cells $\pm$ SD bars. **Impact of C17-Exo on suppressive function of Treg.** F. Co-culture of autologous PBMC and Treg (MLR) in the presence of increasing amounts of C17-Exo. Results represent the means of normalized values of proliferation of 2 independent experiments $\pm$ SD bars.

Figure 12. Gene and protein expression of LMP1 in C17. A. Q-PCR analysis performed with specific primer of LMP1 showed a specific dissociation peak for LMP1⁺-C15 cell lines (red curve) when compared to LMP1^{Neg}-CNE1 cells (green curve). The dissociation peak for C17 cell lines (blue curve) was aligned with CNE1. B. Detection of LMP1 by direct western blotting or immunoprecipitation combined to western blotting in tumor protein extracts from the C15 and C17 xenografts.

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Western Blot Analysis

Different cell subsets and exosomes were lysed (10 min on ice) in PY buffer consisting of 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.02% sodium azide and a cocktail of proteases inhibitors (Roche, Basel, Switzerland). After centrifugation (20,000 g, 15 min, +4°C), cell debris were removed and supernatants were collected. Protein concentrations were measured using Bio-Rad Protein Assay according to manufacturer's instructions (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Exosomes and total cell extracts were then analyzed by Western blotting. Briefly, proteins were separated by SDS-PAGE electrophoresis using gradient pre-casts gels (4-12% gradient, Bis-Tris, Invitrogen) in standard conditions except when planning detection of CD63 and CCL20, which require non-reducing conditions. Then proteins were transferred on nitrocellulose membranes (HybondTM-C Extra, Amersham Biosciences, UK). The latter was blocked for 1 hour at room temperature in blocking buffer containing 0.2% AuroraTM blocking reagent (MP Biomedicals, Illkirch Graffenstaden, France), 0.1% Tween20 (Sigma-Aldrich) and PBS (1X), and incubated overnight at 4°C with primary antibodies directed against : rat anti-human Grp94 mAb 1:1000 (ADI-SPA-850-F, Enzo Life Sciences), mouse anti-human HLA-Dra mAb 1:1000 (sc-53449, Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-human CD63 mAb 1:1000 (ab59479, Abcam, UK), mouse anti-human LMP1 mAb 1:4 (S12 hybridoma), mouse anti-human Galectin-9-CT-L1 mAb 1:100 (was kindly provided by Galpharma, Japan) and mouse anti-human CCL20 mAb 0.2 µg/mL (500-M28, PeproTech Inc, Rocky Hill, USA). Human recombinant CCL20 (300-29A, PeproTech Inc, Rocky Hill, USA) was used as a control when we planned CCL20 detection in samples.

Membranes were washed with blocking buffer, then incubated for 1 hour at room temperature with peroxylase-conjugated secondary antibodies (anti-mouse or anti-rat or anti-rabbit,

1:10000) (GE Healthcare, Wauwatosa, USA) and washed again with blocking buffer. Specific protein signals were visualized using Western Lightning® Plus-ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate kit (PerkinElmer, Boston, MA, USA) and read in Luminescent Image Analyser LAS3000 (Fujifilm).

Detection of blotted LMP1 was made using the CS1-4 pool of monoclonal antibodies directed against LMP1 (Dako). *Input*: 5 mg RIPA protein extract from the C15 or C17 xenografted tumors. *Irr IgG1* : proteins eluted after immunoprecipitation with magnetic beads coated with non-specific murine IgG1. *OT21C*: proteins eluted after immunoprecipitation with with magnetic beads coated with the OT21C monoclonal antibody (gift from Jaap Middeldorp, VUMC, Amsterdam).

Cells and Exosomes Functionality Assays

Proliferation was measured after [³H]thymidine (1 µCi/well) (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) incubation for the last 18 hours before harvesting. Radioactivity was determined using a β-counter (1450 Trilux, Wallac, Finland). To study the effects of exosomes on T cells proliferation and Treg suppressor activity, reactions were set up in contact or not of increasing concentrations of exosomes (0.01, 0.1, 1 and 10 µg/mL). Each proliferation assay was carried out in triplicate and estimated in count per minute (cpm) and results were normalized compared with non treated condition.

Cell Proliferation

Proliferation assays were set up with cultures of 1×10^5 cells of total CD4⁺ T cells or Treg alone or in contact with exosomes in a round bottom 96-well plate and cultured for 48 hours. Total CD4⁺ T cells were activated with plate-bound anti-CD3 (1.5 µg/mL) mAb, incubated at 37°C 2 hours before the culture and soluble mouse anti-human CD28 mAb (100 ng/mL)

(Clinisciences, Montrouge, France) added at the time of the culture. Treg proliferation assays were set up in the presence of mouse anti-human CD3 mAb (150 ng/mL), anti-CD28 (100 ng/mL), IL-2 (300 UI/mL, PeproTech Inc, Rocky Hill, USA) and 1×10^5 gamma-irradiated (5000 rad) autologous PBMCs.

Mixed Leukocyte Reaction (MLR)

Suppressive activity of Treg was measured by their ability to inhibit the proliferative response of autologous PBMCs in a MLR. Assays were set up with mixture of 10^5 PBMC: 5×10^4 Treg (2:1) in a round bottom 96-well plate and cultured for 48 hours. Cells were activated with plate-bound anti-CD3 (1.5 μ g/mL) mAb, incubated at 37°C 2 hours before the culture and soluble anti-CD28 (100 ng/mL) mAb (Clinisciences, Montrouge, France) added at the time of the culture.

Real-Time Quantitative PCR assays

RNA Extraction

Total RNA from C15 pellets (3×10^6 cells) had been extracted using the TRIzol reagent (Invitrogen) method according to the manufacturer's instructions. Pellets of inferior concentration (Treg) were isolated using the RNeasy minikit II (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration and purity were measured by spectrophotometric methods (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotec). Total RNA were stored at -80°C until further use.

mRNA Reverse Transcription

2 μ g of total RNA were supplemented with 5 μ L of a master mix of 1 μ L oligo dT (Roche Diagnostic, Meylan, France) and 0.1 μ L RNAsin (40 U/ μ L, Promega, Charbonnières, France) and then incubated at 70°C for 5 to 10 min. After 5 minutes at room temperature, 10 μ L of the following mix were added: 6 μ L buffer 5X (Invitrogen) + 1 μ L DTT 0.1 M (Invitrogen) + 2

μL dNTPs 10 mM (Amersham) + 0.1 μL RNAsin 40 U/ μL (Promega) + 1 μL Superscript (Invitrogen). The reaction was then followed by an initial incubation step at 45°C for 45 to 60 minutes, a second incubation at 95°C for 5 minutes and treatment for 20 minutes at 37°C with RNase H (Promega). Finally, ultrapure distilled water (GIBCO-Life Technologies) was added to obtain a final concentration of 10 ng total DNA/ μL and stored at -20°C until further use.

Mx3005PTM Sequence Detection System

Transcripts were quantified using real-time quantitative RT-PCR with the Mx3005PTM sequence detection system (Agilent technologies, France), in optical 96 well reaction plates (Eurogentec S. A., Belgium). In each well, 10 μL of a specific couple of primers, designed for real-time PCR and purchased from MWG-Biotech (Germany), were deposited at a final concentration of 10 pg/mL and then stored at -20°C. The housekeeping genes (HKG) β -actin, Glyceraldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase (G3PDH), ubiquitin and Hypoxanthine guanine PhosphoRibosyl Transferase (HPRT) were used as controls in each plate. PCR reactions were performed according to the manufacturer's instructions, in a final volume of 20 μL , using 2X MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR® 258 Assay (Eurogentec) containing Meteor Taq DNA polymerase, MgCl₂ (4 mM final concentration), dNTPs (including dUTP), SYBR® 260 Green I, stabilizers and passive references required for signal normalization and optimized buffer components, for 1 μL of cDNA (equivalent to 10 ng total RNA/ μL). The PCR program included initial denaturation and Meteor Taq activation for 5 minutes at 95°C, followed by 40 standard amplification cycles as follows: 15 seconds at 95°C (denaturation), 1 minute at 60°C (annealing and elongation). Fluorescent products were detected at the last step of each cycle. A melting curve analysis was carried out immediately after amplification, in accordance with the manufacturer's instructions.

Data Expression

Quantitative PCR reactions were used to quantify gene expression of related Treg cell markers, immunosuppressive and pro-inflammatory cytokines. The housekeeping genes: β -actin, G3PDH, ubiquitin and HPRT were used as controls. All primers were designed for real-time PCR (Table I) and purchased from MWG-Biotech (Germany). Quantitative analysis was achieved based on the cycle threshold (C_T) value for each well and calculated using MxPro software. Each individual value was normalized using the mean of the 4 HKG according to the standard ΔC_T method (23): $\Delta C_T = C_T - C_{T_{HKG}}$. For comparisons between groups, the relative gene expression was expressed in $2^{-\Delta\Delta C_T}$ leading to arbitrary value of 1 for the reference group. Concerning chemokines gene expression in C15 cells, results were expressed in $\frac{1}{\Delta C_T}$.

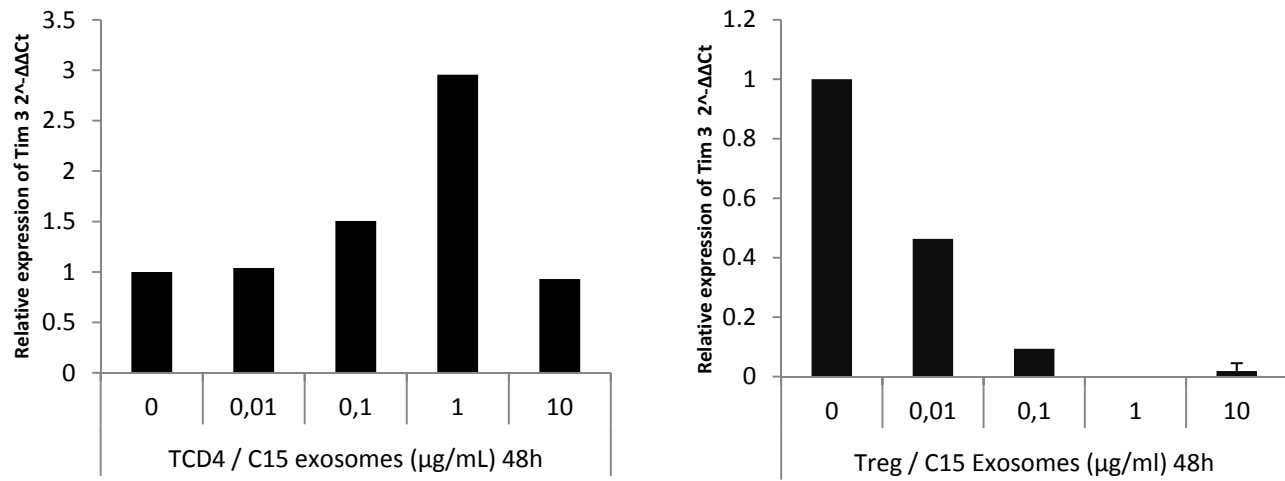
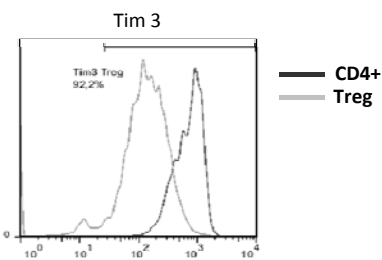
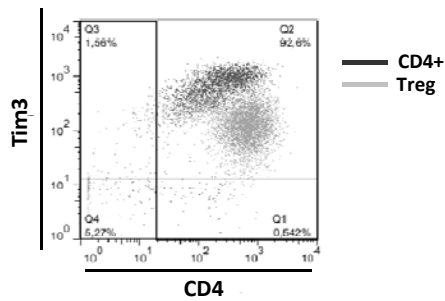
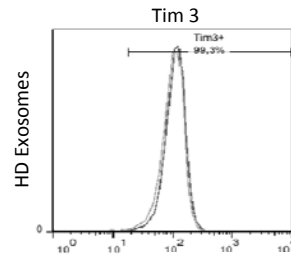
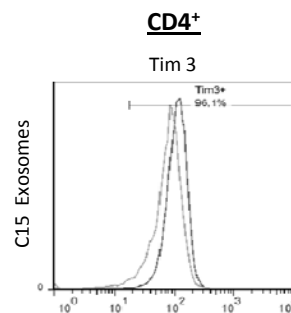
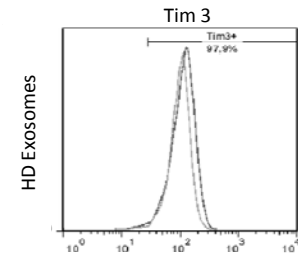
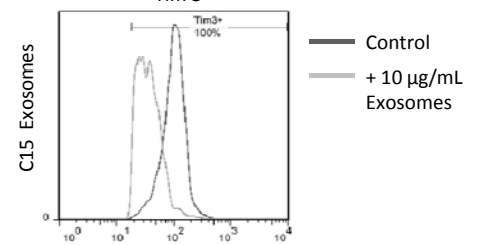
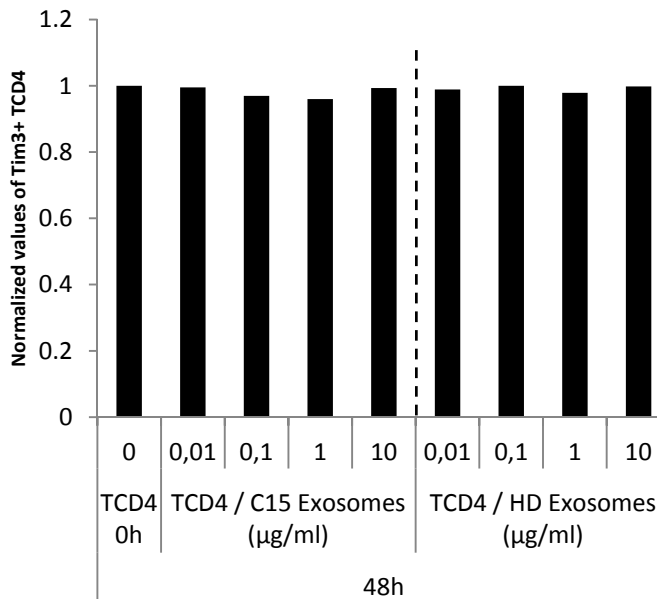
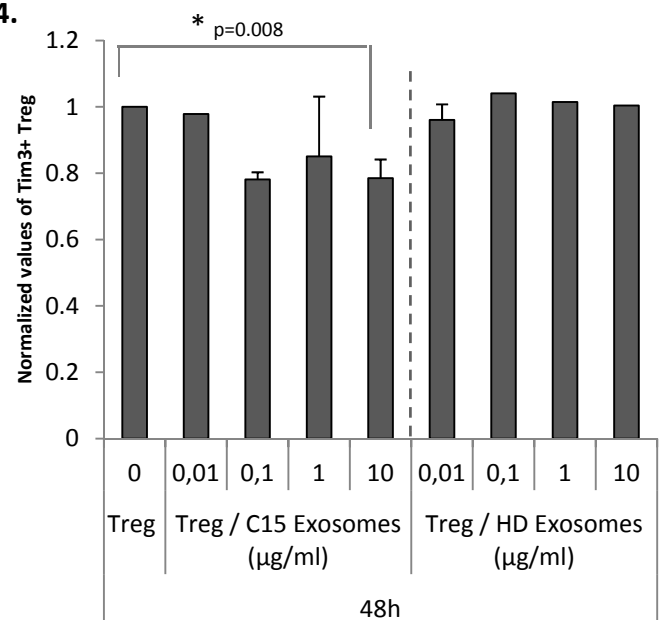
Flow Cytometric Analysis

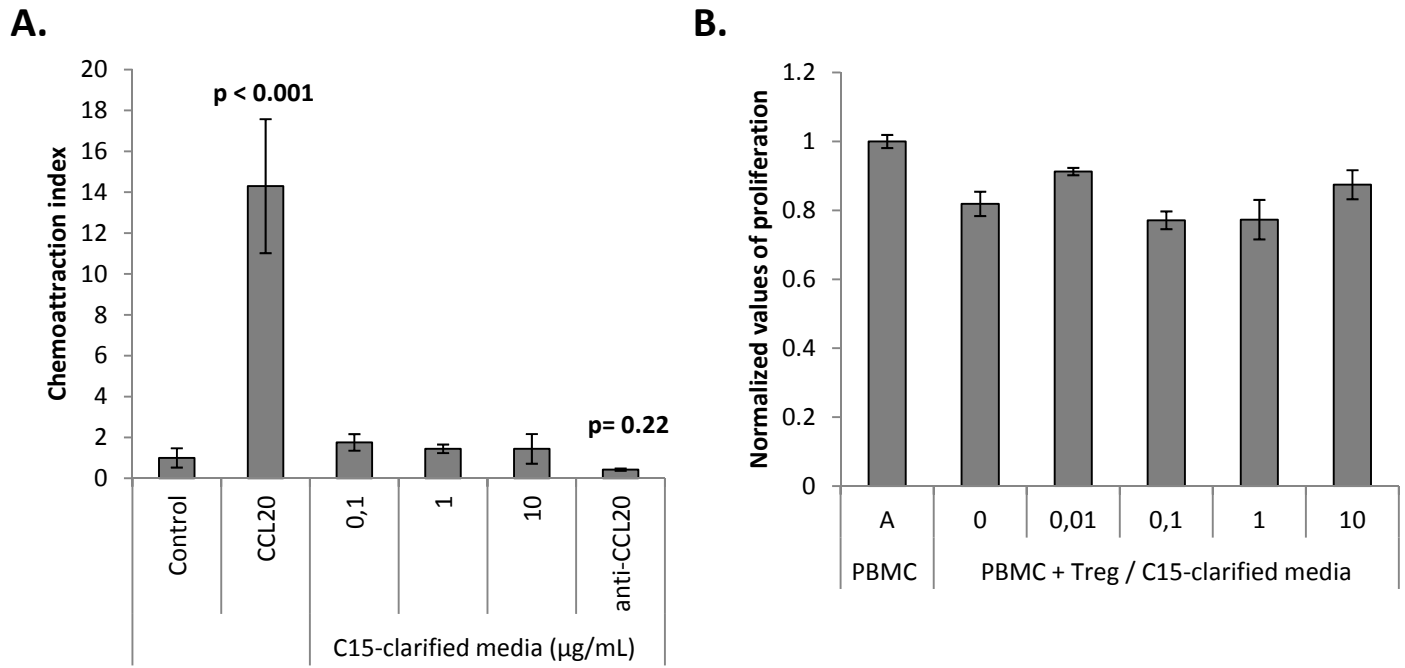
Cell immunophenotype was analysed by flow cytometry using FACSCalibur flow cytometer powered by CellQuest Pro software. After their harvest, cells were washed with Phosphate-Buffered Saline (PBS) (GIBCO-Life technologies) and labeled with fluochrome-conjugated mAbs (1:10). For each assay, the appropriate isotypic control mAbs were used for markers setting. Finally, data were analysed with FlowJo software. Results were expressed as normalized values compared with non treated condition.

Mouse anti-human CD4-phycoerythrin(PE)-cyanin(Cy)5 or CD4-fluorescein isothiocyanate (FITC), -CD25-FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA), -CD25-PE (Miltenyi Biotech, Germany), -CD127-FITC or -CD127-PE (1:20) (Clinisciences, Montrouge, France) and -Tim3-PE (Biolegend, San Diego, CA) were used for detection of cell surface antigens. FoxP3 intracellular staining was achieved with FoxP3 staining Buffer kit (Miltenyi Biotech, Germany), according to the manufacturer's instructions.

Cytokine detection (ELISA)

Five hundred thousand CD4⁺CD25⁺ T cells were cultured for 48 h in standard culture medium supplemented with 10% human AB serum with or without C15-Exo (10 µg/ml) in a 48-well plate. Cells were activated with plate bound anti-CD3 (1.5 µg/mL) mAb, incubated at 37°C for 2 h before the culture and soluble anti-CD28 (100 ng/mL) mAb (Clinisciences) added at the time of the culture assay. Supernatants were tested for cytokine (IL-10 and Transforming Growth Factor (TGF-β1)) production by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) method as previously described (25). Results were expressed as the mean of duplicate wells after subtraction of the background.

A.**B.****1.****2.****Treg****3.****4.****Figure 8: Supplementary data**

**Figure 9: Supplementary data**

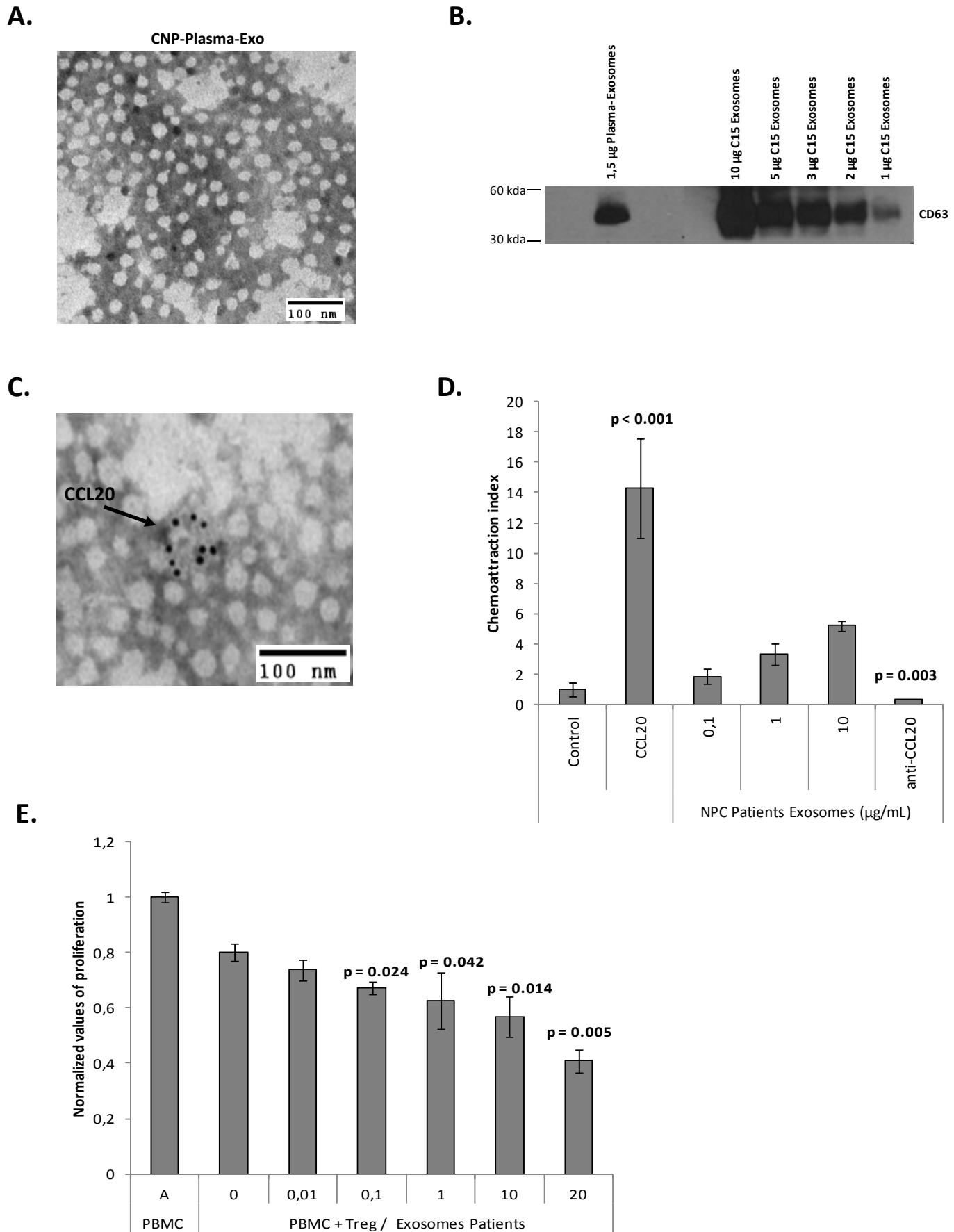


Figure 10: Supplementary data

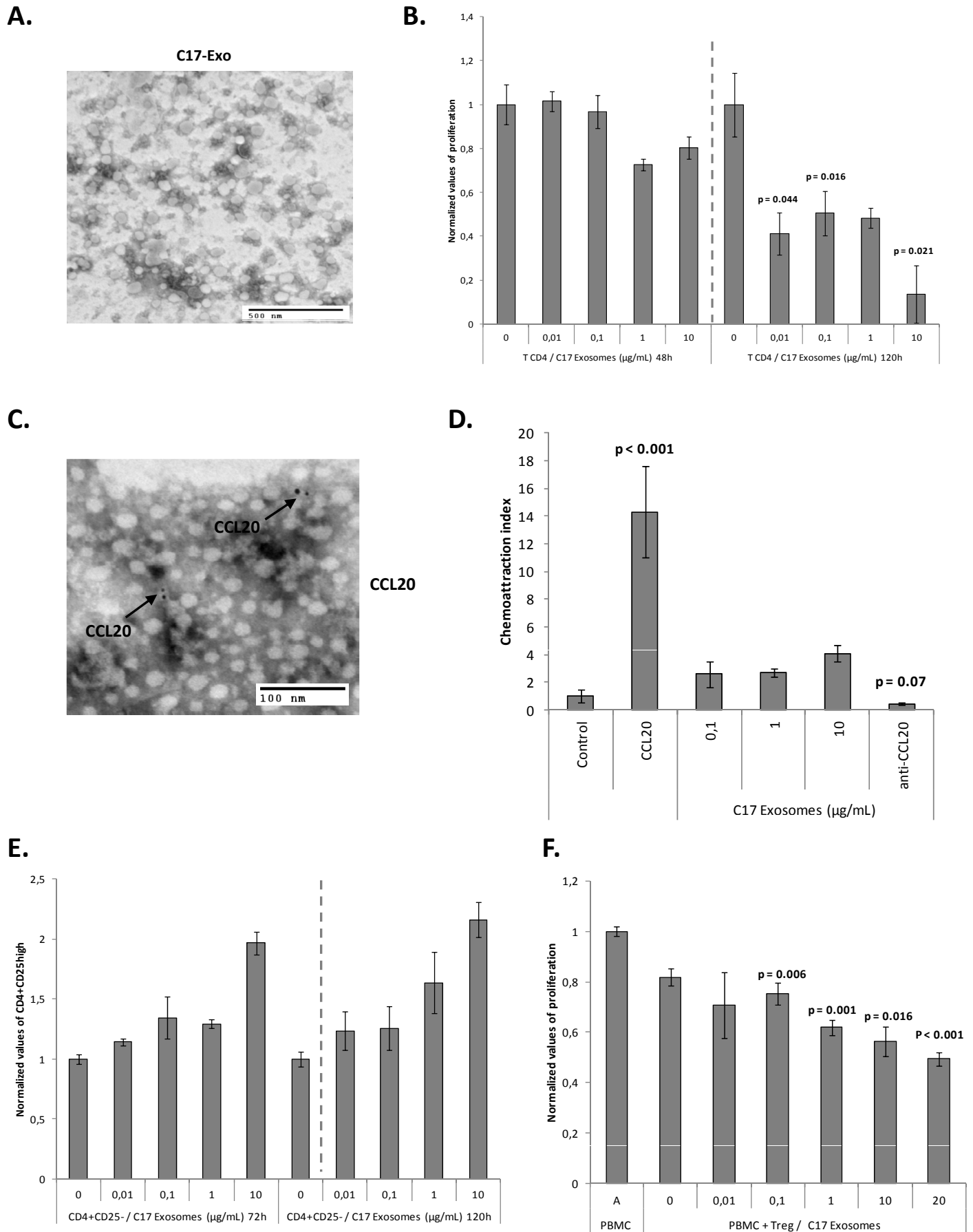
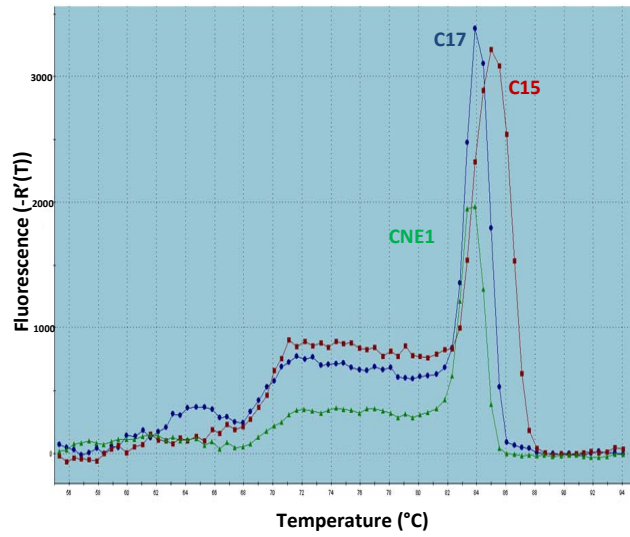
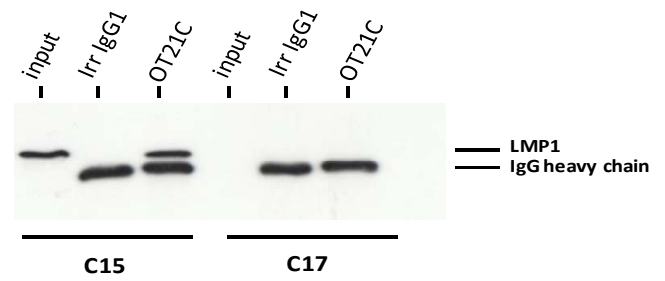


Figure 11: Supplementary data

A.**B.****Figure 12: Supplementary data**

ARTICLE 2

ARTICLE 2**Les peptides dérivés des antigènes de latence II du virus d'Epstein Barr induisent une activité spécifique des lymphocytes T CD4+ cytotoxiques sans induire de réponse des T CD4+ régulateurs**

EBV Latency II-derived Peptides Induce A Specific CD4+ Cytotoxic T-cell Activity and Not A CD4+ Regulatory T-cell Response

J Immunother, Volume 35, Number 3, April 2012: 254-266

Olivier Moralès*, Stéphane Depil*, **Dhafer Mrizak**, Papa Alioune Ndour, Françoise Dufosse Celine Miroux, Jean Coll, Yvan de Launoit, Claude Auriault, Vèronique Pancre and Nadira Delhem*

* Co-premier auteur

Résumé

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est associé à de nombreuses pathologies malignes, qui se distinguent selon leur profil d'expression des gènes de latence. Nous avons développé une approche originale afin de favoriser l'induction d'une réponse T CD4+ spécifique des pathologies associées à la latence d'EBV (lymphome de Hodgkin, carcinome du nasopharynx, lymphome NK/T).

Nous avons sélectionné 6 peptides dérivés des antigènes de la latence II, possédant une capacité de fixation hautement *promiscuous* pour les molécules HLA de classe II et capable d'induire les cellules T sécrétrices de l'interféron- γ . Dans cette étude, nous démontrons que tous les peptides du cocktail sont reconnus par les cellules T CD4+ mémoires issus de donneurs sains et induisent une forte sécrétion de cytokines Th1 (IFN- γ et IL-2). En outre, des lignées cellulaires T CD4+ spécifiques des peptides ont été générées, et leur potentiel cytotoxique confirmé non seulement par la lyse de modèles originaux exprimant les antigènes de latence II (lymphocytes T ou monocytes transformés par EBV), mais également des cellules de lignées lymphoblastoïdes exprimant les antigènes de latence III (LCLs). De plus, des ELISPOT granzymes B ont suggéré qu'une partie de cette activité lytique était médiée par la voie des perforine/granzymes. De manière importante, aucun changement dans phénotype ou dans la fonction des cellules T CD4 régulatrices CD4+CD25+CD127^{low} n'a été observé en réponse aux peptides EBV, évitant les risques d'aggravation de l'environnement immunosuppresseur préexistant dans les pathologies malignes associées à l'EBV.

Nos données suggèrent ainsi que ce cocktail de peptides promiscuopous pourrait être utilisé en toute sécurité lors d'approches d'immunothérapie contre les pathologies malignes associées à la latence II d'EBV, principalement pour prévenir les rechutes chez les patients à hauts risques suite aux traitements classiques.

Contexte et objectifs de l'étude :

Les travaux précédents du laboratoire ont permis de définir un cocktail de peptides dérivés des antigènes de la latence II d'EBV. Ces antigènes sont non seulement immunogéniques dans les modèles murins humanisés, mais aussi capables de réactiver des cellules T CD4+ mémoires et de les orienter vers la voie Th1, et ce aussi bien chez le donneur sain que chez le patient. Par ailleurs, des études préalablement menées dans notre équipe ont permis de mettre en évidence une augmentation de la fréquence des cellules régulatrices (TCD4+CD25+) dans la maladie de Hodgkin, et plus particulièrement dans les formes associées à l'EBV. Dans ce contexte, nous avons choisi de tester l'effet de nos peptides sur ces populations régulatrices isolées du sang de donneurs sains.

Dans cette étude, nous avons comme principaux objectifs (i) de confirmer de manière plus fine l'orientation stricte vers la voie Th1 ainsi que la nécessité de conserver tous les peptides du cocktail, (ii) de vérifier que ce dernier n'active pas les cellules T régulatrices, (iii) et enfin de valider l'induction d'une réponse cytotoxique spécifique pour les peptides et le cocktail.

Méthodologie :

Des PBMCs déplétés en TCD8+ issus de divers donneurs sains HLA-II-typés ont été mis en culture en présence du cocktail ou de chacun des peptides, afin de valider l'origine cellulaire de la sécrétion d'IL-2 et d'IFN- γ . Cette analyse a été faite à la fois au niveau transcriptomique, au niveau protéique et au niveau cellulaire. Pour savoir si les cellules T CD4+ sécrétant l'IFN- γ avaient un potentiel cytotoxique nous avons généré des lignées TCD4+ oligoclonales spécifiques de chacun des peptides ou du cocktail dans sa globalité. Ces lignées peptide-spécifiques ont été caractérisées et validées en termes de réponse spécifique aux peptides et de production d'IFN- γ . Tout d'abord des tests classiques de cytotoxicité ont été réalisés ciblant des cellules B EBV transformées (LCL). Ces expériences ont été confirmées pour chacune des lignées spécifiques de peptides, par des essais de cytotoxicité combinés à des ELISPOT Granzyme B, ciblant des lignées d'origine cellulaire (monocytes, lymphocytes T et B) et de profils de latence EBV (latence II et III) différents. Et enfin, nous avons pu caractériser l'effet du cocktail sur des populations fonctionnelles de Treg isolées du sang de donneurs sains.

Principaux résultats acquis

L'analyse globale montre clairement une sécrétion précoce et massive des cytokines de type Th1 (IL-2, IFN- γ et TNF- α). Aucun des différents composants du cocktail n'a engendré une sécrétion significative de cytokines de la voie Th2 (IL-4 et IL-10) ou suppressive (IL-10 et TGF- β). Par ailleurs, l'augmentation de plus de 50% de la fraction des TCD4⁺ mémoires sécréteurs d'IFN- γ après traitement par le cocktail, désigne cette fraction comme étant à l'origine de la sécrétion d'IFN- γ . Les résultats obtenus avec les Treg humains isolés *ex vivo* indiquent clairement qu'aucun des peptides du cocktail n'est susceptible de potentialiser la réponse suppressive induite par les Treg, comme en témoigne l'absence de modification des marqueurs phénotypique, du profil de sécrétion cytokinique ou du potentiel d'activité suppressive.

Des lignées spécifiques ont alors été générées, caractérisées et validées en termes de réponse spécifique aux peptides et de production d'IFN- γ . Nous avons confirmé leur pouvoir cytotoxique par différentes approches méthodologiques. Tout d'abord des tests classiques de cytotoxicité ont été réalisés ciblant des cellules B EBV transformées (LCL) en présence ou non de CMA. Ces premiers essais ont apporté la preuve que les lignées étaient capables de bloquer la croissance des LCL, mais également de les détruire par des mécanismes faisant principalement intervenir la lyse (60% de la réponse), puis secondairement la voie des membres de la famille du TNF (pour un maximum de 40%). Ces données ont été confirmées pour chacune des lignées de peptides par des essais de cytotoxicité combinés à des ELISPOT Granzyme B, ciblant des lignées d'origines cellulaire (monocytes, lymphocytes T et B) et de profils de latence EBV (latence II et III) différents. Les résultats obtenus sur les LCL autologues ou hétérologues, ont confirmés la présence de précurseurs cytotoxiques EBV spécifiques dans la population oligoclonale générée par le cocktail. Par ailleurs, toutes les lignées T spécifiques que nous avons générées ont été capables d'induire une lyse effective de modèles originaux de latence II développés au sein du laboratoire (monocytaire (TE1) et lymphocytaire T (NC5) transformées par EBV).

De façon intéressante, la réponse obtenue avec le cocktail reste la meilleure, puisque son effet lytique a été observé non seulement à un meilleur niveau sur les lignées de latence II, mais aussi il est le seul à générer une réponse efficace contre celles de latence III. Ainsi, quel que soient les tests, les variations enregistrées proviennent plus de la spécificité antigénique restreinte, que d'une véritable incapacité des lignées à développer une réponse cytotoxique.

De plus, les tests réalisés ont été enregistrés après des temps de contact courts (4h), soit l'équivalent des tests pour les *CTL* TCD8+, ce qui nous encourage à dire que le cocktail est bien capable d'induire l'activation d'HTLs (cellules TCD4+ helper cytotoxiques).

Conclusion

L'ensemble des résultats confirme les données de la précédente étude: orientation de la réponse immune vers la voie Th1, activation de TCD4+ mémoires sécréteurs d'IFN- γ et cytotoxiques contre des lignées EBV spécifiques (HTLs-EBV). L'activation spécifique du système immunitaire effecteur cytotoxique en dehors de toute activation du système suppresseur, nous permet sérieusement d'envisager la mise en place d'essais cliniques de phase I/II. De plus, la variété des cibles lysées, nous conforte dans l'idée de pouvoir utiliser ce cocktail en ciblant non seulement les tumeurs de latence II, mais aussi celle de latence III comme le suggère les résultats intéressants obtenus sur les LCL (Latence III). Ces essais permettront alors de mettre en place des protocoles de vaccination ou de thérapie cellulaire chez des patients en rémission (mais à risque élevé de rechute) et chez des patients réfractaires aux traitements conventionnels.

EBV Latency II-derived Peptides Induce A Specific CD4⁺ Cytotoxic T-cell Activity and Not A CD4⁺ Regulatory T-cell Response

Olivier Morales,* Stéphane Depil,*† Dhafer Mrizak,* Nathalie Martin,* Papa Alioune Ndour,*
Françoise Dufosse,‡ Céline Miroux,* Jean Coll,* Yvan de Launoit,* Claude Auriault,§
Véronique Pancre,* and Nadira Delhem*

Summary: Epstein-Barr virus (EBV) is associated with several malignant diseases that can be distinguished by their patterns of viral latent gene expression. We developed here an original peptidic approach to favor the induction of a specific CD4⁺ T-cell response against EBV latency II malignancies (Hodgkin's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, T/NK lymphoma). Previously, we selected 6 peptides derived from EBV nuclear antigen-1, latency membrane proteins (LMP)-1, and LMP-2 highly promiscuous for major histocompatibility complex class II molecules and showed their ability to induce interferon- γ -secreting CD4⁺ T cells. We confirmed here that all peptides used in cocktail are recognized by human CD4⁺ memory T cells from healthy donors, inducing a broad T-helper (Th)1 cytokine secretion interferon- γ , interleukin-2. Furthermore, we have generated EBV-specific CD4⁺ T-cell lines and proved their cytotoxic potential, not only on original models expressing latency II antigens (EBV-transformed T cell or monocyte), but also on lymphoblastoid cell lines expressing latency III antigens (lymphoblastoid cell lines). In addition, granzyme B enzyme-linked immunospot assays suggested that a part of this specific cytotoxic activity could be linked to the granule lytic pathway. Very importantly, we have showed that neither phenotypical changes nor functional activities of CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low}-regulatory T cells were observed in response to EBV peptides, avoiding any risk of aggravation of the preexisting immunosuppressive environment reported in EBV⁺-associated malignancies. In conclusion, our promiscuous peptide cocktail could be used safely in immunotherapeutic approaches against EBV latency II malignancies, mainly to prevent relapse in high-risk patients further to classic treatments.

Key Words: EBV, class II epitopes, CD4⁺ CTL, regulatory T cells
(*J Immunother* 2012;35:254–266)

The Epstein-Barr virus (EBV) is a widespread human gamma herpes virus with a tropism for B lymphocytes and epithelial cells. More than 95% of the adult population

carries EBV as a lifelong asymptomatic infection. Primary infection is usually asymptomatic, but it can sometimes be the cause of infectious mononucleosis in adolescents.

Nevertheless, EBV is associated with several malignant diseases that can be distinguished by their patterns of viral latent gene expression.¹ The latency I/II program, limited to the expression of EBV nuclear antigen (EBNA)-1 and to 1 of the 2 latency membrane proteins (LMP)-1 or -2, is particularly associated with gastric carcinomas, nasopharyngeal carcinomas and peripheral T and NK-cell lymphomas. EBNA-1, LMP-1, and LMP-2 are all expressed during latency II state that is the hallmark of EBV-positive Hodgkin's lymphoma (approximately 50% of cases in North America and Europe). EBNA-1, LMP-1, and LMP-2 are probably critical for tumorigenesis, inducing cell proliferation as well as resistance to apoptosis.² EBNA-1 binds as a dimer to the viral origin of replication and ensures episomal replication during B-cell growth.³ The COOH-terminal part of LMP-1 can act as a direct oncogene^{4,5} by mimicking CD40-mediated B-cell activation.⁶ Thus, LMP-1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor (TNF) receptor family⁷ and Janus kinase 3,⁸ ultimately leading to nuclear factor κ B⁹ and AP-1 (Jun/Jun or Jun/Fos)¹⁰ induction. LMP-2 constitutively activates the Ras/PI3-K/Akt pathway, a common event during cell survival and tumorigenesis, suggesting that the viral protein plays a key role not only in EBV latency and persistence but also in the development of EBV-associated malignancies.^{11,12}

CD8⁺ T cell specific for EBNA-1, LMP-1, and LMP-2 are found in the circulation and, although being able to kill peptide-sensitized lymphoblastoid cell lines (LCL) in vitro, are unable to efficiently lyse LCL naturally expressing these antigens.¹³ It has been repeatedly apparent that development^{14,15} and maintenance^{16–18} of effective CD8 cytotoxic T lymphocytes (CTLs) are dependent on CD4 T-cell help. Recognition of EBV products by CD4 T cells has not been subject to detailed investigation as for the CD8 T-cell response.¹⁹ However, it is now well known that CD4⁺ T cells can exhibit a direct effector function against virus infected or malignant cells expressing major histocompatibility complex (MHC) class II molecules.^{20–22} Indeed, evidence of CD4⁺ T-cells cytotoxicity property has been confirmed in recent years, both in vitro and in vivo.^{23–25}

CD4⁺ T-cell response to latent-cycle antigens has now been extensively studied, and leads to a specific hierarchy within the latent epitopes dominated by EBNA-1, but rarely by the LMPs antigens.^{26–29} Nevertheless, as they can be reactivated in vitro, they regularly display T-helper (Th)1 phenotype and are frequently cytotoxic in response to antigen or peptide-loaded target cells. Although some EBV

Received for publication October 13, 2011; accepted December 29, 2011.

From the *CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, Université Lille-Nord de France, Institut Pasteur de Lille, IFR142, Lille; †Laboratoire d'Immunologie - HLA-Transplantation, Centre de Biologie Pathologie, Lille; ‡Service d'hématologie, Institut Gustave Roussy, Villejuif; and §Institut de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, Valbonne-Sophia-Antipolis, France.

O.M., S.D., V.P., and N.D. contributed equally.

This work is dedicated to the memory of Dr Jean Coll.

Reprints: Olivier Morales, Institut de Biologie de Lille; CNRS UMR 8161, 1 Rue du professeur Calmette 59021 Lille Cedex. (e-mail: olivier.morales@ibl.fr).

Supplemental Digital Content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Website, www.immunotherapy-journal.com.

Copyright © 2012 by Lippincott Williams & Wilkins

latent-cycle antigen-specific CD4⁺ T cells are able to kill EBV⁺ target cells,^{27,30–32} none of them have been tested for their ability to induce or not induce an activation of regulatory T (T_{REG}) cells. An important immunosuppressive microenvironment, commonly supported by T_{REG} cells, has been described in many EBV-associated malignancies.^{33–38} Indeed, increase in circulating FoxP3⁺ CD4⁺ CD25^{high} T_{REG} cells has been shown in both Hodgkin lymphoma and nasopharyngeal carcinoma patients. Moreover, EBNA-1 and LMP-1 mediate up-regulation of several chemokines that are able to favor the recruitment of these T_{REG} cells.^{34–39}

A previous study from our laboratory identified and characterized a peptide cocktail containing highly promiscuous MHC class II epitopes derived from EBNA-1, LMP-1, and LMP-2 antigens.³⁹ This peptide cocktail was determined as immunogenic both in humanized mice models and human CD4⁺ T cells from individuals expressing various human leukocyte antigen (HLA) II genotypes. As expected, it elicits a strong Th1 phenotype, suggesting that it contains promiscuous and naturally processed epitopes recognized by CD4⁺ memory T cells. The experiments described in this current study confirm that our peptides cocktail induce an EBV-specific CD4⁺ T-cell responses characterized by a sustained interferon (IFN)- γ secretion and we validate the importance of each peptide within the cocktail. Its ability to generate an efficient cytotoxic response against various EBV latency cell lines is also proved. And, very importantly, given the dominant immunosuppressive environment in EBV-associated malignancies, we show that our EBV peptides do not activate the suppressive component of the immune response. These findings present for the first time a promiscuous EBV-latent peptide cocktail as an excellent and safe candidate for a vaccine.

MATERIALS AND METHODS

Synthetic Peptides

As previously described,³⁹ we have selected peptides containing HLA class II-restricted epitopes into the sequences of EBV latency II antigens, EBNA-1 (NCBI accession number NP_039875), LMP-1 (CAA26023), and LMP-2 (AAA45887). Among those 6 selected highly promiscuous peptides (active for more than 7 HLA II molecules): 1 derived from LMP-1 (LMP1_{68–83}) was called LMP1-2, 2 derived from LMP-2 (LMP2_{224–244} and LMP2_{372–388}) were called LMP2-4 and LMP2-5, and finally 3 derived from EBNA-1 (EBNA1_{475–500}, EBNA1_{514–539}, EBNA1_{526–552}) were called EBNA1-4, EBNA1-5, and EBNA1-6, respectively. These 6 peptides were used alone or combined in a peptide cocktail containing the same quantity of each peptide called EBV cocktail.

Donors, Cell Lines, and Culture Conditions

Donor's Cells

Human blood samples were collected from 12 healthy adult EBV seropositive donors. This procedure was applied with patients' informed consent obtained in accordance with Institutional Review Board approval from the Institut de Biologie de Lille. HLA typing was performed by the Laboratoire d'Immunologie-HLA Transplantations (Lille, France) using standard PCR-SSP genotyping assays (Table 1). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by standard density centrifugation on Ficoll-Paque PLUS gradients (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden).

Isolation of CD8-depleted PBMCs

PBMCs were routinely depleted of CD8⁺ T cells using CD8 MicroBeads and MACS Technology (Miltenyi Biotec, Germany) according to the manufacturer's instructions. Flow cytometric analysis showed that a depletion of >95% of the CD8⁺ cells was consistently achieved.

Isolation of T_{REG} Cells

Isolation of human T_{REG} cells, from PBMCs of adult EBV⁺ donors, was established using the CD4⁺ CD25⁺ T_{REG} cell isolation kit (Miltenyi biotec, Germany) according to the manufacturer's instructions. Flow cytometric analysis showed that an enrichment fraction >95% in CD4⁺ CD25⁺ cells was consistently achieved.

Standard Culture Medium

RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium-pyruvate, 10 mM nonessential amino acids, 10 mM (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 50 U/mL penicillin, 50 μ g/mL streptomycin, 50 μ g/mL gentamycin, 50 μ M β -mercaptoethanol was used as standard culture medium, and was supplemented either with 10% human AB serum (BioWest) for donor's cells, or 10% fetal calf serum (GIBCO-Invitrogen) for target cell lines. Cells were incubated at 37°C under 5% CO₂ atmosphere and 95% humidity in a Hera Cell 150 incubator (Thermo Electron).

Target Cell Lines

EBV-transformed B-LCLs were established from PBMCs (2.10⁶ cells/mL) infected with the B95.8 EBV strain with cyclosporin A addiction (Sigma-Aldrich, Saint Quentin, France) at a final concentration of 5 μ g/mL and cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% of fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 50 U/mL penicillin, 50 μ g/mL streptomycin, or gentamycin 50 μ g/mL. Established LCLs were then cultured in standard culture medium. EBV latency II-transformed CD8 T lymphocytes (NC5) and monocytes (TE1) cell lines^{40,41} were generated in our laboratory and cultured in standard medium culture.

Generation of EBV cocktail or Single Peptide-specific Cell Lines

CD4⁺ T-cell lines were generated according to a protocol adapted from Voo et al.⁴² Briefly, CD8-depleted PBMCs were stimulated in vitro in standard culture medium supplemented with 10% human AB serum at 2 $\times$ 10⁵

TABLE 1. Genotypes Human Leukocyte Antigen (HLA)-DRB1 and HLA-DPB1 of the Donors

Donors	HLA-DRB1	HLA-DPB1
1	DRB1*03*08	DPB1*0202,*0301
2	DRB1*13*14	DPB1*0401,*1802
3	DRB1*15*03	DPB1*0401,*0402
4	DRB1*04*07	DPB1*0201*1001
5	DRB1*11	DPB1*0402,*1301
6	DRB1*03*11	DPB1*0402
7	DRB1*11*07	DPB1*0201,*0401
8	DRB1*04*13	DPB1*0201,*0501
9	DRB1*01*03	DPB1*0202,*0401
10	DRB1*04*07	DPB1*0402,*1001
11	DRB1*03*11	DPB1*0402
12	DRB1*04*11	DPB1*0101,*0401

cells per well in a flat-bottomed 96-well plate with or without EBV-peptide cocktail or each peptide at 60 µg/mL. On days 7 and 14, cells were restimulated with autologous γ -irradiated (5000 rad) PBMCs prepulsed with the same peptide or the EBV cocktail. On days 8 and 15, 300 U/mL of interleukin (IL)-2 (Peprotech) was added to the cultures. On day 19, all wells showing marked T-cell growth were tested for (i) their percentage of natural killer (NK) cell population ($CD3^+CD56^+CD16^+$) and (ii) their peptide-specific reactivity using autologous LCLs or autologous PBMCs pulsed for 2 hours with the cognate peptide and/or the cocktail (20 µg/mL). The peptide-specific cell lines were considered positive as they (i) contained <1% NK cells (data not shown) and (ii) released large amounts of IFN- γ and low amount of IL-10 after enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) assay as described later, in a target-dependent manner.

Cytokine Detection

Supernatants were tested for cytokine (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α , transforming growth factor (TGF- β_1) production by ELISA method as previously described.³⁹ Results were expressed as the mean of duplicate wells after subtraction of the background.

Cytokine Release of CD8-depleted PBMCs

Two hundred thousand CD8-depleted PBMCs/mL were cultured in culture 25 cm³ flasks (BD Falcon) in standard culture medium supplemented with 10% human AB serum with or without the peptide cocktail or single peptide (60 µg/mL). Two microliter of cellular suspension was harvested at day 1, 2, 3, 4, 6, 10, and 12 for IL-10 and IFN- γ for real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-Q-PCR) and ELISA assays; and only at day 1, 2, 3, 6 for IL-2, IL-4, TGF- β_1 , and TNF- α , for ELISA assays. Supernatants and cells were separated using standard cell centrifugation. Supernatants were stored at -20°C until their testing for cytokine production by ELISA method as previously shown. Cells' pellets were dissolved in 1 mL of TRIzol reagent (Invitrogen) and preserved at -20°C until RNA extraction.

Cytokine Release of T_{REG} Cells

Five hundred thousand PBMCs or $CD4^+CD25^+$ T cells alone and a (2:1) mixture of PBMCs: $CD4^+CD25^+$ T cells were cultured for 48 hours in standard culture medium supplemented with 10% human AB serum with or without EBV-peptide cocktail in a 48-well plate. Cells were activated with plate-bound anti-CD3 (1.5 µg/mL) monoclonal antibody (mAb), incubated at 37°C for 2 hours before the culture assay, and soluble anti-CD28 (100 ng/mL) mAb (Clinisciences) added at the time of the culture assay. Supernatants and cells were separated using standard cell centrifugation. Supernatants were stored at -20°C until their testing for cytokine production by ELISA method as previously shown.

Cytokine Release of EBV Cocktail or Single Peptide-specific Cell Line

To define their cytokinetic profile, supernatants of confirmed specific cell lines were collected, pooled, and stored (-20°C), at the end of their establishment.

Statistical Analysis

The ELISA results relevance was validated by the statistic rank sum Mann-Whitney test. Data were analyzed using the statistical package SigmaStat for Windows 3.0.1 (SPSS) and Sigma XL. All quoted *P* values are 2-sided, with *P* < 0.05 (*) and *P* < 0.01 (**) being respectively considered statistically significant and highly significant.

RT-Q-PCR Assays

RNA Extraction

Total RNA from cellular pellets ranging from 3×10^6 to 10×10^6 cells had been extracted using the TRIzol reagent (Invitrogen) method according to the manufacturer's instructions. Pellets of inferior concentration were isolated using the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel), according to the manufacturer's instructions. RNA concentration and purity were measured by spectrophotometric methods (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotec). Total RNA were stored at -80°C until further use.

mRNA Reverse Transcription

Two micrograms of total RNA were supplemented with 5 µL of a master mix of 1 µL oligo-dT (Roche Diagnostic, Meylan, France) and 0.1 µL RNAsin (40 U/µL, Promega, Charbonnières, France) and then incubated at 70°C for 5–10 minutes. After 5 minutes at room temperature, 10 µL of the following mix was added: 6 µL buffer 5 $\times$ (Invitrogen) + 1 µL DTT 0.1 M (Invitrogen) + 2 µL dNTPs 10 mM (Amersham) + 0.1 µL RNAsin 40 U/µL (Promega) + 1 µL Superscript (Invitrogen). The reaction was then followed by an initial incubation step at 45°C for 45–60 minutes, a second incubation at 95°C for 5 minutes and treatment for 20 minutes at 37°C with RNase H (Promega). Finally, ultrapure distilled water (GIBCO, Invitrogen) was added to obtain a final concentration of 10 ng total DNA/µL and stored at -20°C until further use.

ABI Prism 7300 Sequence Detection System

Transcripts were quantified using real-time quantitative RT-PCR with the ABI Prism 7300 sequence detection system (Applied Biosystems, CA), in MicroAmp optical 96-well reaction plates (Applied Biosystems). In each well, 10 µL of a specific couple of primers, designed for RT-PCR and purchased from MWG-Biotech (Germany), was deposited at a final concentration of 10 pg/mL and then stored at -20°C. The housekeeping (HKG) genes β -actin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, ubiquitin, and hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) were used as controls in each plate. PCR reactions were performed according to the manufacturer's instructions, in a final volume of 20 µL, using 2 $\times$ MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR assay (Eurogentech) containing Meteor Taq DNA polymerase, MgCl₂ (4 mM final concentration), dNTPs (including dUTP), SYBR Green I, stabilizers, and passive references required for signal normalization and optimized buffer components, for 1 µL of cDNA (equivalent to 10 ng total RNA/µL). The PCR program included initial denaturation and Meteor Taq activation for 5 minutes at 95°C, followed by 40 standard amplification cycles as follows: 15 seconds at 95°C (denaturation), 1 minute at 60°C (annealing, elongation). Fluorescent product was detected at the last step of each cycle. A melting curve analysis was carried out immediately after amplification, in accordance with the manufacturer's instructions.

Data Expression and Statistical Analysis

Genes (Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/JIT/A216>) involved in different immune responses (cytokines, T_{REG} cells, Th cells, activation, apoptosis, and cytotoxicity-associated markers) were analyzed. Quantitative analysis was achieved based on the cycle threshold (C_T) value for each well and calculated using ABIPrism software. Each individual value was normalized using the mean C_T of the 4 HKG according to the standard ΔC_T method⁴³: $\Delta C_T = C_T - C_{THKG}$. For comparisons between groups, the relative gene expression was expressed in $2^{-\Delta\Delta C_T}$ or $-\Delta\Delta C_T$ leading to the arbitrary values of 1 or 0, respectively, for the reference group. Microsoft Excel and SigmaStat softwares were used for data treatment and statistical analysis.

Flow Cytometric Analysis

Cell immunophenotype was analyzed by flow cytometry using EPICS XL-MCL cytometer powered by EXPO 32 software. After their harvest, cells were washed with phosphate-buffer saline (GIBCO-Invitrogen) and labeled with fluorochrome-conjugated mAbs. For each assay, the appropriate isotopic control mAbs were used for markers setting. Finally, data were analyzed and represented with Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry (WinMDI) (Scripps Research Institute, CA) software.

T_{REG} Cells Analysis

mAbs anti-CD4-phycoerythrin(PE)-cyanin(Cy)5, -CD25-fluorescein isothiocyanate (FITC) (BD Pharmingen, San Diego, CA), -CD25-PE (Miltenyi Biotec, Berlin, Germany), and -CD127-FITC or CD127-PE (Clinisciences, Montrouge, France) were used for detection of cell surface antigens. For FoxP3 intracellular staining, cells were first labeled with surface mAbs, then fixed and permeabilized with the Intraprep Kit (Beckman Coulter), and stained with the anti-FoxP3-PE mAb with the staining buffer kit (Miltenyi biotec, Berlin, Germany) according to the manufacturer's instructions (data not shown).

T_{REG} Cells Functionality Assays

Mixed leukocyte reaction (MLR) was set up to measure the ability of T_{REG} cells to inhibit the proliferative response of autologous PBMCs, and evaluate their proliferation profile upon stimulation. The cultures were run in standard culture medium with or without the EBV-peptide cocktail or each peptide (60 µg/mL). Proliferation was measured after [methyl-³H]-Thymidine (1 µCi/well) (GE Healthcare, Saclay, France) incubation for the last 18 hours. Each assay was carried out in triplicate.

Suppression assays were set up and optimized with cultures of 15×10^4 responder PBMCs, or CD4⁺ CD25⁺ T cells, or a mixture of both cell types in different ratio in a round bottom 96-well plate and cultured for 48 hours. Cells were activated with plate-bound anti-CD3 (1.5 µg/mL), incubated at 37°C for 2 hours before the culture assay, and soluble anti-CD28 (100 ng/mL) mAb (Clinisciences, Montrouge, France) added at the time of the culture assay. Suppression percentage of T_{REG} cells was calculated as specific proliferative suppression using the following equation:

$$\% \text{ suppression} = 100 - \left[100 \times \frac{\text{cpm mean of PBMCs}}{\text{cpm mean of PBMCs: CD4}^+ \text{CD25}^+} \right]$$

The relative inhibition was then evaluated as the percentage of suppression comparatively to the standard nonstimulated condition using the following equation:

$$\text{Relative inhibition} = 100 \times \left(\frac{\% \text{ suppression}}{\% \text{ standard suppression}} \right)$$

Proliferation assay of CD4⁺ CD25⁺ T_{REG} cells was set up in the presence of anti-CD3 (150 ng/mL), anti-CD28 (100 ng/mL) (Clinisciences, Montrouge, France), IL-2 (300 U/mL, Peprotech), and 10×10^4 gamma-irradiated (5000 rad) autologous PBMCs. Results are expressed in cpm after subtraction of the cpm mean of γ -irradiated autologous PBMCs background used as control.

Functionality Assays on EBV-specific CD4⁺ T-cell Lines

Cytolytic Assays

Cytotoxic activity of cocktail or peptide-specific effector CD4⁺ T-cell lines was measured using the DELFIA EuDTA Cytotoxicity assay,⁴⁴ a fluorometric method based on time-resolved fluorescence reading, according to the manufacturer's instructions (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Here, cocktail or peptide-specific effector (E) CD4⁺ T-cell lines as previously shown were added to autologous LCLs, NC5, or TE1 target (T) cell lines at known E:T ratios in a 4-hour assay. Briefly, target cells were passively labeled, washed in phosphate-buffer saline 5 times at least and resuspended in standard culture medium ready for the assay. Target cells (5×10^3) were loaded in a 96-well round bottom plate and effector cells of varying cell concentration were added to get the expected ratio ranging from 0.5:1 to 50:1. After 6-hour culture, plates were centrifuged and supernatants (20 µL) were transferred to another 96-well flat-bottomed plate into which the Europium (Eu³⁺) solution was added. Plates were shaken 15 minutes at room temperature and fluorescence was read in a time-resolved fluorometer (Victor3v 1420-041 multi label counter, Perkin Elmer). In some experiments, peptide or EBV cocktail-specific effector T cells were pretreated with 100 nM concanamycin A (CMA, Sigma-Aldrich, Saint Quentin, France) before addition to the targets. An aliquot of the ready diluted labeled target cell suspension mixed with culture medium and added to Eu³⁺ solution, was used as the background control. Supernatants of labeled target cells cultured alone were used to define the spontaneous release. Supernatants of labeled target cells incubated with 0.1% Triton X100 (Sigma-Aldrich, Saint Quentin, France) were used to define the maximum release, to get an internal positive control. The percentage of ligand release was determined as percentage specific lysis and was calculated using the following equation:

$$\% \text{ specific lysis} = 100 \times$$

$$\frac{\text{experimental release (counts)} - \text{spontaneous release (counts)}}{\text{maximum release (counts)} - \text{spontaneous release (counts)}}$$

Granzyme B (GrB) Enzyme-linked Immuno-spot Assay

We used a human GrB ELISPOT assay (Diaclone) to detect and qualify peptide-specific or cocktail-specific CD4⁺ T-cell lines comparatively to CD8⁺ PBMCs. Briefly, cocultivations of targets and effector cells at E:T ratios ranging from 0.1:1 to 25:1, were cultured in standard culture medium supplemented with 10% human AB serum in

a 6-hour assay. Spots were then revealed according to the manufacturer's instructions based on sandwich immune-enzyme technology. Plates were read in a specific plate reader (AID ELISPOT Robot HR powered by AID ELISPOT software 3.2.3, AID Germany) at the Institut Cochin (Paris, France). Negative controls consisted in effector cells in the absence of target cells, target cells in the absence of effector cells and media only. Effector cells were stimulated by phytohemagglutinin at 10 µg/mL (Sigma-Aldrich, Saint Quentin, France) as positive control of GrB release (data not shown). Results are expressed in spot-forming cells (SFC) per well according to the E:T ratio.

RESULTS

Induction of a CD4⁺ Cytotoxic T-cell Response

Th1 Cytokine Release by Memory CD4⁺ T Cells

PBMC from 9 class II HLA-typed healthy donors (Table 1) were CD8 depleted and stimulated with the latency II peptide cocktail or with each separate peptide during 6 days (Table 2). The cytokine pattern was governed by an early and sustained release of IFN-γ (reaching more than 8-fold the reference) induced by each peptide but predominantly by EBV cocktail treatment. Furthermore, TNF-α was also secreted in the early phase of stimulation, essentially by the cocktail, but also by each peptide (2- to 8-fold increase), except by EBNA₅₁₄₋₅₃₉, which induced a TNF-α secretion only after 6 days of stimulation. IL-2 was also secreted in response to the EBV cocktail and to a major part of peptides, but predominantly to EBNA-1 peptides. Concerning secretion of Th2 or regulatory cytokines, no IL-4 was detected and only a weak secretion of IL-10 and TGF-β₁ was observed after LMP1₆₈₋₈₃ stimulation, limited to the early stage of the stimulation time period. The transient slight IL-10 release, observed after EBV-cocktail stimulation, decreased rapidly after the second day of stimulation.

To confirm the induction of an IFN-γ Th1 profile and to evaluate more precisely the IL-10 secretion, we have analyzed in parallel their transcript expression and secretion until 12 days of EBV-cocktail stimulation. We confirmed that treated cells exerted a massive increase of IFN-γ gene expression, from day 2 and until 12 days, with a peak of expression at the fourth day (Fig. 1A). Nevertheless, this expression rate keeps steady ($\times 20$) through time and seems to increase again from day 10 to day 12. These results are correlated with those of cytokine release (Fig. 1B) where an increase of IFN-γ secretion from day 4 until day 12, with a peak of production on day 10 (2500 pg/mL) was registered. This cytokine secretion was maintained through time, and despite a decrease from the 10th day, it resides nevertheless at a very important level (around 1000 pg/mL). In contrast, no increase of IL-10 transcript was measured, whereas the weak level of IL-10 secretion, detected (300 pg/mL) in the early phase of stimulation, slowly decreased up at a comparable level in the phase of nonstimulated cells (Figs. 1A, B).

Generation of EBV-peptide-Specific CD4⁺ T-cell Lines

We have generated CD4⁺ T-cell lines specific of EBV cocktail and specific of each individual peptide to evaluate their specific activity (Fig. 2). Each generated CD4⁺ T-cell line was specific for their cognate peptide (data not shown)

TABLE 2. Summary of Cytokine Release Upon Short-term Peptide Stimulation

	LMP1 ₆₈₋₈₃						LMP2 ₂₂₄₋₂₄₄						LMP2 ₃₇₂₋₃₈₈						EBNA1 ₄₇₅₋₅₀₀						EBNA1 ₅₁₄₋₅₃₉						EBNA1 ₅₂₆₋₅₅₂						EBV cocktail					
	D1*	D2	D3	D6	D1	D2	D3	D6	D1	D2	D3	D6	D1	D2	D3	D6	D1	D2	D3	D6	D1	D2	D3	D6	D1	D2	D3	D6	D1	D2	D3	D6	D1	D2	D3	D6						
L-4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
L-10	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
TGF- β	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
L-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
FN- γ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
TNF- α	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				

*Cytokine release from CD8-depleted peripheral blood mononuclear cells of healthy EBV⁺ donors, cultured with each peptide at a concentration of 60 µg/mL; medium were harvested on day 1, 2, 3, and 6. Cytokine release was evaluated with enzyme-linked immunosorbent assay method, and defined as the mean of duplicate for each donor. Results indicate the fold increase in mean compared with the nonstimulated cells at the same time point: -, decrease or no increase; +, 2-fold increase; ++, 2- to 8-fold increase; +++, >8-fold increase.

EBNA, EBV nuclear antigen; EBV, Epstein-Barr virus; LMP, latency membrane proteins; IFN, interferon; IL, interleukin; TGF, transforming growth factor; TNF, tumor necrosis factor.

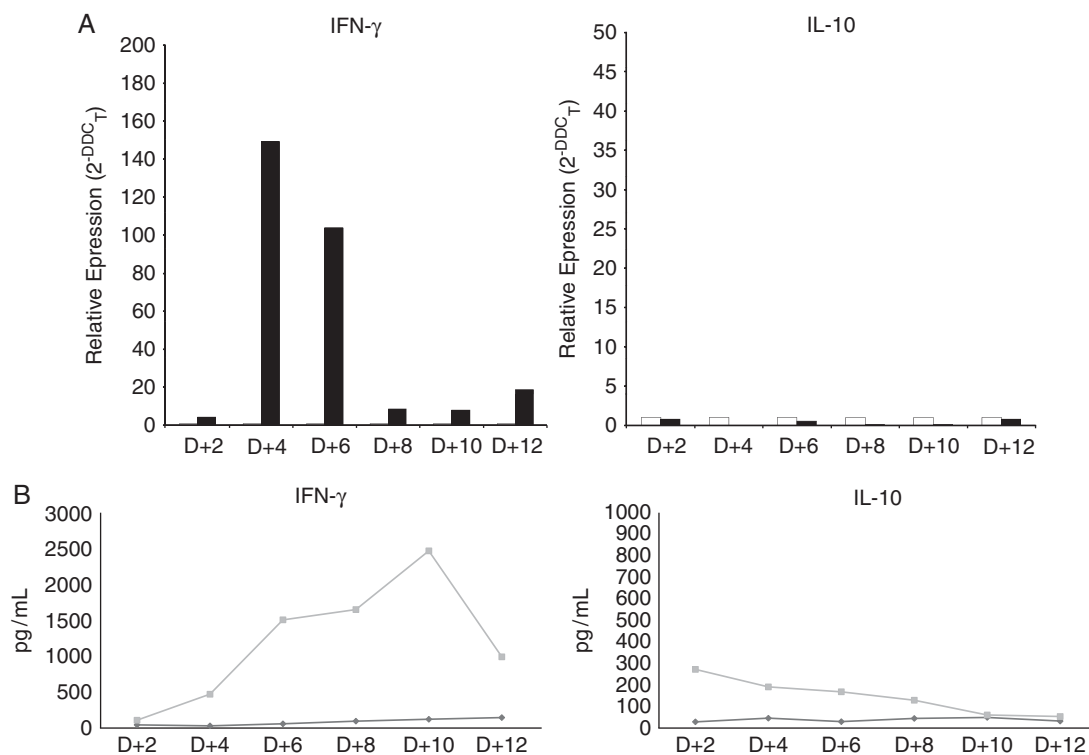


FIGURE 1. Time course of interferon (IFN)- γ and interleukin (IL)-10 expression and secretion. CD8-depleted peripheral blood mononuclear cells from healthy adult Epstein-Barr virus (EBV)⁺ donors were cultured with (filled symbols) or without (opened symbols) EBV-peptide cocktail at a concentration of 60 μ g/mL in 25 cm³ culture flasks (2.10⁶ cells/mL). Medium culture and cells were harvested every other day until day 12 and analyzed for (A) gene expression (bars represent gene expression that was determined by real-time quantitative polymerase chain reaction and evaluated according to 2^{- $\Delta\Delta$ C_T} method) and (B) cytokine release (curves represent cytokine release that was evaluated by ELISA method) of IFN- γ and IL-10.

and particularly these EBV cocktail-specific T-cell lines, as their IFN- γ secretion was significantly emphasized in contact with specific pulsed targets (PBMC EBV: $P < 0.05$, or LCL EBV: $P < 0.01$) but not unpulsed ones (Fig. 2A). We have then characterized these EBV cocktail-specific CD4⁺ T-cell lines in terms of gene expression pattern. Transcriptomic analysis showed that CD4⁺ T-cell lines elicited by the entire cocktail, clearly expressed a strong Th1 specificity in terms of cytokine (IL-2, IFN- γ , TNF- α), cytokine receptors (IL-12R β 2, IFN- γ R1, and CD25), chemokine receptors (CXCR3, CXCR4), Th1-specific signaling and transcription factors (STAT1, STAT4, T-bet) gene expression (Fig. 2B). These cells could be characterized as activated cells as they express CD25, CTLA4, IL7R α , CD44, and CD4. Finally, ELISA assays performed with supernatants of the established EBV cocktail-specific cell line were correlated with the Th1 marker gene expression. Indeed, large amount of IFN- γ was preferentially and significantly ($P < 0.05$) detected without any or slight secretion of IL-4, IL-10, or TGF- β (Fig. 2C).

Perforin/Granzyme-mediated Cytotoxic Activity of the Specific CD4⁺ T-cell Lines

The specific T-cell lines were tested to determine their efficiency in terms of specific cytotoxicity. Cytotoxic assays based on homogeneous time resolved fluorescence measure (Fig. 3A) allowed us to prove that each generated and selected CD4⁺ T-cell line was able to exert a specific lysis on autologous LCLs at 1:1 and 5:1 effectors-to-target ratios.

Moreover, the same assays performed in the presence of CMA, a selective inhibitor of vacuolar type H⁺-AT-Pases,⁴⁵ induced a significant decrease of cytotoxicity for each cell line (from 40% to 60%) (Fig. 3A). To further characterize this cell lysis, we measured the variation of specific GrB release. GrB ELISPOT assays were performed for each cell line at various E:T ratio against 4 different EBV-transformed targets, expressing the latency II (TE1 and NC5 cell lines) or the latency III (autologous and heterologous LCLs) program (Fig. 3B). Heterologous and autologous LCLs targets were similarly sensitive as they induce the same number of SFC in contact of EBV-cocktail cell line, which was systematically more effective whatever the target. Moreover, all peptide-specific cell lines were reactive and able to produce GrB, even if a variable efficiency according to the peptides used could be observed. Indeed, LMP2₃₇₂₋₃₈₈ cell line seemed to be more efficient particularly against autologous or heterologous LCL, whereas the EBNA1₅₁₄₋₅₃₉-specific cell line seemed more efficient against NC5 and TE1 cell lines.

No Induction of a CD4⁺ T_{REG} Cell Response

T_{REG} cells were freshly isolated from 5 healthy donors belonged to the CD127^{-/low} fraction of CD4⁺ CD25⁺/high cells⁴⁶ with a purity >95% [Fig. 4A(i)]. This cytometric analysis was supplemented by gene expression analysis of several markers currently associated with T_{REG} cell. This transcriptomic analysis confirmed their over-expression compared with T_{CONV} (Fig. 4B).

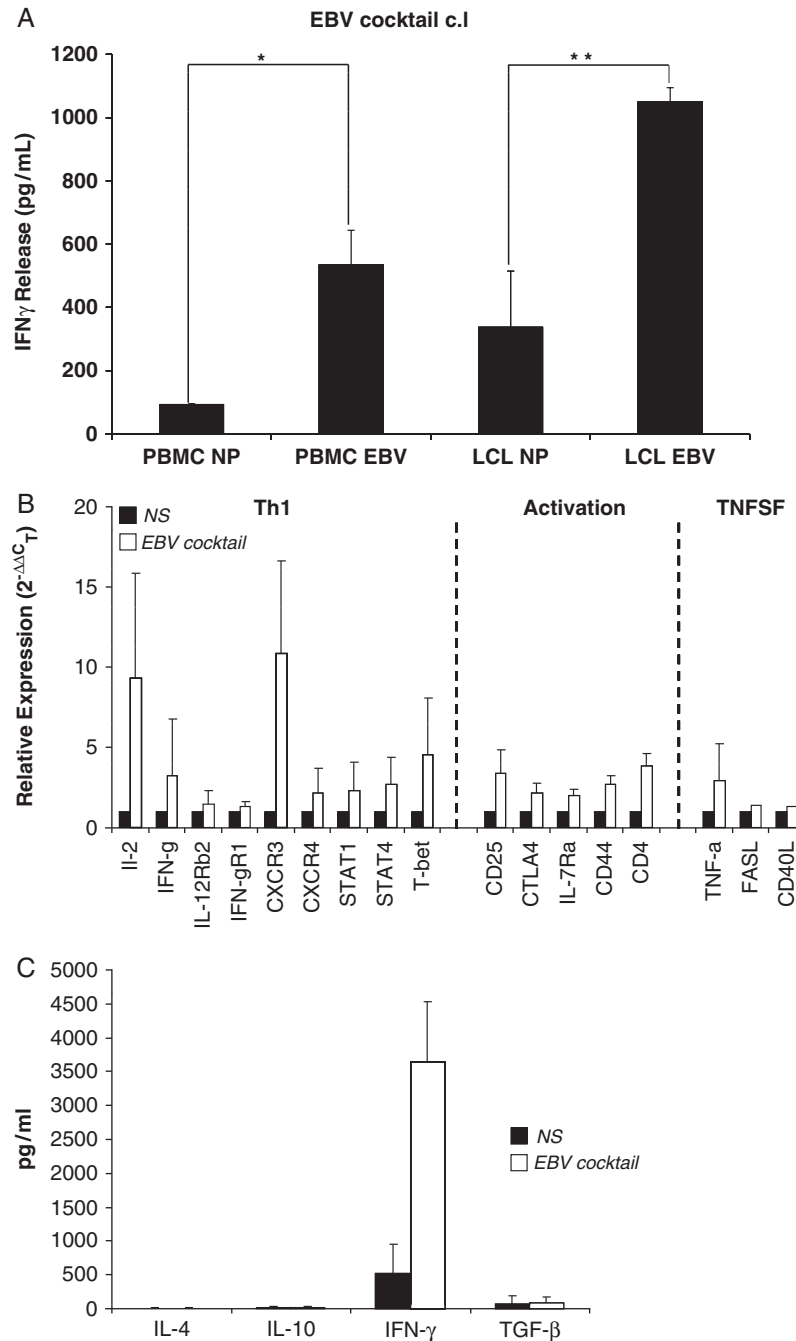


FIGURE 2. Characteristics of Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD4⁺ T-cell lines. **A**, Effector cell lines are specific of the EBV-peptide cocktail. Specific cell lines were tested for their interferon (IFN)- γ release reactivity against peripheral blood mononuclear cell (PBMC) and lymphoblastoid cell line (LCL), pulsed or not (NP) with the EBV-peptide cocktail. **B**, Transcriptomic analysis of EBV-peptide cocktail-specific CD4⁺ T-cell lines. Cells were collected on day 21 after cell line induction protocol, and their gene expression pattern (□) was expressed comparatively to that of nonstimulated CD4⁺ T cells (■). Gene expression was determined by real-time quantitative polymerase chain reaction and evaluated according to $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **C**, Cytokine secretion profile. Culture medium of the above EBV-specific cell lines was harvested at the same time point. Cytokine secretion was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay method (□). Note that interleukin (IL)-2 secretion profile could not be assessed because of exogenous contribution on days 8 and 15. NS: control without in vitro stimulation with the EBV-peptide cocktail (■).

After EBV-cocktail stimulation, cytometric analysis did not show any modification of the T_{REG}-associated markers expression [Fig. 4A(iii)]. And complementary transcriptomic analysis did not show any significant variation in terms of

gene expression except for CD127 (IL7R- α), whose expression was slightly more than 3 times the baseline (Fig. 4C).

Ex vivo-isolated T_{REG} is known to be anergic upon activation with anti-CD3 and anti-CD28 mAb (Fig. 5A).

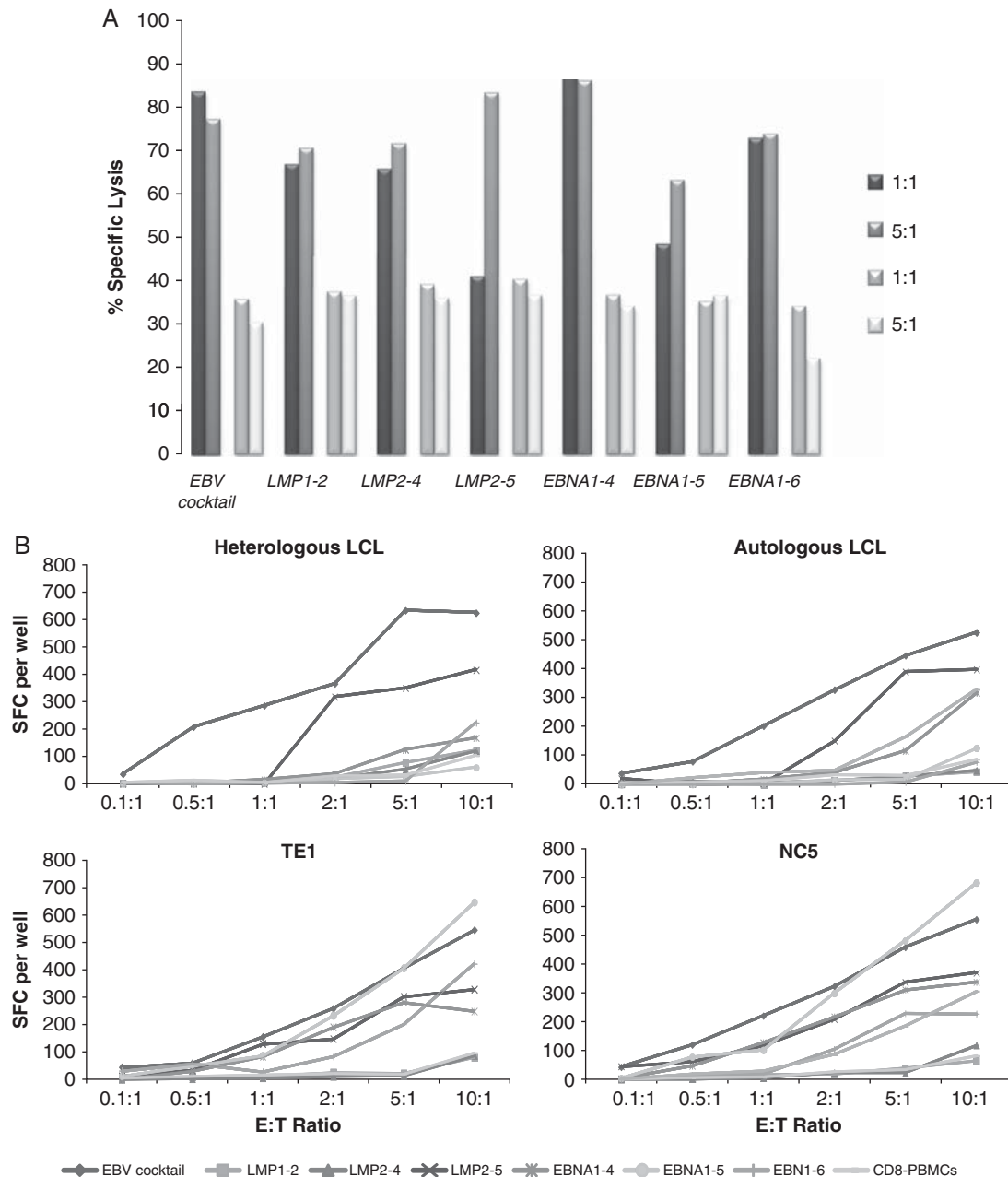


FIGURE 3. Specific cell lines can lyse Epstein-Barr virus (EBV) carrying targets. **A**, Assessment of cytolytic activity of peptide- or EBV cocktail-specific CD4⁺ T-cell lines. Assays were conducted over 6 hours on autologous lymphoblastoid cell lines (LCLs), 100 nM of concanamycin A (CMA) was added independently on each CD4⁺ T-cell lines (clear gray bars). Assays were performed at different Effector-to-Target (E:T) ratios and only 1:1 or 5:1 are represented. The capacity of the CD4⁺ T-cell lines to kill EBV-infected cell lines was determined by fluorimetric method, measured in homogeneous time resolved fluorescence and evaluated as described in Materials and Methods section. Representative results from three independent experiments are shown. **B**, Mechanism of cytotoxicity of peptide- or EBV cocktail-specific CD4⁺ T-cell lines. Effector cells (0.1×10^3 , 0.5×10^3 , 1×10^3 , 2×10^3 , 5×10^3 , 10×10^3 , 25×10^3 cells per well) and freshly isolated CD8⁺ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were run against heterologous or autologous LCLs, EBV latency II-infected T-cell lines (NC5) and EBV latency II monocytic cell lines (TE1) as targets, at 5×10^3 cells per well, in a 6-hour Granzyme-B ELISPOT assay. At 25:1 E:T ratio the spots were too numerous to count or the well saturation value was too high to interpret the results. Points are mean of duplicate of determinations. Results are expressed in spots forming cells (SFC) per well and are representative of 3 independent experiments.

However, it is possible to overpass this anergy by adding massive dose of IL-2 and irradiated autologous PBMCs as antigen-presenting cells. Under these conditions and after stimulation by EBV cocktail or each individual peptide, we did not observe significant differences of proliferation (Fig. 5A).

We have also evaluated the effect of EBV cocktail peptides or each peptide on the suppressive activity of T_{REG} on autologous activated PBMCs. On the basis of MLR suppression assays we have chosen to perform our experiments under the 4:2 PBMC to T_{REG} ratio (Fig. 5A,

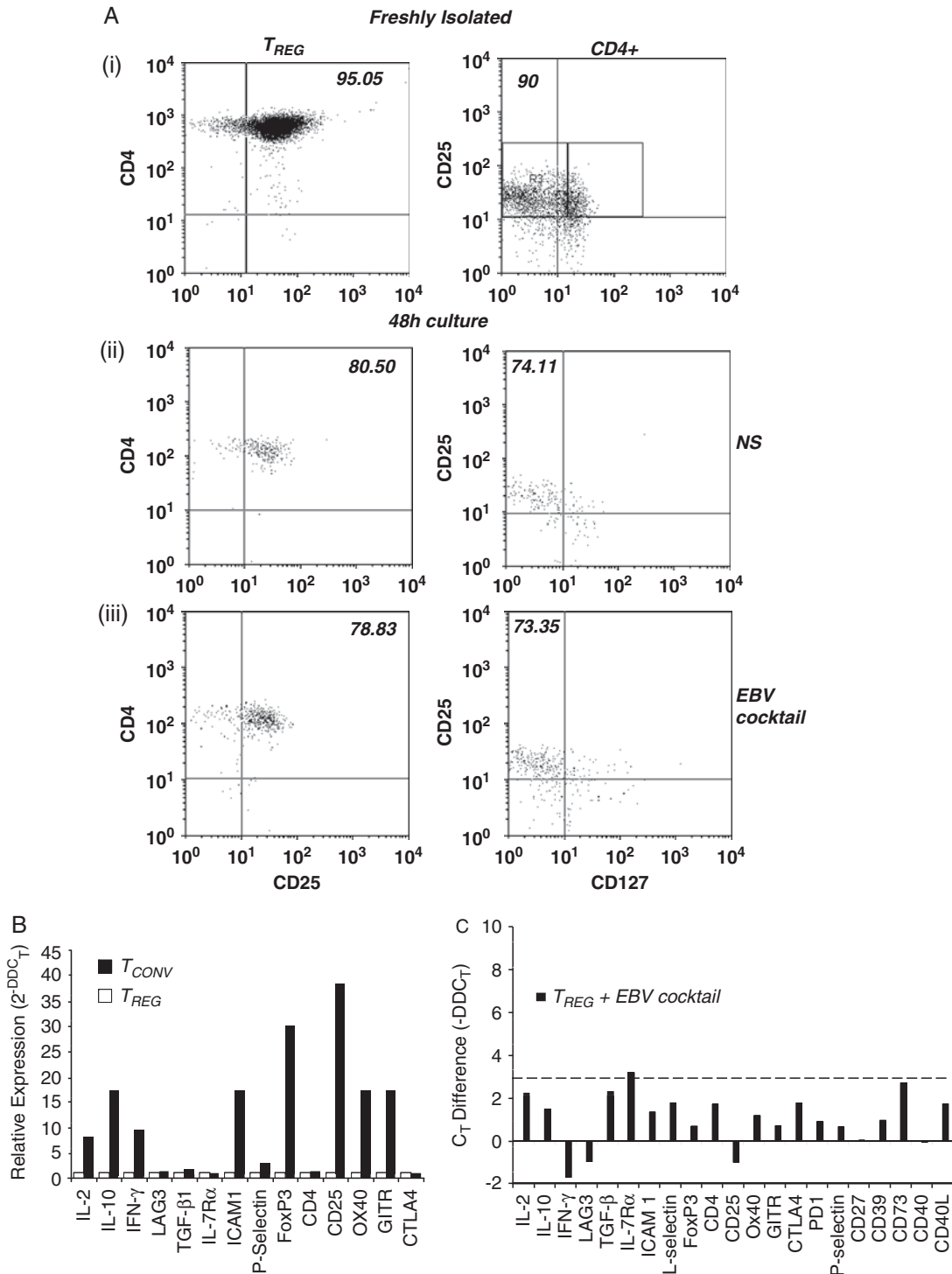


FIGURE 4. Characteristics of ex vivo sorted $CD4^+CD25^+$ regulatory T (T_{REG}) cells after Epstein-Barr virus (EBV)-cocktail treatment. A, Phenotypic characterization of (i) freshly isolated $CD4^+CD25^+$ T_{REG} cells, and (ii) cultured for 48 hours in culture medium without stimulation or (iii) upon EBV-cocktail stimulation ($60 \mu\text{g/mL}$). Number in cross indicates the percentage of cells into the considered quadrant. Cells were analyzed by flow cytometric method. B, Transcriptomic analysis of isolated T_{REG} cells. Freshly isolated T_{REG} cells-associated markers (■) compared with the $CD4^+CD25^-$ conventional T cells (□). C, T_{REG} cells-associated markers after EBV-peptide cocktail treatment (■). Forty-eight-hour cultured cells were collected and their gene expression pattern was expressed comparatively to the nonstimulated ones. Gene expression was determined by real-time quantitative polymerase chain reaction and evaluated in C_T difference according to $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method.

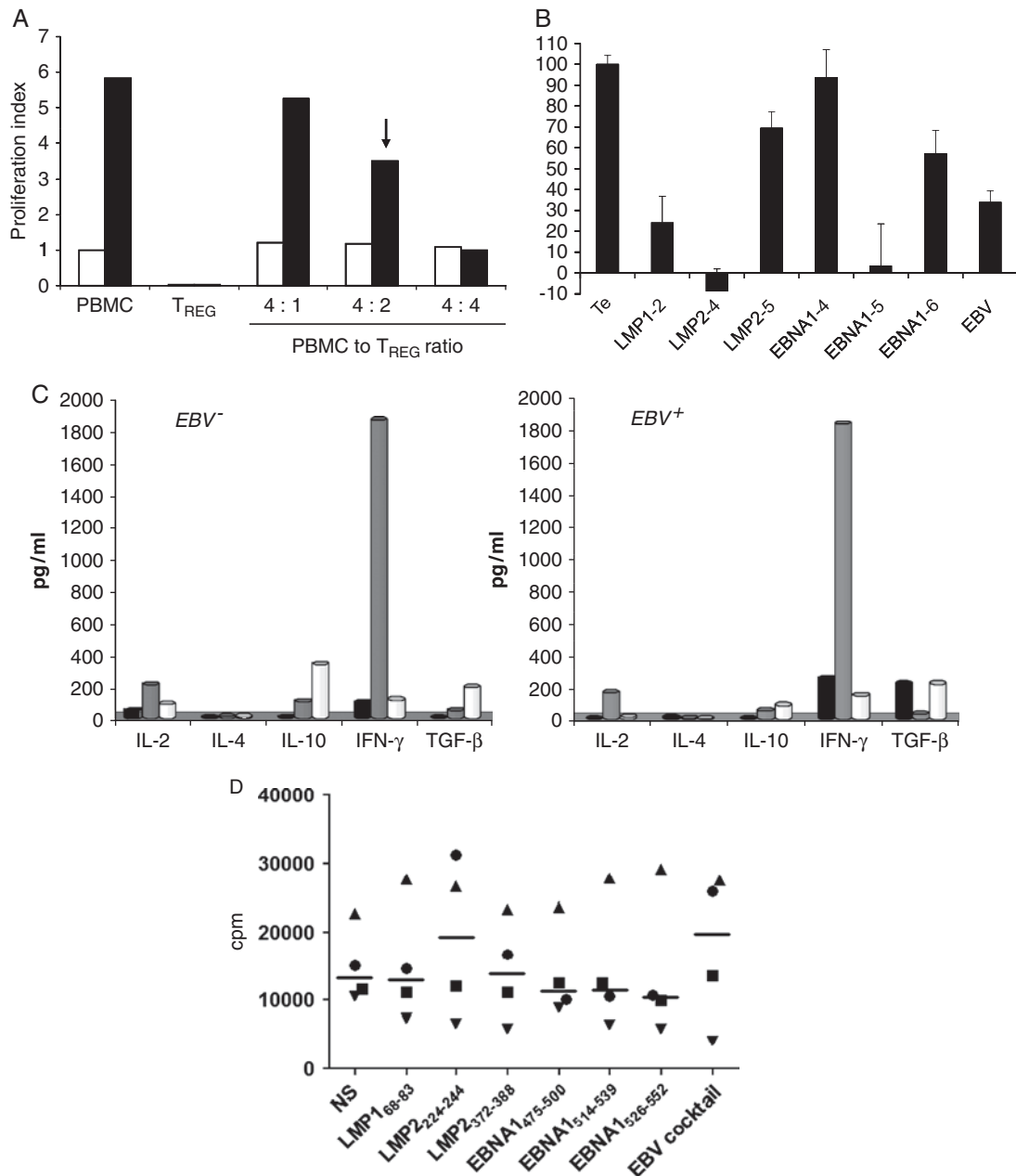


FIGURE 5. Functional analysis of regulatory T (T_{REG}) cells after peptide or Epstein-Barr virus (EBV) cocktail treatment. A, Sorted CD4⁺CD25⁺ T cells can suppress effector cell proliferation. PBMCs and T_{REG} cells were activated (■), or not (□), with anti-CD3 and anti-CD28 to assess their functional proliferative and anergic status, respectively. Stable number of stimulated PBMCs were then cultured with decreasing quantity of activated T_{REG} cells, and analyzed for immunosuppressive activity. Suppression get with the 4:2 PBMC:T_{REG} ratio, as indicated by the arrow, has been chosen as the optimal ratio for further experiments. B, Effect of each peptide or the EBV-peptide cocktail on suppressive activity of T_{REG} cells. T_{REG} cells (75×10^3 cells) were cocultured with autologous PBMCs (150×10^3 cells) for 48 hours in standard medium (NS) or in the presence of each peptide or EBV-peptide cocktail at 60 μ g/mL. Each bar represents the mean of 5 individual assays conducted in triplicates. Percentage of suppression was calculated and percentage of inhibition was expressed as a relative value of the standard condition as described in Materials and Methods section. C, Effect of the EBV-peptide cocktail on cytokine release of T_{REG} cells, PBMCs and their cocultivation. T_{REG} (black bars), autologous PBMCs (gray bars), and a mixed leukocyte reaction (white bars) of both cell types were cultured independently in 48-well plates (5×10^5 cells of each type per well) and stimulated with anti-CD3 (1.5 μ g/mL) and anti-CD28 (100 ng/mL) antibody under the indicated culture condition for 48 hours in standard medium (EBV⁻, left panel) or in the presence of EBV-peptide cocktail at 60 μ g/mL (EBV⁺, right panel). Supernatants were then harvested. Cytokine release was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay method. D, Effects of the peptides on T_{REG} cell proliferation. T_{REG} cells were expanded polyclonally with anti-CD3 (100 ng/mL) and anti-CD28 (100 ng/mL) antibody, high dose of interleukin (IL)2 (300 U/mL) and irradiated (4000 Gy) autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (2:1 ratio) for 48 hours in standard medium (NS) or in the presence of each peptide or EBV-peptide cocktail at 60 μ g/mL. Each symbol indicates the duplicate mean of different donors. Proliferation and suppression assays were determined by ³H-TdR uptake and estimate in cpm.

arrow). Figure 5C represents the relative inhibition of T_{REG} suppression on autologous activated PBMC, when stimulated with the cocktail or with each peptide. Without any stimulation, the 4:2 PBMC to T_{REG} ratio represents an average suppression of 25%–30%, which was reported here as 100%. Neither component of the cocktail nor the cocktail itself exceeds the nonstimulating control. Indeed, the relative suppression declines for all tested peptides and even inverse upon LMP2_{224–244} stimulation. This tendency is also observed with the use of the EBV-peptide cocktail, which seemed to decrease the suppression of nearly 50% (Fig. 5C).

Modification of T_{REG} activity has also been evaluated by analyzing their cytokine release profile. Compared with PBMC, T_{REG}, and MLR conditions in absence of EBV peptides, we did not observe any variation in the pattern of cytokine secretion after 48 hours of EBV-cocktail treatment, except for a weak decrease of the IL-10 secretion noted in the MLR wells (Fig. 5D).

DISCUSSION

Until now, more than 30 epitopes derived from the latency antigens have been identified.⁴⁷ However, responses to latency II antigens were least frequently described,^{26,27} in part due to a lack of interest in this field mainly focused on the significant CD8⁺ T-cell expansion during primary infection, the small size of the CD4 memory compartment, and obviously the paucity of defined CD4⁺ EBV epitopes.

In a previous work, we have developed an original approach to identify promiscuous sequences within the CD4⁺ T-cell epitopes of the EBV latency II antigens, and we proposed a peptide cocktail as a potential vaccine against EBV latency II malignancies.³⁹ In the present study, we have validated the specific effect of this peptide cocktail on CD4⁺ T cells and assessed the usefulness of all peptides, by confirming the strong Th1 cytokine profile developed after a single stimulation and until 12 days. The cytokine response was essentially governed by an early and sustained release of IFN- γ , induced at the same level either by the entire cocktail or by each individual peptide, suggesting a role of each peptide in the cocktail. In a potential perspective of therapeutic assays, this maintained secretion of IFN- γ in response to peptide vaccination could represent a major advantage in the monitoring of cancer vaccine trial.⁴⁸ This result was correlated with most of the studies that have analyzed establishment of the memory response to EBV infection, and particularly to the latency antigens, and have described this population as predominantly Th1 polarized with a broad IFN- γ secretion.^{29,39,49,50} In contrast, we observed no secretion of their antagonist Th2 or regulatory cytokine (IL-4, IL-10, TGF- β_1) within the time of peptide stimulation assay, confirming a strict Th1 orientation without favouring immunosuppressive environment.

We have generated specific T-cell lines and established that human CD4⁺ T cells were specifically activated by EBV peptide cocktail or by each individual peptide. All generated specific CD4⁺ T-cell lines (containing <1% of NK cells) naturally secrete significant amounts of IFN- γ in the quasi-absence of Th2 or regulatory cytokines, assessing their belonging to the Th1 type. In parallel, transcriptomic analysis has confirmed the induction of a Th1 response in terms of cytokine, cytokine receptors and chemokine receptors, specific signaling, and transcription factors. We have proved that each oligoclonal CD4⁺ T-cell lines were able to exert high cytotoxicity of autologous and heterologous LCL. By blocking

the recognition between our EBV-specific CD4⁺ cell lines and the EBV⁺ MHC class II⁺ target cell lines using a pan-class II antibody, we have observed loss of activity of the effectors cells, thus confirming their antigenic specificity (data not shown). CD4⁺ T cells recognizing autologous LCL cells have been detected in various *in vitro* settings, where effector cells were derived from either fetal cord blood EBV seronegative or seropositive donors,⁵¹ or from patients with infectious mononucleosis undergoing primary EBV infection.⁵² However, most of these studies did not search for reactivity against individual EBV antigens.

Assays performed in the presence of CMA clearly showed a significant decrease of cytotoxicity for each cell line that suggest a contribution of the perforin-granzyme pathways in this cellular-mediated cytotoxicity. It was in accordance with other types of CD4⁺ effectors that have been reported to use Fas/Fas-L-independent mechanisms of cytotoxicity including perforin/granzyme,^{32,50,53} granzyme,⁵⁴ or TNF-related apoptosis-inducing ligand.⁵⁵

However, as it remains a residual lytic activity after use of the CMA, we believe that several lysis pathways could coexist, including Fas/FasL pathway. We could not exclude this way of lysis, especially as we did not perform inhibition of this pathway, because of technical limitations. However, we observed (Fig. 2B) a slight increase in FasL gene expression which was more important after 12 days of incubation with the cocktail (data not shown). In addition, we have performed cytometric analysis, which clearly showed an increased expression of FasL in CD8-depleted PBMC after EBV-cocktail stimulation. Indeed, we observed after 15 days of activation, more than 2-fold increase of the percentage of CD4⁺ FasL⁺ upon EBV-cocktail stimulation versus an unspecific T-cell activation (data not shown). We have measured, by ELISPOT assays, the frequency of GrB-releasing cells within our specific cell line in front of autologous or heterologous cell lines, which express the EBV latency II or III genes program. We have concluded that EBV cocktail-specific cell lines were able to recognize all EBV-transformed cell lines, inducing a significant secretion of GrB. Furthermore, despite the HLA mismatch, we did not observe any difference of efficiency against autologous or heterologous LCLs. We observed that the number of SFC increased linearly with the amount of effector cells, suggesting that EBV-specific T-cell lines would be specific of antigens naturally processed and presented by targets cell lines. LMP1_{68–83}-specific and LMP2_{224–244}-specific cell lines only induced low level of GrB with all targets, although they were able to induce a strong cytotoxic effect on LCLs, suggesting that they could preferentially use another cytotoxic pathway, such as granzyme or TNFSF pathways. The higher GrB production obtained with 2 original models of EBV-transformed T-cell (NC5) and monocyte (TE1) cell lines expressing the latency II program^{40,41} showed a clearly specific recognition of our peptides in accordance with the hierarchy of immunodominance described elsewhere.⁴⁷ In conclusion, GrB ELISPOT assays suggested that this CD4⁺ cytotoxic activity could preferentially be linked to the granule lytic pathway even if other cytotoxic mechanisms could be involved.

All data presented in this study are lined up with several previous studies that have determined the Th1 profile such as the hallmark of CD4⁺ T-cell response upon latency II antigen treatment. Nevertheless, data exploring the link between immunosuppression and EBV in associated malignancies are accumulating,^{34,56–58} notably

with the qualification of tumor infiltrating lymphocytes enriched in T_{REG} cells and particularly those specific for latent antigen, as one way of immune evasion exemplified by presence of the virus.^{36,42,58–60} The main goal of immunotherapy is recruitment, development, and display of a specific effective response in the absence of regulatory response. But, in a preexisting immunosuppressive environment developed not only by tumor cells but also by the virus itself, increasing the CD4 population could increase the quantity of main T_{REG} cells lying in this lineage, favoring a dread immune escape.

Stimulation of naive precursors in human PBMC with an EBNA-1 peptide resulted in the generation of CD4⁺ T_{REG} to EBV in vitro,⁴² as well as in the context of the LMP-1-specific response, which is elsewhere described as mainly dominated by IL-10-secreting CD4⁺ T_{REG} cells.⁶⁰ So, it was very important to establish that our selected cocktail does not contain any T_{REG} cognate antigens that was a necessary step before developing any peptide-based immunotherapy in EBV-associated malignancies. We have demonstrated here that neither the use of the entire cocktail nor single peptides we have selected, affect the human T_{REG} cells in term of phenotype, suppressive activity, proliferative capacity, or cytokine release.

In conclusion, our peptide cocktail is recognized by human memory CD4⁺ T cells from individuals expressing various HLA II genotypes. Peptide-specific T-cell lines are able to induce specific lyses of EBV-transformed cell lines presenting latency II or latency III program. All together our results clearly showed that all the peptides need to be considered as an important part of the whole cocktail. Moreover, we have demonstrated that no regulatory CD4 T-cell activity could be observed in response to the peptide cocktail, avoiding any risk of aggravation of the preexisting immunosuppressive environment, still known in EBV⁺-associated malignancies. To our knowledge, no study in the field of immunotherapy has tried to develop assays determining safe use of their antigens with regard to immunosuppression, whereas CD4⁺ CD25⁺ T_{REG} cells are important mediators of active immune evasion in cancer. Therefore, our studies presented one optimal approach for generating protective immune cells with potential for emergency and routine clinical applications. This vaccine approach could be useful in patients with high risk of relapse after classical therapies, with the aim of controlling residual disease.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Mathieu Surenaud (Plateforme "Évaluation de la réponse immunitaire", INSERM U567–Institut Cochin, Paris) for its technical assistance in the reading of the ELISPOT assays, as well as Sylvain Delaroche and Dr Hélène Host (INSERM U761, Biostructures et découverte de médicament, Institut Pasteur de Lille) for their help and advice in the use of the homogeneous time resolved fluorescence reader.

CONFLICTS OF INTEREST/ FINANCIAL DISCLOSURES

Supported by grants from the ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer), the Ligue Régionale contre le Cancer and the GEFLUC (Groupement des Entreprises Françaises dans la lutte contre le Cancer).

All authors have declared there are no financial conflicts of interest in regards to this work.

REFERENCES

1. Niedobitek G, Young LS. Epstein-Barr virus persistence and virus-associated tumours. *Lancet*. 1994;343:333–335.
2. Gregory CD, Dive C, Henderson S, et al. Activation of Epstein-Barr virus latent genes protects human B cells from death by apoptosis. *Nature*. 1991;349:612–614.
3. Bochkarev A, Barwell JA, Pfuetzner RA, et al. Crystal structure of the DNA-binding domain of the Epstein-Barr virus origin-binding protein, EBNA1, bound to DNA. *Cell*. 1996;84:791–800.
4. Kaye KM, Izumi KM, Mosialos G, et al. The Epstein-Barr virus LMP1 cytoplasmic carboxy terminus is essential for B-lymphocyte transformation; fibroblast cocultivation complements a critical function within the terminal 155 residues. *J Virol*. 1995;69:675–683.
5. Wang D, Liebowitz D, Wang F, et al. Epstein-Barr virus latent infection membrane protein alters the human B-lymphocyte phenotype: deletion of the amino terminus abolishes activity. *J Virol*. 1988;62:4173–4184.
6. Uchida J, Yasui T, Takaoka-Shichijo Y, et al. Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science*. 1999;286:300–303.
7. Mosialos G, Birkenbach M, Yalamanchili R, et al. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell*. 1995;80:389–399.
8. Gires O, Kohlhuber F, Kilger E, et al. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J*. 1999;18:3064–3073.
9. Kieser A, Kaiser C, Hammerschmidt W. LMP1 signal transduction differs substantially from TNF receptor 1 signaling in the molecular functions of TRADD and TRAF2. *EMBO J*. 1999;18:2511–2521.
10. Kieser A, Kilger E, Gires O, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. *EMBO J*. 1997;16:6478–6485.
11. Fukuda M, Longnecker R. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A mediates transformation through constitutive activation of the Ras/P13-K/Akt Pathway. *J Virol*. 2007;81:9299–9306.
12. Pang MF, Lin KW, Peh SC. The signaling pathways of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A (LMP2A) in latency and cancer. *Cell Mol Biol Lett*. 2009;14:222–247.
13. Shi Y, Smith KD, Kurilla MG, et al. Cytotoxic CD8⁺ T cells recognize EBV antigen but poorly kill autologous EBV-infected B lymphoblasts: immunodominance is elicited by a peptide epitope that is presented at low levels in vitro. *J Immunol*. 1997;159:1844–1852.
14. Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature*. 1998;393:474–478.
15. Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, et al. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*. 1998;393:480–483.
16. Cardin RD, Brooks JW, Sarawar SR, et al. Progressive loss of CD8⁺ T cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in the absence of CD4⁺ T cells. *J Exp Med*. 1996;184:863–871.
17. Kalams SA, Walker BD. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med*. 1998;188:2199–2204.
18. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med*. 1998;188:2205–2213.
19. Rickinson AB, Moss DJ. Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:405–431.
20. Omiya R, Buteau C, Kobayashi H, et al. Inhibition of EBV-induced lymphoproliferation by CD4(+) T cells specific for an MHC class II promiscuous epitope. *J Immunol*. 2002;169:2172–2179.
21. Ostrand-Rosenberg S. CD4⁺ T lymphocytes: a critical component of antitumor immunity. *Cancer Invest*. 2005;23:413–419.

22. Wang RF. The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4⁺ T cells in antitumor immunity. *Trends Immunol.* 2001;22:269–276.
23. Dace DS, Chen PW, Alizadeh H, et al. Ocular immune privilege is circumvented by CD4⁺ T cells, leading to the rejection of intraocular tumors in an IFN- γ -dependent manner. *J Leukoc Biol.* 2007;81:421–429.
24. Jellison ER, Kim SK, Welsh RM. Cutting edge: MHC class II-restricted killing in vivo during viral infection. *J Immunol.* 2005;174:614–618.
25. May RJ, Dao T, Pinilla-Ibarz J, et al. Peptide epitopes from the Wilms' tumor 1 oncoprotein stimulate CD4⁺ and CD8⁺ T cells that recognize and kill human malignant mesothelioma tumor cells. *Clin Cancer Res.* 2007;13(15 part 1): 4547–4555.
26. Leen A, Meij P, Redchenko I, et al. Differential immunogenicity of Epstein-Barr virus latent-cycle proteins for human CD4⁺ T-helper 1 responses. *J Virol.* 2001;75:8649–8659.
27. Long HM, Haigh TA, Gudgeon NH, et al. CD4⁺ T-cell responses to Epstein-Barr virus (EBV) latent-cycle antigens and the recognition of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. *J Virol.* 2005;79:4896–4907.
28. Munz C, Bickham KL, Subklewe M, et al. Human CD4⁺ T lymphocytes consistently respond to the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA1. *J Exp Med.* 2000;191:1649–1660.
29. Steigerwald-Mullen P, Kurilla MG, Braciale TJ. Type 2 cytokines predominate in the human CD4⁺ T-lymphocyte response to Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *J Virol.* 2000;74:6748–6759.
30. Demachi-Okamura A, Ito Y, Akatsuka Y, et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 1-specific CD4⁺ T cells directly kill Epstein-Barr virus-carrying natural killer and T cells. *Cancer Sci.* 2008;99:1633–1642.
31. Khanna R, Burrows SR, Thomson SA, et al. Class I processing-defective Burkitt's lymphoma cells are recognized efficiently by CD4⁺ EBV-specific CTLs. *J Immunol.* 1997;158:3619–3625.
32. Paludan C, Bickham K, Nikiforow S, et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 1-specific CD4⁺ Th1 cells kill Burkitt's lymphoma cells. *J Immunol.* 2002;169:1593–1603.
33. Baumforth KR, Birgersdotter A, Reynolds GM, et al. Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells. *Am J Pathol.* 2008;173:195–204.
34. Lamprecht B, Kreher S, Anagnostopoulos I, et al. Aberrant expression of the Th2 cytokine IL-21 in Hodgkin lymphoma cells regulates STAT3 signaling and attracts Treg cells via regulation of MIP-3 α . *Blood.* 2008;112:3339–3347.
35. Lau KM, Cheng SH, Lo KW, et al. Increase in circulating Foxp3⁺ CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells in nasopharyngeal carcinoma patients. *Brit J Cancer.* 2007;96:617–622.
36. Marshall NA, Culligan DJ, Tighe J, et al. The relationships between Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and regulatory T cells in Hodgkin's lymphoma. *Exp Hematol.* 2007;35:596–604.
37. Pai S, O'Sullivan B, Abdul-Jabbar I, et al. Nasopharyngeal carcinoma-associated Epstein-Barr virus-encoded oncogene latent membrane protein 1 potentiates regulatory T-cell function. *Immunol Cell Biol.* 2007;85:370–377.
38. Takegawa S, Jin Z, Nakayama T, et al. Expression of CCL17 and CCL22 by latent membrane protein 1-positive tumor cells in age-related Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorder. *Cancer Sci.* 2008;99:296–302.
39. Depil S, Morales O, Castelli FA, et al. Determination of a HLA II promiscuous peptide cocktail as potential vaccine against EBV latency II malignancies. *J Immunother.* 2007;30:215–226.
40. Groux H, Cottrez F, Montpellier C, et al. Isolation and characterization of transformed human T-cell lines infected by Epstein-Barr virus. *Blood.* 1997;89:4521–4530.
41. Masy E, Adriaenssens E, Montpellier C, et al. Human monocytic cell lines transformed in vitro by Epstein-Barr virus display a type II latency and LMP-1-dependent proliferation. *J Virol.* 2002;76:6460–6472.
42. Voo KS, Peng G, Guo Z, et al. Functional characterization of EBV-encoded nuclear antigen 1-specific CD4⁺ helper and regulatory T cells elicited by in vitro peptide stimulation. *Cancer Res.* 2005;65:1577–1586.
43. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25:402–408.
44. Ding YH, Smith KJ, Garboczi DN, et al. Two human T cell receptors bind in a similar diagonal mode to the HLA-A2/Tax peptide complex using different TCR amino acids. *Immunity.* 1998;8:403–411.
45. Kataoka T, Shinohara N, Takayama H, et al. Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol.* 1996;156:3678–3686.
46. Hartigan-O'Connor DJ, Poon C, Sinclair E, et al. Human CD4⁺ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J Immunol Methods.* 2007;319:41–52.
47. Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, et al. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:587–617.
48. Han S, Huang Y, Liang Y, et al. Phenotype and functional evaluation of ex vivo generated antigen-specific immune effector cells with potential for therapeutic applications. *J Hematol Oncol.* 2009;2:34–49.
49. Bickham K, Munz C, Tsang ML, et al. EBNA1-specific CD4⁺ T cells in healthy carriers of Epstein-Barr virus are primarily Th1 in function. *J Clin Invest.* 2001;107:121–130.
50. Sun Q, Burton RL, Lucas KG. Cytokine production and cytolytic mechanism of CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes in ex vivo expanded therapeutic Epstein-Barr virus-specific T-cell cultures. *Blood.* 2002;99:3302–3309.
51. Wilson AD, Redchenko I, Williams NA, et al. CD4⁺ T cells inhibit growth of Epstein-Barr virus-transformed B cells through CD95-CD95 ligand-mediated apoptosis. *Int Immunol.* 1998;10:1149–1157.
52. Adhikary D, Behrends U, Boerschmann H, et al. Immuno-dominance of lytic cycle antigens in Epstein-Barr virus-specific CD4⁺ T cell preparations for therapy. *PLoS One.* 2007;2:e583.
53. Wilson AD, Hopkins JC, Morgan AJ. In vitro cytokine production and growth inhibition of lymphoblastoid cell lines by CD4⁺ T cells from Epstein-Barr virus (EBV) seropositive donors. *Clin Exp Immunol.* 2001;126:101–110.
54. Ochoa MT, Stenger S, Sieling PA, et al. T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. *Nat Med.* 2001;7:174–179.
55. Zhang Y, Chaux P, Stroobant V, et al. A MAGE-3 peptide presented by HLA-DR1 to CD4⁺ T cells that were isolated from a melanoma patient vaccinated with a MAGE-3 protein. *J Immunol.* 2003;171:219–225.
56. Barath S, Aleksza M, Keresztes K, et al. Immunoregulatory T cells in the peripheral blood of patients with Hodgkin's lymphoma. *Acta Haematol.* 2006;116:181–185.
57. Frisan T, Sjöberg J, Dolcetti R, et al. Local suppression of Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxicity in biopsies of EBV-positive Hodgkin's disease. *Blood.* 1995;86:1493–1501.
58. Marshall NA, Christie LE, Munro LR, et al. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2004;103: 1755–1762.
59. Gandhi MK, Lambley E, Duraiswamy J, et al. Expression of LAG-3 by tumor-infiltrating lymphocytes is coincident with the suppression of latent membrane antigen-specific CD8⁺ T-cell function in Hodgkin lymphoma patients. *Blood.* 2006;108:2280–2289.
60. Marshall NA, Vickers MA, Barker RN. Regulatory T cells secreting IL-10 dominate the immune response to EBV latent membrane protein 1. *J Immunol.* 2003;170:6183–6189.

ARTICLE 3

ARTICLE 3**Evaluation *in vitro* et *in vivo* d'une vaccination avec des peptides dérivés des antigènes de latence II du virus d'Epstein-Barr dans le Carcinome du Nasopharynx*****In vitro* and *In vivo* Evaluation of EBV latency II-derived peptides as Tumor Vaccine for Immunotherapy of Nasopharyngeal Carcinoma*****Manuscrit en Préparation***

Dhafer Mrizak, Rami Mustapha, Nathalie Martin, Hayet Rafa, Pedro Roman Puché, Fei Fei Liu, Toshiro Niki, Kwok-Wai Lo, Véronique Pancré, Yvan de Launoit, Pierre Busson, Olivier Morales* and Nadira Delhem*.

*Co-dernier auteur

Résumé

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est présent dans 100% des carcinomes nasopharyngés (CNP) indifférenciés et faiblement différenciés. De ce fait, les antigènes viraux associés à la tumeur sont des cibles potentielles pour l'immunothérapie. Dans cette étude, nous favorisons une approche d'immunothérapie basée sur la stimulation de la réponse des lymphocytes T CD4+ spécifiques des antigènes d'EBV tout en prenant en compte le fait que les cellules de CNP sécrètent des quantités importantes d'exosomes immunorégulateurs capables notamment d'induire l'apoptose de cellules T CD4+ de type Th1.

Les TCD4+ ont été isolés à partir de PBMC humains et des lignées TCD4+ spécifiques d'EBV ont été générées par présentation répétées d'un cocktail de peptides dérivés des antigènes de latence II d'EBV. Les lymphocytes TCD4+ et les lignées TCD4+ spécifiques du cocktail EBV ont été cultivées en présence de doses croissantes d'exosomes tumoraux de CNP. Ces exosomes sont issus de tumeurs de CNP xenotransplantées dans des souris SCID et purifiés sur gradient de sucrose. Nous avons alors réalisé des tests de (i) proliférations par mesure de l'incorporation de [méthyl-³H]-thymidine, (ii) de cytotoxicité cellulaire par mesure de lyse de divers lignées de CNP et (iii) de sécrétion de cytokines par ELISA. L'efficacité de la vaccination peptidique a également été mesurée dans un modèle de souris SCID xenotransplantées avec une lignée de CNP (C666-luc), et reconstituées avec des PBMCs humains. L'évolution tumorale a été évaluée à la fois par estimation du volume tumoral et la mesure de la bioluminescence émise par les cellules de C666-luc.

Nous avons préalablement sélectionné et assemblé 3 peptides dérivés des antigènes de latence II d'EBV ayant une très grande capacité à se fixer à divers molécules de CMH de classe II. Nous montrons ici que tous les peptides du cocktail sont reconnus par les PBMCs humains et induisent une sécrétion significative d'IFN γ notamment après incubation avec des cellules de CNP. De plus, les lignées T CD4+ spécifiques du cocktail ont été générées et leur potentiel cytolytique a été confirmé par la lyse effective de divers lignées de CNP, et ce même en présence d'exosomes autologues. Nous rapportons également, pour la première fois, la capacité de ce cocktail à maîtriser la croissance tumorale dans un modèle original de souris SCID humanisée xenotransplantée par une lignée CNP.

Nos données suggèrent donc que ces antigènes de latence II dérivés d'EBV pourraient être utilisés dans un vaccin anti-tumoral pour le développement d'immunothérapie active du CNP ; principalement chez les patients réfractaires aux traitements conventionnels ou encore pour combattre la maladie résiduelle ou prévenir les rechute chez les patients de hauts risques après les traitements classiques.

Contexte et objectifs de l'étude :

Le virus d'Epstein Barr (EBV) est impliqué dans différentes pathologies tumorales, selon le profil de latence exprimé. La latence de type II d'EBV est notamment associée au carcinome indifférencié du nasopharynx (CNP). De nombreux arguments suggèrent que les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle primordial dans le contrôle de ces tumeurs. C'est pourquoi, l'équipe a privilégié une approche basée sur la stimulation d'une réponse T CD4 spécifique. Le logiciel de prédiction TEPITOPE leur a permis de définir 6 peptides *promiscuous* dérivés des antigènes de la latence II d'EBV. L'équipe a déjà montré que ces peptides étaient capables d'induire une forte réponse CD4⁺ cytotoxique de type Th1. Cependant, une étude récente réalisée par P. Busson a montré que les cellules de CNP sécrétaient des quantités importantes d'exosomes contenant la galectine-9, un ligand du récepteur membranaire Tim-3 capable d'induire l'apoptose dans les lymphocytes CD4⁺ Th1 matures. Dans ce contexte, on peut supposer que ces exosomes tumoraux pourraient être un obstacle potentiel à l'utilisation du cocktail peptidique.

Dans ce contexte, les principaux objectifs de cette étude ont consisté à (i) explorer les moyens de favoriser l'expansion et l'efficacité des effecteurs anti-tumoraux, notamment des lymphocytes CD4⁺ Th1 anti-EBV et (ii) d'évaluer l'impact des exosomes dans la stratégie vaccinale proposée.

Méthodologie :

Pour se faire, les lymphocytes T CD4⁺ sont isolés à partir de PBMC humains et les lignées T CD4⁺ spécifiques d'EBV sont générées par présentations répétées des peptides EBV. A la fois les T CD4⁺ et les lignées T CD4⁺ spécifiques des peptides EBV, sont mis en culture avec des doses croissantes d'exosomes tumoraux de CNP. Ces exomes sont isolés d'un CNP xenotransplanté dans une souris immunodéficiente et purifiés sur gradient de sucrose. (i) Les analyses de prolifération sont faites par mesure de l'incorporation de thymidine 3H, (ii) les tests de cytotoxicité sont faits par mesure de la lyse des cellules de CNP (Cytotox Glow) et (iii) la sécrétion des cytokines est évaluée par ELISA.

Et enfin, l'efficacité *in vivo* des peptides a été appréciée par la mise en place d'un modèle murin immunodéficient (SCID), xénotransplanté par des cellules de CNP (C666.1-Luc) et reconstitué par des cellules immunitaires humaines (PBMC). L'évolution du volume tumoral a pu être apprécié, d'une part, par la mesure manuelle du volume de la tumeur et d'autre part par la mesure de la bioluminescence émise par les cellules de CNP-Luc.

Principaux résultats :

Les exosomes que nous avons obtenus ont les caractéristiques phénotypique attendus, à la fois par la taille et par l'expression des marqueurs spécifiques des exosomes comme LMP-1, Gal9, CD63.... Ils sont fonctionnellement actifs dans la mesure où ils sont capables de diminuer la prolifération des T CD4⁺ et des PBMC humains. Nous avons validé *in vitro* l'immunogénicité des peptides EBV sur des PBMC pré-cultivées avec des cellules de CNP (C15). Dans ce contexte tumoral, les peptides sont toujours capables d'induire la prolifération des PBMC et la production d'IFN γ : cytokine principalement produite dans un contexte anti-tumorale.

Les résultats que nous avons obtenus montrent également que les lignées T CD4⁺ spécifiques d'EBV induisent une lyse spécifique des cellules de CNP EBV positives. Et, de façon inattendue, la présence des exosomes tumoraux ou de la galéctine 9 recombinante, ne semble pas altérer les capacités de lyse, ni la prolifération de ces lignées EBV- spécifiques. Alors que les lignées sont sensibles à l'immunosuppression induites par la ciclosporine A, une drogue immunosuppressive utilisée en transplantation d'organes.

Et enfin, nous avons pu valider l'efficacité des peptides dans un modèle *in vivo*. En effet, nous avons évalué l'effet anti-tumoral de la vaccination par les peptides EBV par 2 approches, d'une part en mesurant manuellement l'évolution du volume tumorale et d'autre part en mesurant la bioluminescence émise par les cellules tumorales de CNP (C666.1-Luc). Par ces 2 approches, nous montrons que la reconstitution immunitaire de la souris SCID-CNP, couplée à la vaccination peptidique (+ 2 rappels) permet au volume de la tumeur d'être stabilisé au cours du temps.

Conclusion :

En conclusion, l'ensemble de nos résultats permet de consolider l'hypothèse selon laquelle les six peptides EBV, pourraient être utilisés chez les personnes atteintes d'un carcinome du nasopharynx. L'objectif principal n'est pas de remplacer les protocoles et les thérapies utilisés à ce jour, mais d'arriver en complément des protocoles thérapeutiques standards. Ces peptides vaccinaux pourraient être utilisés chez les patients réfractaires, combattre la maladie résiduelle, mais aussi être utilisés chez les patients présentant des rechutes, malheureusement très fréquentes et très agressives dans le CNP.

***In vitro* and *In vivo* Evaluation of EBV latency II-derived peptides as Tumor Vaccine for Immunotherapy of Nasopharyngeal Carcinoma**

Dhafer Mrizak (1), Rami Mustapha (1), Nathalie Martin (1), Hayet Rafa (2), Pedro Roman Puché (1), Fei Fei Liu (3), Toshiro Niki (4,5), Kwok-Wai Lo (6), Véronique Pancré (1), Yvan de Launoit (1), Pierre Busson (7), Olivier Morales* (1) and Nadira Delhem* (1,8).

*Equally contributed authors

Running Title: EBV-Peptide Immunotherapy in NPC

Affiliations of authors:

- (1) CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, Université Lille-Nord de France, Institut Pasteur de Lille, IFR 142, 59021 Lille cedex, France.
- (2) Laboratory of Cellular and Molecular Biology (LBCM), Faculty of Biological Science, USTHB, Algiers, Algeria.
- (3) Ontario Cancer Institute 610 University Avenue, Toronto, Ontario M5G 2M9, Canada
- (4) GalPharma Co., Ltd. 884-3-302, Fuseishi-Cho, Takamatsu-shi, Kagawa 761-8071 Japan.
- (5) Department of Immunology, Kagawa University. 1750-1 Ikenobe, Miki-Cho, Kagawa 761-0793 Japan
- (6) Department of Anatomical & Cellular Pathology, Faculty of Medicine. The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong SAR.
- (7) CNRS UMR 8126, Equipe "Microenvironnement tumoral, exosomes et microARN dans les tumeurs solides", Institut Gustave Roussy, Villejuif, France
- (8) UFR de Biologie Université des Sciences et Technologies de Lille, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

Key Words: EBV, CNP, Peptides, Immunotherapy, SCID

Correspondence to:

Nadira Delhem, PhD

Institut de Biologie de Lille

1 rue du Professeur Calmette, 59021 Lille Cedex

Phone : +33 3 20 87 12 53

Fax : +33 3 20 87 10 19

Email: nadira.delhem@ibl.fr

ABSTRACT

Background: Epstein-Barr virus (EBV) is constantly present in undifferentiated and poorly-differentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC). Thus, tumour-associated viral antigens are potential targets for immunotherapy. In this study, we favoured an approach of immunotherapy based on the stimulation of a CD4⁺ T cell response specific of EBV antigens, while taking into account that NPC cells secrete large amounts of exosomes capable of inducing apoptosis of CD4⁺ Th1 cells.

Methods: CD4⁺ T cells were isolated from human PBMC and CD4⁺ T cell lines specific for EBV are generated by repeated presentations of EBV peptides. Both the CD4⁺ and EBV-specific CD4⁺ T cell lines, were cultured with increasing doses of tumoral exosomes. These exosomes are isolated from xenotransplanted NPC in immunodeficient mice and purified on sucrose gradient. We performed (i) proliferation assays by measuring the ³H-thymidine incorporation (ii) cytotoxicity tests by measuring the NPC cells lysis and (iii) cytokine secretion by ELISA. The efficacy of peptides vaccination was assessed in an immunodeficient SCID mice model xenotransplanted with NPC cell lines (C666.1 -Luc), and reconstituted with human PBMC. The evolution of the tumor have been appreciated, both by measuring the tumor volume and the bioluminescence emitted by CNP-Luc cells.

Results: We have previously selected 6 peptides derived from the 3 EBV latency II antigens, with a highly promiscuous capability of binding on HLA II molecules. We show here that all these peptides used in cocktail are recognized by human PBMC, even after pre-incubation with NPC cell lines, inducing a broad IFN γ cytokine secretion. Furthermore, peptide-specific CD4⁺ T cell lines have been generated, and their cytotoxic potential assessed by lysing different NPC cell lines, even in the presence of autologous exosomes. We also report for the first time the ability of the cocktail to restrain tumor growth in an original NPC xenotransplant humanized SCID mice.

Conclusion: Our data clearly suggest that EBV latency II-derived peptides could be used as tumor vaccine for immunotherapy of nasopharyngeal carcinoma, mainly in refractory patients or to combat residual disease and prevent relapse in high risk patients after classical treatments.

INTRODUCTION

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is an epithelial neoplasm that occurs at low frequency worldwide (<1 case per 10^5 individuals/year), but is a 100 fold more frequent in South-East Asia, North Africa and Alaska (30–80 cases per 10^5 individual/year in Southern China) [1]. However, this disease is endemic in southern China and Hong Kong, where incidence rates ranging from 15 to 50 per 100.000 have been reported [2]. An intermediate incidence is seen in Alaska, Greenland, North Africa and the Mediterranean basin. In Tunisia, NPC is the most frequent head and neck cancer, with an age-adjusted incidence of 4.7 per 100.000 in men and 0.9 per 100.000 in women in the Southern region [3]. In addition, the regular detection of Epstein Barr virus (EBV) in the malignant cells of virtually all cases of NPC Type II and Type III [4] suggests that the virus is a determinant factor in oncogenesis.

EBV is a γ -herpes virus that causes asymptomatic life-long persistent infections in $>90\%$ of adults worldwide. EBV infects resting B cells in the oropharynx either directly or via epithelial cells [5]. Primary infection occurring early in life is usually asymptomatic, while in adolescents or young adults it can lead to infectious mononucleosis [6]. EBV is also associated with several malignancies worldwide ranging from gastric (GC) and nasopharyngeal carcinoma (NPC), about 98 900 and 84 000 cases per year respectively, to Hodgkin (HL) and Burkitt lymphomas (BL) with about 28 000 and 7 000 cases each year respectively [7]. EBV is also associated with post-transplant lymphoproliferative disorders occurring in severely immunocompromised individuals by solid organ or stem cell transplantation, congenital immunodeficiency or HIV infection [8-10]. All those malignancies can be distinguished according the set of EBV latency antigens expressed within tumor cells. Among these genes, Epstein Barr Nuclear Antigen (EBNA)-1, Latency Membrane Protein (LMP)-1 and LMP-2, the hallmark of the EBV latency-2 program, are known to play a key

role not only in EBV latency but also in EBV associated malignancies as they allow infected cells to transform, proliferate and resist to apoptosis [11-13].

Radiotherapy is the traditional treatment of non metastatic NPC, achieving local control in 50–90% of cases [14]. Recently, on the basis of randomised trials [15-18] confirmed by two meta-analysis [19,20], concurrent platinum-based chemo- radiotherapy became the new standard of care, especially in patients with T3–T4 primary tumours and/or lymph node involvement (N1–N2–N3) [21]. Despite improvements in therapeutic results, local regional failure and distant metastasis are still occurring in a significant number of patients. Moreover, radiotherapy and chemotherapy often result in both acute side effects and long-term sequelae, with the latter being even more severe in younger patients [22]. Therefore, it seems necessary to develop novel approaches, with the aim of improving outcome for refractory disease and, eventually, deescalating conventional cytotoxic therapies. There is now compelling evidence that cytotoxic T lymphocytes- based immunotherapy is effective in another entity of EBV-linked malignancies, namely post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) [23-25]. Our team had recently developed a strategy which allows the definition and selection of CD4+ “promiscuous” peptides [26], and their immunogenicity was tested in the EBV tumor model; Hodgkin Lymphoma [27]. Our results had clearly indicated that the peptide cocktail we developed was able to activate CD4+ efficient cells into a Th1 protective response. After further investigation, we were also able to ensure that this peptide cocktail was able to activate CD4+ T cells that can target and lyses EBV+ latency-2 or -3 cells lines without modifying neither the phenotype nor the function of CD4+ regulatory T cells [28].

These promising results encouraged us to develop similar strategies for other EBV-positive tumours, such as NPC. Hence, in this present study, we confirm the immunogenicity of the peptide cocktail in front of T cells pre-conditioned with NPC cell lines, and the ability

of EBV-specific CD4⁺ T cell lines to lyse different NPC cell lines, even in the presence of autologous exosomes. We also report for the first time the ability of the cocktail to restrain tumor growth in an original humanized SCID (Severe combined Immunodeficiency) mouse model. All together our results strongly nominate our EBV peptide cocktail as a good vector for the development of immunotherapeutic strategies against NPC.

CONFIDENTIEL

MATERIALS AND METHODS

Synthetic Peptides

As previously described [29], we used TEPITOPE, a T-cell epitope prediction software that allows the identification of HLA-DR-binding ligands [30, 31] to detect peptides containing HLA class II-restricted epitopes within the sequences of the EBV latency II antigens: EBNA1 (NCBI accession number NP_039875), LMP1 (CAA26023) and LMP2 (AAA45887). Peptides corresponding to the predicted sequence were synthesized using standard Fmoc chemistry by Neosystem (Strasbourg, France). Their purity was approximately 90% as indicated by analytical high-performance liquid chromatography. The synthesized peptides were submitted to HLA-DR and HLA-DP4 specific-binding assays, and separated out into active and inactive peptides. Six peptides were selected according to their highly promiscuous capacity (active for more than 7 HLA II molecules): 1 derived from LMP1 (LMP1₆₈₋₈₃) was called *LMP1-2*, 2 derived from LMP2 (LMP2₂₂₄₋₂₄₄ and LMP2₃₇₂₋₃₈₈) were called *LMP2-4* and *LMP2-5*, and finally 3 derived from EBNA1 (EBNA1₄₇₅₋₅₀₀, EBNA1₅₁₄₋₅₃₉, EBNA1₅₂₆₋₅₅₂) were called *EBNA1-4*, *-5* and *-6* respectively. These 6 peptides were used alone or combined in a peptide cocktail containing the same quantity of each peptide called *EBV-cocktail*.

Donors, Cell lines and Culture conditions

Donor's cells

Cells from healthy donors were isolated from blood provided by the Etablissement Français du Sang – Nord de France (EFS), in accordance with the official ethics agreement between the latter and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) – Délégation Nord Pas-de-Calais et Picardie. The study was approved by the Institut de Biologie de Lille (CNRS) and EFS Institutional Review Boards, and informed consent was obtained in writing from each donor.

Cells were isolated from NPC patient's blood provided by the Maillot Hospital (Alger, Algeria), in accordance with the Institutional Review Board of the hospital. All these donors gave informed written consent before the sampling procedure according to the Huriet Law.

NPC Target cell-lines

The C15, C17 and C666-1-luc tumor cell lines are derived from EBV-positive xenotransplanted NPC and continuously propagated in SCID mice subcutaneously every 4-6 weeks. All animal procedures were performed by certified personnel, in accordance with French and European regulations in the pet of the "Institut Pasteur de Lille" (France). The CNE1 tumor cell lines are derived from EBV-negative NPC and were kindly provided by Dr Pierre Busson. CNE1 cells were cultured in standard medium culture described below.

Cell culture conditions

RPMI 1640 medium (Invitrogen, Paisley, UK) supplemented with 10% human AB serum (BioWest, Nuaille, France) for donor's cells or 10% fetal calf serum (GIBCO, Invitrogen) for NPC target cell lines, 2 mM L-Glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM non essential amino acids, 10 mM HEPES, 50 U/mL streptomycin, 50 µg/mL gentamycin and 50 µM β-mercaptoethanol was used as standard culture medium. Cells were incubated at 37°C under controlled atmosphere (5% CO₂ and 95% humidity) in a Hera Cell 150 incubator (Thermo Electron, Cergy Pontoise, France). When appropriate, PBMCs were activated using PHA (5µg/mL). For CD4⁺ T cells activation, anti-CD3 (1,5 µg/mL) (Clinisciences, Montrouge, France) antibody was plate-bound by a 2 hours incubation at 37°C before cultivation and soluble anti-CD28 antibody (100 ng/mL) (Clinisciences) was added extemporaneously.

Generation of EBV-cocktail or single peptide specific cell-lines

CD4⁺ T-cell lines were generated according a protocol adapted from Voo (72). Briefly, CD8-depleted PBMCs were stimulated in-vitro in the standard culture medium supplemented with

10% human AB serum at 2.10^5 cells per well in a flat-bottomed 96-well plate with or without the presence of either EBV-peptide cocktail as a whole or only one of the peptides at 60 µg/mL. On days 7 and 14, cells were restimulated with autologous gamma-irradiated (5 000 rad) PBMCs pulsed with the same peptide or the EBV-cocktail. On day 8 and 15, 300 U/mL of Interleukin (IL)-2 (Peprotech) were added to the cultures. On day 19, all wells showing marked T-cell growth were tested for peptide-specific reactivity using autologous LCLs or autologous PBMCs pulsed for 2 hours with the cognate peptide and/or the cocktail, or with a non related one (20 µg/mL). The peptide-specific cell lines were considered positive as they released large amount of interferon (IFN)- γ and low amount of IL-10 after ELISA assay as described below, in a target dependant way.

Human Immune Cells Isolation

PBMC isolation

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) from healthy donors were isolated by standard density gradient centrifugation using Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden).

CD4+ T cell isolation

CD4+ T cells were isolated from PBMCs using a negative selection protocol according to manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Berlin, Germany). Briefly, PBMCs are incubated for 10 minutes with a cocktail of biotinylated antibodies directed against CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ and glycophorin A. Anti-biotin magnetic beads are then added for 15 minutes. Undesired cells are magnetically retained in a Magnetic-Activated Cell-Sorting (MACS[®]) column placed in a MACS[®] separator. The target cells pass through the column and are collected as the enriched, unlabeled, cell fraction, depleted of non-target cells. Flow cytometric analysis shows that more than 98% of the isolated cells are CD4+ cells.

Flow Cytometric Analysis

Cell immunophenotype was analysed by flow cytometry using FACSCalibur flow cytometer powered by CellQuest Pro software. After their harvest, cells were washed with Phosphate-Buffered Saline (PBS) (GIBCO-Life technologies) and labeled with fluochrome-conjugated mAbs. For each assay, the appropriate isotypic control mAbs were used for markers setting. Finally, data were analysed with FlowJo software. Results were expressed as normalized values compared with non treated condition.

MAbs anti-human -CD4-fluorescein isothiocyanate (FITC), -CD25-FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA), -CD25-PE (Miltenyi Biotech, Germany), -CD127-FITC or -CD127-PE (Clinisciences, Montrouge, France), -CD8-PE (Beckman Coulter, USA), -CD20-PE, -CD16-FITC and CD56-PE ((BD Pharmingen, San Diego, CA) were used for detection of cell surface antigens.

The blood from each mouse was also collected by retro-orbital sampling at D8 and D28 and analyzed by flow cytometry using FACSCalibur flow cytometer (CA, USA). The cell populations followed were: CD4 +, T CD8 +, regulatory T cells, B cells and NK.

Cell Proliferation Assay

10^5 cells (PBMC, CD8+ depleted PBMC, CD4+ T cells or EBV-specific CD4+ T cell lines) were incubated with [methyl- ^3H]-thymidine during the last 18 hours of culture and harvested on fiber glass filter (Printed Filtermat A, Wallac, Turku, Finland) using Tomtec harvester (Wallac). The filter was then sealed in a sample bag after drying and addition of scintillation liquid (Beckman Coulter). Proliferation was measured after [^3H]thymidine (1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$) (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) incubation for the last 18 hours before harvesting. Radioactivity was determined using a β -counter (1450 Trilux, Wallac, Finland). Each proliferation assay was carried out in triplicate and estimated in count per minute (cpm) and

results were normalized and compared to non-stimulated condition (NS). Some proliferation assays were also performed in the presence of the short form of recombinant Gal-9 (Gal-9S) at 1µg/mL kindly provided by Dr Toshiro Niki (Galpharma, Japan).

Cytokine Detection (ELISA)

Five hundred thousand PBMC were pre-incubated for 58 day with C15 cells and then cultured with or without EBV specific peptide cocktail for 72 or 144h in standard culture medium supplemented with 10% human AB serum, in a 48-well plate. Cells were activated with plate bound anti-CD3 (1.5µg/mL) mAb, incubated at 37°C for 2 h before the culture and soluble anti-CD28 (100 ng/mL) mAb (Clinisciences) added at the time of the culture assay. Supernatants were tested for IFN-γ cytokine production by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) as previously described (32). Results were expressed as the mean of duplicate wells after subtraction of the background.

Cytotoxicity Assays

Effector (E) EBV-specific CD4⁺ T-cell lines as described above were added to target (T) NPC cell lines at known E:T ratios in a 6 hour assay. Cell lysis was assessed using CytoTox-Glo Cytotoxicity assay according to manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI, USA). This assay evaluates the leak of a cellular marker from the cytoplasm of lysed cells to the culture medium in the presence or not of NPC-derived exosomes (10µg/mL). Data was obtained using Centro LB 960 plate luminometer (Berthold, Thoiry, France) powered by MikroWin 2000 Software. Results are expressed in percentage of specific lysis as means of triplicate wells.

Exosomes Isolation

EBV-positive NPC tumor cell lines (C15 and C666-1) were xenografted and permanently propagated by subcutaneous passage in SCID mice as previously described (33). In

accordance with institutional guidelines, homozygous CB-17 scid/scid (SCID) mice derived from breeding stocks provided by J.P Decavel (Institut Pasteur de Lille: IPL), were housed under specific pathogen-free conditions at the animal facility of IPL (Lille, France). Exosomes from the culture media of C15 and C666-1 xenografts were obtained as previously described [33].

Electron Microscopy

C15 exosomes were diluted (1/10) in PBS and placed on a formvar-coated 200 copper mesh grids which were rinsed in distilled water, contrasted with 2% phosphotungstic acid (PTA) in distilled water for 1min, and dried over a paper towel. Images were obtained with a Hitachi H7500 transmission electron microscope (TEM) equipped with a wide-field 1024x1024-pixel digital camera from AMT Advantage HR (Elexience, France).

Western Blot Analysis

Exosomes were lysed (10 min on ice) in PY buffer consisting of 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.02% sodium azide and a cocktail of proteases inhibitors (Roche, Basel, Switzerland). After centrifugation (20,000 g, 15 min, +4°C), cellular debris was removed and supernatants were collected. Protein concentrations were measured using Bio-Rad Protein Assay according to manufacturer's instructions (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Exosomes were then analyzed by Western blotting. Briefly, proteins were separated by SDS-PAGE electrophoresis using gradient pre-casts gels (4-12% gradient, Bis-Tris, Invitrogen) in standard conditions except when planning detection of CD63, which required non-reducing conditions. Then proteins were transferred on nitrocellulose membranes (HybondTM-C Extra, Amersham Biosciences, UK). The latter was blocked for 1 hour at room temperature in blocking buffer containing 0.2% AuroraTM blocking reagent (MP Biomedicals, Illkirch Graffenstaden, France), 0.1% Tween20 (Sigma-Aldrich) and PBS (1X),

and incubated overnight at 4°C with primary antibodies directed against : Grp94 1:1000 (ADI-SPA-850-F, Enzo Life Sciences), HLA-Dra 1:1000 (sc-53449, Santa Cruz Biotechnology), CD63 1:1000 (ab59479, Abcam, UK), LMP1 1:4 (S12 hybridoma), Galectin-9-CT-L1 1:100 (was kindly provided by Galpharma, Japan). Membranes were washed with blocking buffer, then incubated for 1 hour at room temperature with peroxidase-conjugated secondary antibodies (anti-mouse or anti-rat or anti-rabbit, 1:10000) (GE Healthcare, Wauwatosa, USA) and washed again with blocking buffer. Specific protein signals were visualized using Western Lightning® Plus-ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate kit (PerkinElmer, Boston, MA, USA) and read in Luminescent Image Analyser LAS3000 (Fujifilm).

Humanized SCID Mice Model of NPC

Anesthetized SCID mice were previously splenectomised and then subcutaneously xenotransplanted (7 days later) with NPC tumors induced by C666-1-Luciferase cells (C666-1-Luc). The C666-1-Luc is an EBV-positive human nasopharyngeal cancer cell line expressing the EBV latency II proteins and the luciferase gene [34]. This NPC cell line has been obtained from a subclone of xenotransplanted human tumor from south China. The protocol was approved by the local Ethical Committee of the IPL performed with required permission and approval of the regional governing ethical board (approval number CEEA 152010). At the time of xenotransplantation, mice were reconstituted or not by intraperitoneal injection of $20 \cdot 10^6$ PBMCs isolated from healthy donor blood. At the same time, the mice also received or not, sub-cutaneous injection of 120 µg of EBV peptides (20µg of each peptide), with or without chemical Montanide adjuvant (ISA 720 VG Montanide TM, SEPPIC, France). Two recalls vaccine were performed on day 8 and 21 and the animals were sacrificed on day 25 for subsequent analysis.

Measurements and Data Analysis

Measurements of tumor bioluminescence were acquired at different times: day 1, 3, 8, 11, 15, 21, 23 and 25 to monitor tumor growth. It is a chemical reaction that involves the oxidation of luciferin substrate of the enzyme luciferase expressed by the C666-1-Luc (100 μ L luciferin injected i.p into each mouse before analysis). The IVIS-Lumina XR® (Caliper, Life Sciences, MA, USA) was used to measure the bioluminescence. Images were then analyzed under the Living Image 4.1 software (Caliper Life Sciences). Moreover, the tumor length and width were measured with manual caliper at day 18, 23 and 25 and the tumor volumes were then determined by considering that they have an ellipse form (X, Y and Z axis, with X = length, Y and Z = width), thus establishing the same value for Y and Z. The following formula was used: *Volume of the Tumor* = $4/3 * \pi * X * Y * Z$.

Statistical Analyses

SigmaStat software was used for data treatment and statistical analysis. All quoted *P*-values are two-sided, with $P < 0.01$ (*or # or □) and $P < 0.001$ (**or ## or □) being considered statistically significant and highly significant respectively.

RESULTS

Sustained PBMC activation by EBV latency II-derived peptides

First of all, the immunogenicity of the EBV peptide cocktail was studied in the context of tumor cells. This was achieved by examining the effect of the cocktail on the proliferation of PBMCs previously co-cultured with the C15 EBV-positive NPC tumor cell line for 5 days. The results clearly show that stimulation by the peptide cocktail induces a significant increase in the proliferation of these pre-conditioned PBMCs by 2.5 and 2 folds at 72 and 144 hours respectively. Furthermore, no significant difference was observed when comparing between the cocktail induced increase of proliferation in PBMCs without C15 contact to PBMCs post C15 contact (Fig. 1A). Moreover, the immunogenic effect of the cocktail was further demonstrated in the same tumoral context by studying its ability to induce IFN- γ secretion in pre-conditioned PBMCs. ELISA analysis shows a significantly higher production of IFN- γ in cocktail stimulated pre-conditioned PBMCs having an average of 35 and 22 pg/ml at 72 and 144 hours respectively than in non-stimulated pre-conditioned PBMCs with an average value of 5 pg/ml at the same time points (Fig. 1B).

Taken together, these results clearly validate the immunogenicity of the peptide cocktail even in a tumoral context.

Cytotoxic activity of the EBV-specific CD4⁺ T cell lines against NPC cell targets

As a following step, we investigated the ability of generated EBV-specific CD4⁺ T cell lines (effector) to induce the lysis of various NPC cell lines (targets). A comparison of the induced lysis of 3 different EBV positive target cell lines (C15, C666-1, C17) to an EBV negative target (CNE1) at increasing effector to target ratios revealed a ratio dependent induction of lysis which was more potent in the EBV positive cell lines than in the EBV negative one.

Regarding the C15 cell line, compared to the CNE1 cell line, a significant or highly significant increase in induced lysis was observed at all tested effector to target ratios; with this increase ranging from 10%; at an 0.312 to 1 ratio; to 30% at a ratio of 20 to 1. Similarly with the C666-1 cell line, a significant or highly significant increase in induced lysis ranging from 15% to 40% was observed at effector to target ratios ranging from 1.25 to 1 up to 20 to 1. Finally with the C17 cell line again a significant increase in induced lysis was observed this time ranging from 17% to 45% between the ratios of 2.5 to 1 and 10 to 1 (Fig. 2A). Results are represented in percentage of specific lysis.

Insofar as the C666-1 cells were used in the animal model of NPC, they were chosen to test whether the cocktail of EBV proteins as a whole was necessary to obtain the desired potency of CD4⁺ induced lysis or whether a specific protein of this cocktail would be sufficient. To that end, seven CD4⁺ T cell lines (effectors) were produced each specific to one EBV peptide. Induced lysis of the C666-1 line (target) was studied in a similar approach to the previous experiment with increasing effector to target ratios. The results clearly shows that at a ratio of 1.25 to 1 and above the EBV “whole” specific CD4⁺ cells were clearly more potent in inducing lysis of the NPC cell line than each of the single peptide specific CD4⁺ lines (Fig. 2B). Results are represented in percentage of specific lysis.

Phenotypic and functional characteristics of exosomes

Electron microscopy showed that C15 exosomes have homogeneous sizes between 30 and 60 nm (Fig. 3A). The protein content of C15 exosomes was assayed by western-blot (Fig.1B) and compared with exosomes derived from sera of healthy donors. As expected, NPC-Exo expressed the oncolytic EBV protein LMP-1, HLA-Dr α , tetraspanin CD63 and Gal-9,

whereas they did not express Grp94. By contrast, Gal-9 and LMP1 were not detected in healthy donors-derived exosomes (Fig. 3B).

C15 exosomes could significantly suppress the proliferation of both PBMCs and CD4⁺ T cells mainly after 120 h culture at 1µg/mL and 10µg/mL concentrations for both cell types and at 48 hours only for PBMCs (Fig. 3C₁ and 3C₃). Similarly with respect to Gal-9 a significant suppression of the proliferation of these cell types was observed mainly after 48 and 120 hours of culture for PBMC and only after 120 hours for CD4⁺ T cells (Fig. 3C₂ and 3C₄).

Impact of the tumoral exosomes on the specific CD4⁺ T cell lines cytotoxic activity

Moreover, having already proven that C15 NPC tumor lines use Gal-9 rich exosomes to induce an immune suppressive environment, we moved to study the effectiveness of our peptide cocktail in such conditions. First, we examined the ability of the previously described EBV-specific CD4⁺ cell lines to induce lysis of C15 NPC tumor lines but this time in the presence of autologous C15 exosomes or recombinant Gal-9S. On one hand, the presence or absence of C15 exosomes didn't have any significant effect on the induced lysis of the tumor line. On the other hand, we do observe a slight decrease in percentage of induced lysis in the presence of recombinant Gal-9, yet this decrease of about 15% was only significant at the effector to target ratios of 0.312 and 2.5 to 1 and was not statistically significant (Fig. 4A).

Next we studied the direct effect of C15 exosomes and recombinant Gal-9 on the proliferation of the EBV-specific CD4⁺ cell lines. In fact, even in the presence of 5µg/ml of C15 exosomes or 1µg/ml of recombinant Gal-9, there was no significant change in proliferation neither at 48 nor 120 hours (Fig. 4B).

However, given the fact that the EBV-specific cell line was generated following a step of depletion of CD8⁺ cells, it was necessary to insure that the inability of C15 exosomes or Gal-9 to inhibit the cell lines was not due this depletion step. To this end, PBMCs depleted of CD8⁺ cells were chosen as a control and the impact of C15 exosomes on their proliferation was essayed. The results clearly show that in fact C15 exosomes could inhibit the proliferation of these depleted PBMCs with this inhibition being highly significant at a concentration of 1µg/ml and 10µg/ml of C15 exosomes at 48 hours and only at a concentration of 10µg/ml at 120 hours (Fig. 4C).

Furthermore, to verify that the high resistance of the EBV-specific CD4⁺ cell line to C15 exosome or Gal-9 induced immuno-suppression was not due to the fact that these cells had transformed into non-immune cells, we studied the effect of Ciclosporin A (CsA), a highly potent immune-suppressor, on their proliferation. Interestingly CsA could inhibit the proliferation of the CD4⁺ cell line. This significant or highly significant decrease in proliferation ranged between 60 to 70 % at both 48 and 120 hours at the tested concentrations 300, 500 and 1000 nM of CsA. (Figure 4D)

***In vivo* EBV peptides vaccination in a humanized SCID mice model of NPC**

As a final step we moved on to verify the effectiveness of the peptide cocktail in an *in vivo* model. To that end, we created an original splenectomised SCID mouse model that has been xenotransplanted with C666-1-Luciferase cells. Growth of the xenotransplanted tumoral cells was assessed at the level of evolution of luminescence as well as increase tumor size. By comparing the 5 groups of mice we observed that using the EBV cocktail in the group

reconstituted with human PBMCs induced the most significant decrease the tumor growth which was confirmed at the level of radiance as well as size. A less significant decrease in tumor size was also observed in the two groups injected with adjuvant that were either only reconstituted with PBMCs without vaccine or also just received the EBV vaccine without reconstitution.

CONFIDENTIEL

DISCUSSION

To date, more than 30 epitopes derived from the latency antigens have been identified [35]. The CD4⁺ T cell response to latency II antigens was least frequently described [36,37], in part due to a lack of interest in this field mainly focused on the significant CD8⁺ T cells expansion during primary infection, the small size of the CD4 memory compartment, and obviously the paucity of defined CD4⁺ EBV epitopes. In a previous work, we have developed original technical approaches to identify a promiscuous peptide cocktail within the CD4⁺ T cell epitope, and proposed it as a potential vaccine against EBV latency II malignancies [27]. Therefore, we chose to stimulate CD4⁺ T cells with peptides derived from EBV latency II proteins LMP -1, LMP- 2 and EBNA- 1. The immunogenicity of these peptides has been previously validated (i) in transgenic mice for the human HLA -DR1 [29], (ii) on isolated PBMCs from healthy donors [28] and (iii) on isolated PBMC from HL patients [29]. The objective pursued, here, is mainly to extend the use of the peptide cocktail to another malignancy associated with EBV latency II: NPC.

Therapeutic strategies related to EBV latency type II associated malignancies, such as NPC, have been developed targeting mainly the activation of CD8 T cells as effector cells [38], or using polyclonal autologous or allogeneic CD8 T cells, specific to EBV or only LMP proteins. The results were relatively disappointing because they had led to the development of transient and non-specific partial responses. Unfortunately, even if a decrease of viral load was achieved, it was not accompanied by a significant clinical effect. This lack of clinical effect coupled with a lack of specificity makes these therapies ineffective against NPC. In this context, we proposed here to develop an immunotherapeutic strategy based on specific stimulation of CD4⁺ T lymphocytes by EBV latency II derived peptides. Indeed, it's well described that the helper CD4 T lymphocytes play an important role in the establishment of

the adaptive immune defense in EBV latency II malignancies. These cells are essential (i) during the process of isotype switching during antibody formation by B cells, (ii) they play a leading role in the activation and growth of the CD8 T cells, and (iii) they increase the activity of phagocytes such as macrophages. Thus CD4⁺ T cells play a major role in activating the immune system. It is recognized that any immune system without proper activation and maturation of CD4 helper lymphocytes (Th1 cytokine secreting effectors) and memory LT (against reinfection) is incomplete and ineffective. Furthermore, it is described that the activation of CD4⁺ T cells may in some infectious conditions produce itself cytotoxic effects [39].

NPC is characterized by a specific immunosuppressive microenvironment associated with increased infiltration of natural Treg lymphocytes (CD4⁺ Foxp3⁺ CD25^{high}), which can represent up to 12 % of total tumor infiltrating lymphocytes [40]. In addition, this environment is compounded by the massive presence of NPC tumor exosomes containing the Gal -9 -specific ligand death receptor Tim-3 expressed on CD4 Th1 [33] . So, by inhibiting the systemic anti-tumor immune response, exosomes are the main actors of this immunosuppression. In this context, these tumor exosomes may represent a potential barrier to the use of a cocktail peptide in the treatment of NPC. To investigate this hypothesis, we first purified and characterized tumor exosomes from xenotransplanted NPC in immunodeficient mice. As described in the literature, the isolated exosomes achieved the expected phenotypic characteristics, both in terms of size and expression of specific described markers as LMP-1, Gal-9 and CD63 [33]. In addition, exosomes obtained were functionally active because they conserved their immunosuppressive properties [33]. Moreover, the fact that these tumor exosomes are able to inhibit the proliferation of PBMC, CD8⁺ depleted PBMC and autologous CD4⁺ T cells, validates the hypothesis that they may represent a potential

barrier to the use of peptide cocktail as vaccine. In contrast, the induction of the CD4⁺ T cells proliferation by exosomes from healthy donors is not surprising. Indeed, the work of L. Zitvogel shows that exosomes isolated from healthy culture dendritic cells can activate immune cells suggesting that these "healthy" exosomes could have some therapeutic potential [41].

We first validated the immunogenicity of the EBV peptides in the context of NPC. Indeed, the results obtained clearly showed an activation of the human PBMC by the cocktail, as evident by the induction of their proliferation and IFN- γ secretion, a main anti-tumoral cytokine. More importantly, we obtained the same results with PBMC pre-conditioned with NPC cell line, suggesting that we may call a memory response. This response is very important after 72 h incubation and remained at 144 h, although declining. This could be explained by the fact that it is an *in vitro* system and it is difficult to maintain long primary cells in culture. Presumably, this response is more sustained *in vivo*, in a true physiological context. Moreover, the difference in proliferation obtained for each donor is related to individual variability. Thus, the results confirm and support the idea that the peptide cocktail is not only capable of activating CD4 isolated from HL [29], but can also activate PBMC previously sensitized by EBV⁺ NPC cell lines. It would be interesting, in the future, to validate the ability of the cocktail to activate PBMCs isolated from patients with NPC. To do so, we are currently recruiting NPC patients from three different hospital centers.

The next step was to ensure that the EBV-specific CD4⁺ T cell lines generated were able to lyse NPC tumor cells. So, we performed cytotoxic assays which allowed us to prove that each of the oligoclonal T cell lines was able to exert high cytotoxic lyses of CNP cell lines. We also observed that these T CD4⁺ cell lines could induce a weak lysis of the EBV-negative

CNE1 cell, but without exceeding more than 20% of lysis, which represented probably the basal cytotoxic activity generally observed within oligoclonal T cell lines enriched in CD4⁺ T cells population. It could also be explained by the EBV status of the CNE1 cell line which is still controversial as evidenced by the publication of Chan et al, who published that CNE1, usually described as EBV negative cells, could express LMP1 protein [42]. And of course, this lysis can also be linked to the single HLA mismatch between effectors and targets.

Very interestingly, when we repeat the cytotoxic assays in the presence of exosomes isolated from two NPC cell lines (C15 and C666 -1), the presence of tumoral exosomes does not seem to impair the ability of EBV-specific cell lines to lyse their target. To investigate this unexpected result, we evaluated the direct impact of tumor exosomes on EBV-specific CD4⁺ T cell lines, and the presence of tumor exosomes did not seem to adversely affect neither the viability (data not shown) nor the proliferation of the EBV cell lines, while autologous CD4⁺ T cells are very sensitive to the immunosuppressive effect of exosomes. In the same way, recombinant Gal- 9S had no significant effect on the specific EBV cell lines. However, we show that the EBV-specific cell lines are really sensitive to other immunosuppressants such as cyclosporine A. So, it would be interesting later to determine at the molecular level, how these lines who nevertheless express Tim3 are resistant to Gal-9 and exosome induced suppression. Indeed, we could suggest that sub-expression of Tim3 can explain this insensitivity to Gal-9⁺ exosomes. However, the preliminary results we obtained, by flow cytometry, showed that EBV-specific cell lines express the Tim3 marker at the same level (~ 80% of Tim3 positive cells) as conventional CD4⁺ T cells (Supplementary data). In addition, we observed, by quantitative real-time PCR, an up-regulation of the gene encoding Granzyme B in EBV-specific lines (Supplementary data). Very interestingly, it has been recently reported that the over-expression of Perforin and Granzyme B in CD8⁺ cytotoxic T cell

promoted their resistance to Gal-9 [43]. Obviously, this track would need to be evaluated by further experiments.

After graduating *in vitro* evidence to support the use of «vaccine» peptides in the context of the NPC despite the presence of exosomes, we wanted to validate the *in vivo* efficacy of the cocktail as a direct peptide vaccination. So, we evaluated the anti-tumor effect of vaccinating with EBV peptides by two approaches, first manually by measuring the evolution of tumor volume and then by measuring the bioluminescence emitted by the CNP tumor cells (C666.1-Luc). First, the measurement of the weight of the mice in the different groups showed that vaccination and/or reconstitution with PBMCs does not change the weight of the mouse (data not shown). Indeed, by analyzing the curves, a change in weight was observed over time, corresponding to the normal weight gain for a SCID mouse. In contrast, for the direct measurement of tumor volume, we showed a significant difference between the vaccinated and PBMC restored group of mice, and the average of the other groups, with an overall decrease of 50%. Thus, immune reconstitution coupled with vaccination allows the volume of the tumor to be stable over time and remains well below the other groups. Interestingly, but not surprisingly, we also observed that the simple addition of PBMC in SCID-Hu-CNP mice can decrease tumor growth. This result is probably due to the induction and activation of an immune response in human PBMC against the NPC. Note also, that to a lesser extent, the injection of EBV peptides coupled to the adjuvant seems to be favorable. One can imagine that this response is obtained by the presence of the adjuvant which could induce the activation of a residual NK response in the mouse, insofar as these SCID mice have functional NK [39].

Data from tumor bioluminescence analysis consolidated these previous results. We

noted, in particular, in the group of mice reconstituted and vaccinated (plus two vaccine boost respectively made on day 8 and 21), a reproducible decrease in the bioluminescence. The data is different to the other groups, in which a steady increase in bioluminescence was observed even after two reminders vaccine. It should be noted that in the last days of the experiment, tumor necrosis was observed. The tumor necrosis may cause dramatic decrease in bioluminescence. Moreover, as we have observed previously (with direct measurements of the tumor), simply adding human PBMCs or EBV peptides in the SCID-Hu-NPC mice, can reduce tumor growth. In perspective of this work, it would be interesting to complete this study by immunohistochemistry and immunofluorescence analysis, for the presence of an inflammatory infiltrate in human tumor.

In conclusion, taken together our results suggest that the six EBV latency II-derived peptides could be used in therapy for nasopharyngeal carcinoma. Indeed, the use of cocktail causes favorable and beneficial effects both *in vitro* (cell-specific lysis NPC) and especially *in vivo* (decreased bioluminescence and tumor volume). The main focus of this vaccine is not to replace the protocols and therapies used in the primary tumors of NPC, but to act in conjunction with standard treatment protocols [44,45]. This peptides vaccine could be used in refractory patients to combat residual disease, and in patients with relapses, which is unfortunately very common and aggressive in the NPC.

BIBLIOGRAPHY

1. Zeng YX, Jia WH (2002) Familial nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol* 12: 443–450.
2. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J, editors. *Cancer incidence in five continents*, vol. 7, IARC 143; 1997. p. 814–5.
3. Sellami A, Hsai`ri M, Achour N, Jlidi R. *Registre du cancer du Sud Tunisien: incidence des cancers, années 1997– 2000*. Tunis: Institut National de la Santé Publique; 2002.
4. Burgos JS (2005) Involvement of the Epstein-Barr virus in the nasopharyngeal carcinoma pathogenesis. *Med Oncol* 22: 113–121.
5. Niedobitek G, Young LS (1994) Epstein-Barr virus persistence and virus-associated tumours. *Lancet* 343: 333-335.
6. Bravender T Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and infectious mononucleosis. *Adolesc Med State Art Rev* 21: 251-264, ix.
7. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127: 2893-2917.
8. Capello D, Cerri M, Muti G, Berra E, Oreste P, et al. (2003) Molecular histogenesis of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood* 102: 3775-3785.
9. Carbone A, Cesarman E, Spina M, Gloghini A, Schulz TF (2009) HIV-associated lymphomas and gamma-herpesviruses. *Blood* 113: 1213-1224.
10. Thomas JA, Hotchin NA, Allday MJ, Amlot P, Rose M, et al. (1990) Immunohistology of Epstein-Barr virus-associated antigens in B cell disorders from immunocompromised individuals. *Transplantation* 49: 944-953.
11. Ndour PA, Brocqueville G, Ouk TS, Goormachtigh G, Morales O, et al. Inhibition of latent membrane protein 1 impairs the growth and tumorigenesis of latency II Epstein-Barr virus-transformed T cells. *J Virol* 86: 3934-3943.
12. Pang MF, Lin KW, Peh SC (2009) The signaling pathways of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A (LMP2A) in latency and cancer. *Cell Mol Biol Lett* 14: 222-247.
13. Frappier L Contributions of Epstein-Barr nuclear antigen 1 (EBNA1) to cell immortalization and survival. *Viruses* 4: 1537-1547.
14. Wei WI, Sham JS. Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet* 2005;365:2041–54.
15. Al-Sarraf M, LeBlanc M, Giri PG, Fu KK, Cooper J, Vuong T, et al. Chemoradiotherapy versus radiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal cancer: phase III randomized Intergroup study 0099. *J Clin Oncol* 1998;16:1310–7.
16. Lin JC, Jan JS, Hsu CY, Liang WM, Jiang RS, Wang WY. Phase III study of concurrent chemoradiotherapy versus radiotherapy alone for advanced nasopharyngeal carcinoma: positive effect on overall and progression-free survival. *J Clin Oncol* 2003;21:631–7.
17. Chan AT, Leung SF, Ngan RK, Teo PM, Lau WH, Kwan WH, et al. Overall survival after concurrent cisplatin-radiotherapy compared with radiotherapy alone in locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:536–9.
18. Zhang L, Zhao C, Peng PJ, Lu LX, Huang PY, Han F, et al. Phase III study comparing standard radiotherapy with or without weekly oxaliplatin in treatment of locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: preliminary results. *J Clin Oncol* 2005;23:8461–8.

19. Langendijk JA, Leemans CR, Buter J, Berkhof J, Slotman BJ. The additional value of chemotherapy to radiotherapy in locally advanced nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis of the published literature. *J Clin Oncol* 2004;22:4604–12.
20. Baujat B, Audry H, Bourhis J, Chan AT, Onat H, Chua DT, et al., MAC-NPC Collaborative Group. Chemotherapy in locally advanced nasopharyngeal carcinoma: an individual patient data meta-analysis of eight randomized trials and 1753 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;64:47–56.
21. American Joint Committee on Cancer. *AJCC cancer staging manual*. 6th ed. New York, NY: Springer; 2002., pp. 31–46.
22. Daoud J, Toumi N, Bouaziz M, Ghorbel A, Jlidi R, Drira MM, et al. Nasopharyngeal carcinoma in childhood and adolescence: analysis of a series of 32 patients treated with combined chemotherapy and radiotherapy. *Eur J Cancer* 2003;39: 2349–54.
23. Papadopoulos EB, Ladanyi M, Emanuel D, Mackinnon S, Boulad MH, Carabasi MH, et al. Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1994;330:1185–91.
24. Rooney CM, Smith CA, Ng CY, Loftin S, Li C, Krance RA, et al. Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr virus-related lymphoproliferation. *Lancet* 1995;345:9–13.
25. Comoli P, Labirio M, Basso S, Baldanti F, Grossi P, Furione M, et al. Infusion of autologous Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells for prevention of EBV-related lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients with evidence of active virus replication. *Blood* 2002;99:2592–8.
26. Depil S, Angyalosi G, Morales O, Delacre M, Delhem N, et al. (2006) Peptide-binding assays and HLA II transgenic Abeta degrees mice are consistent and complementary tools for identifying HLA II-restricted peptides. *Vaccine* 24: 2225-2229.
27. Depil S, Morales O, Castelli FA, Delhem N, Francois V, et al. (2007) Determination of a HLA II promiscuous peptide cocktail as potential vaccine against EBV latency II malignancies. *J Immunother* 30: 215-226.
28. Morales O, Depil S, Mrizak D, Martin N, Ndour PA, et al. EBV Latency II-derived peptides induce a specific CD4+ cytotoxic T-cell activity and not a CD4+ regulatory T-cell response. *J Immunother* 35: 254-266.
29. Depil, S., Morales, O., Castelli, F.A., Delhem, N., Francois, V., Georges, B., Dufosse, F., Morschhauser, F., Hammer, J., Maillere, B., et al. 2007. Determination of a HLA II promiscuous peptide cocktail as potential vaccine against EBV latency II malignancies. *J Immunother* 30:215-226.
30. Bian, H., and Hammer, J. 2004. Discovery of promiscuous HLA-II-restricted T cell epitopes with TEPITOPE. *Methods* 34:468-475.
31. Sturniolo, T., Bono, E., Ding, J., Radrizzani, L., Tuereci, O., Sahin, U., Braxenthaler, M., Gallazzi, F., Protti, M.P., Sinigaglia, F., et al. 1999. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat Biotechnol* 17:555-561.
32. Miroux C, Morales O, Ghazal K et al. In vitro effects of cyclosporine A and tacrolimus on regulatory T-cell proliferation and function. *Transplantation* 2012; 94(2):123-27.

33. Klibi J, Niki T, Riedel A, et al. Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Blood* 2009;113(9):1957-66.
34. Mocanu JD, Yip KW, Alajez NM, Shi W, Li JH, Lunt SJ, Moriyama EH, Wilson BC, Milosevic M, Lo KW, van Rooijen N, Busson P, Bastianutto C, Liu FF. Imaging the modulation of adenoviral kinetics and biodistribution for cancer gene therapy. *Mol Ther.* 2007;15(5):921-9.
35. Hislop, A.D., Taylor, G.S., Sauce, D., and Rickinson, A.B. 2007. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol* 25:587-617.
36. Leen, A., Meij, P., Redchenko, I., Middeldorp, J., Bloemena, E., Rickinson, A., and Blake, N. 2001. Differential immunogenicity of Epstein-Barr virus latent-cycle proteins for human CD4(+) T-helper 1 responses. *J Virol* 75:8649-8659.
37. Long, H.M., Haigh, T.A., Gudgeon, N.H., Leen, A.M., Tsang, C.W., Brooks, J., Landais, E., Houssaint, E., Lee, S.P., Rickinson, A.B., et al. 2005. CD4+ T-cell responses to Epstein-Barr virus (EBV) latent-cycle antigens and the recognition of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. *J Virol* 79:4896-4907.
38. Amon, W. & Farrell, P. J. (2005) Reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *Reviews in Medical Virology* 15, 149–156.
39. Delhem, N. et al. (1998) Primary Th1 cell immunization against HIVgp160 in SCID-hu mice coengrafted with peripheral blood lymphocytes and skin. *J. Immunol.* 161, 2060–2069.
40. Lau, K.-M. et al. (2007) Increase in circulating Foxp3+CD4+CD25(high) regulatory T cells in nasopharyngeal carcinoma patients. *Br. J. Cancer* 96,617–622.
41. Viaud S, Théry C, Ploix S, Tursz T, Lapierre V, Lantz O, Zitvogel L, Chaput N. (2010) Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next? *Cancer Res.* 15;70(4):1281-5.
42. Sylvia Yat-Yee Chan, Kwong-Wai Choy, Sai-Wah Tsao, Qian Tao, Tao Tang, Grace Tin-Yun Chung and Kwok-Wai Lo. (2008) Authentication of nasopharyngeal carcinoma tumor lines. *Int. J. Cancer*: 122, 2169–2171 (2008)
43. Nagahara K, Arikawa T, Oomizu S, Kontani K, Nobumoto A, Tateno H, Watanabe K, Niki T, Katoh S, Miyake M, Nagahata S, Hirabayashi J, Kuchroo VK, Yamauchi A, Hirashima M. (2008) Galectin-9 increases Tim-3+ dendritic cells and CD8+ T cells and enhances antitumor immunity via galectin-9-Tim-3 interactions. *J. Immunol.* 181(11):7660-9.

44. Edmond H.N. Pow, Dora L.W. Kwong, Anne S. McMillan, May C.M. Wong, Jonathan S.T. Sham, Lucillus H.T. Leung, W. Keung Leung. (2006) Xerostomia and quality of life after intensity-modulated radiotherapy vs. conventional radiotherapy for early-stage nasopharyngeal carcinoma: Initial report on a randomized controlled clinical trial. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 66 (4): 981–991.

45. Nancy Lee, Ping Xia, Jeanne M Quivey, Khalil Sultanem, Ian Poon, Clayton Akazawa, Pam Akazawa, Vivian Weinberg, Karen K Fu. (2002) Intensity-modulated radiotherapy in the treatment of nasopharyngeal carcinoma: an update of the UCSF experience. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 53 (1): 12–22

CONFIDENTIEL

LEGENDS OF FIGURE**Figure 1: Immunogenicity of EBV peptides on human PBMC**

PBMC were isolated from blood of healthy donors, pre-conditioned or not with C15 cells, then activated by anti-CD3 and anti-CD28 mAbs and incubated with 60µg of EBV peptides (10µg per each peptide) **A.** Proliferation was measured using [³H]thymidine incorporation assay during the last 18 hours and values were obtained as counts per minute (cpm). Assays were performed after 48 and 120 h of culture. The results present normalized cpm values of triplicate wells of 5 independent experiments $\pm$ standard deviation (SD) bars. **B.** Time course of IFN- γ secretion. PBMCs from 5 healthy adult EBV⁺ donors were pre-cultured with NPC C15 cells and activated with EBV peptide cocktail at a concentration of 60 µg/ml in 25 cm³ culture flasks (2.10⁶ cells/ml). Medium culture was harvested 72 and 144 hours later and analysed for the cytokine release. The values shown here represent the means of 5 separate experiments performed on PBMCs extracted from 5 different donors.

Figure 2: Cytotoxic activity of the specific CD4⁺ T cell lines against NPC cell targets

Specific cell lines can lyse EBV carrying targets. **A.** Assessment of cytolytic activity of EBV cocktail-specific CD4⁺ T cell lines. Assays were conducted over 6 hours on EBV+ NPC cell lines (C15, C666-1 and C17) and EBV- cell lines (CNE1). **B.** Assessment of cytolytic activity of peptide and EBV cocktail-specific CD4⁺ T cell lines on C666-1 cell lines. All assays were performed at different Effector-to-Target (E:T) ratios. The capacity of each CD4⁺ T cell lines to kill EBV infected cell lines was evaluated as described in Materials and Methods by determining the leak of a cellular marker from lysed cells cytoplasm to culture medium. Data shown here represent the means of 5 separate experiments performed on PBMCs extracted from 5 different donors.

Figure 3: Phenotypical and functional characterization of NPC derived-exosomes.

A. Electron microscopy of a C15-Exo suspension contrasted with 2% phosphotungstic acid (PTA). The diameter of some vesicles was measured. Scale bar represents 100 nm. The image is representative of 4 independent experiments. **B.** Equal amounts C15 and healthy donors (HD) exosomes were analyzed by Western blotting for HLA DR, CD63 and Grp94 as common markers and for LMP1 and galectin-9 as NPC-specific markers. **C.** PBMC and CD4⁺ T cells were isolated from blood of healthy donors, then activated by anti-CD3 and anti-CD28 mAbs and incubated with increasing amounts of purified C15-Exo (**1** and **3**) and Gal-9S (**2** and **4**). Proliferation was measured using [³H]thymidine incorporation assay during the last 18 hours and values were obtained as counts per minute (cpm). Assays were performed after 48 and 120 h of culture. The results present normalized cpm values of triplicate wells of 3 independent experiments $\pm$ standard deviation (SD) bars.

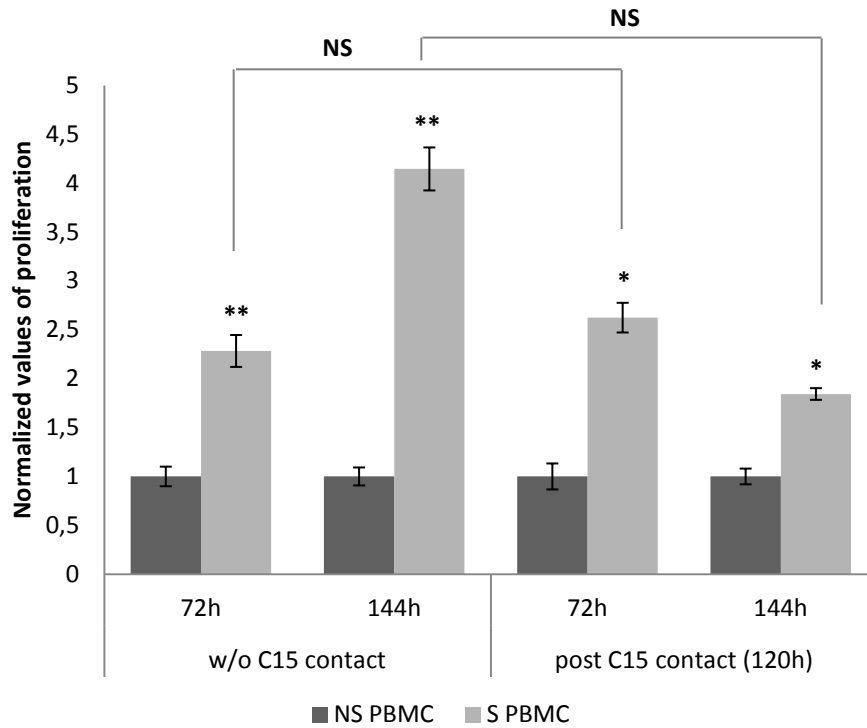
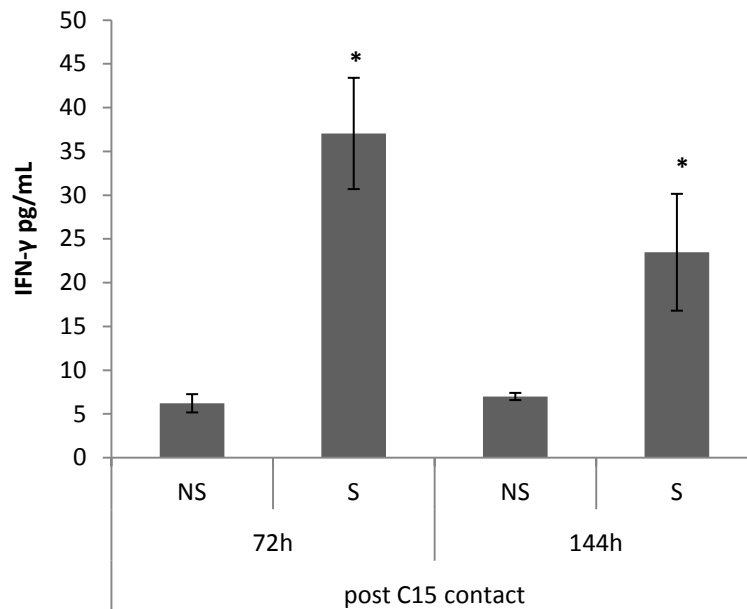
Figure 4: Impact of NPC-derived exosomes on EBV-specific CD4⁺ T cell lines.

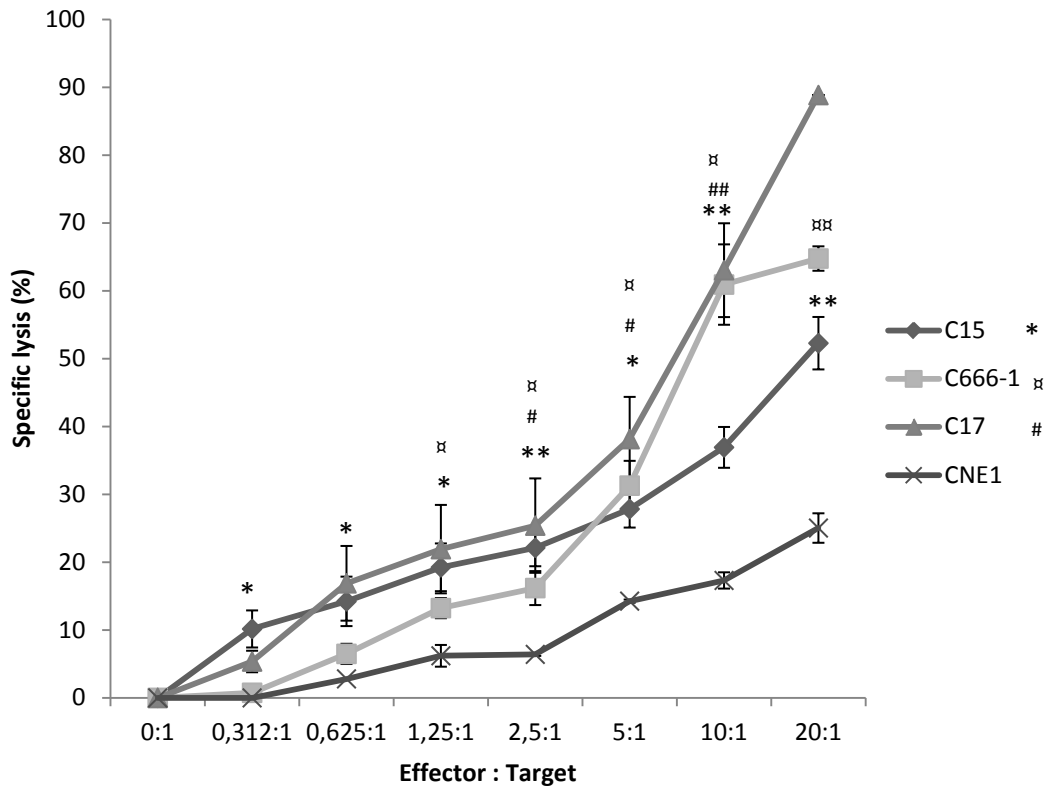
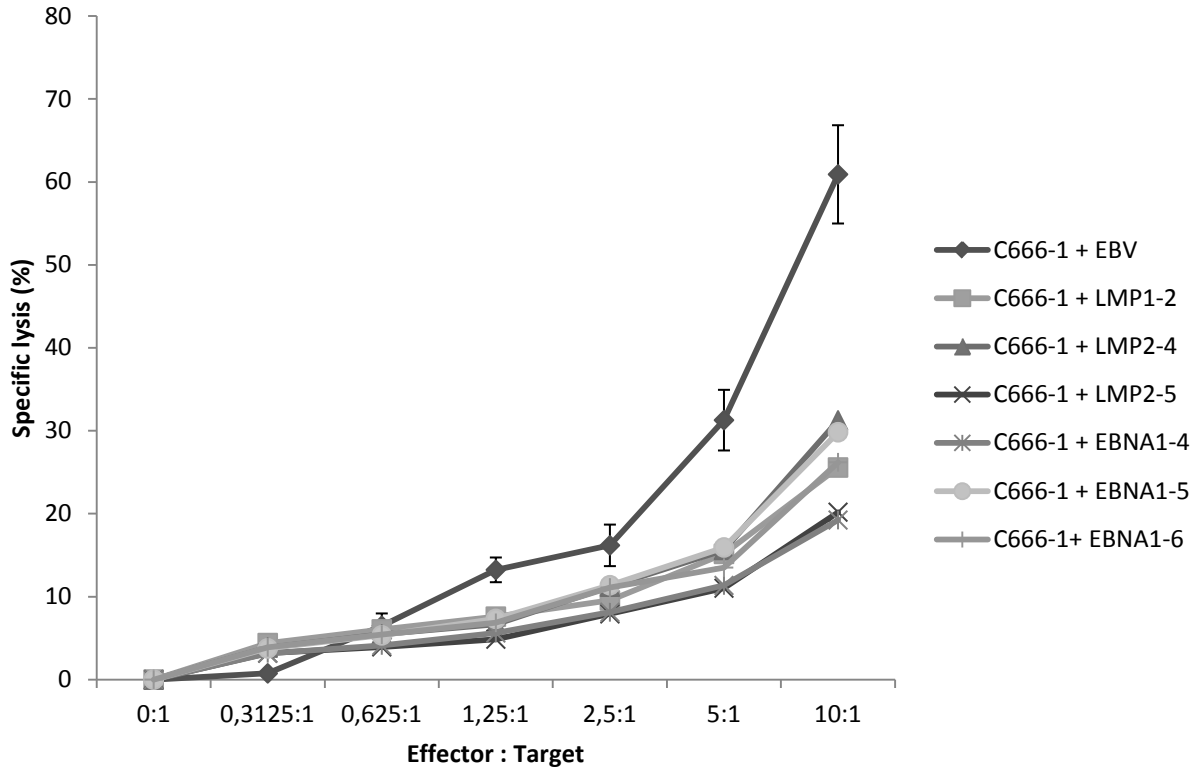
A. Assessment of cytolytic activity of EBV-specific CD4⁺ T cell lines. Cell lysis was assessed using CytoTox-Glo Cytotoxicity assay according to manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI, USA). Assays were conducted over 6 hours on C15 cell lines co-cultured with 10 μ g/mL of NPC-derived exosomes or 1 μ g/mL of Gal-9S. **B.** Proliferation assays on non-activated EBV-specific CD4⁺T cell lines co-cultured or not with 10 μ g/mL of C15-derived exosomes or 1 μ g/mL of recombinant Gal-9S. **C.** Proliferation assays of CD8⁺ depleted PBMC activated by anti-CD3 and anti-CD28 mAbs and incubated with increasing amounts of purified C15-derived exosomes. **C.** Proliferation assays on non-activated EBV-specific CD4⁺T cell lines co-cultured or not with increasing amounts of purified the immunosuppressants drugs CsA. All these proliferation was measured using [³H]thymidine incorporation assay during the last 18 hours and values were obtained as counts per minute

(cpm). Assays were performed after 48 and 120 h of culture. The results present normalized cpm values of triplicate wells of 5 independent experiments $\pm$ standard deviation (SD) bars.

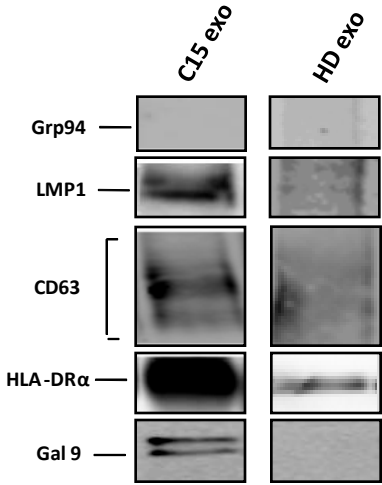
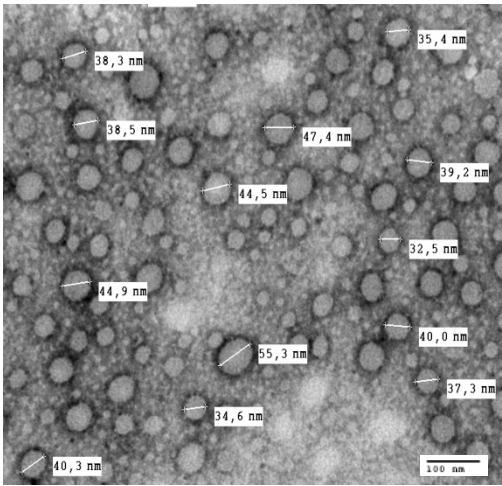
Figure 5: *In vivo* EBV peptides vaccination in a humanized SCID mice model of NPC

A. Schematic representation of the established humanized NPC mouse model. Splenectomised SCID mice were xenotransplanted with NPC tumors induced by C666-1-Luciferase cells (C666-1-Luc) and then reconstituted or not by intraperitoneal injection of $20 \cdot 10^6$ PBMCs from healthy donor blood. At the same time, the mice also either received or did not receive, sub-cutaneous injection of 120 μ g of EBV peptides (20 μ g of each peptide), with or without chemical Montanide adjuvant. Two recall vaccines were performed on day 8 and 21 and the animals were sacrificed on day 25 for subsequent analysis. Using this experimental protocol five groups of C-666-1-Luc xenotransplanted SCID mice were created: **(i)** A control group only xenotransplanted with C666-1-Luc (n=9); **(ii)** A xenotransplanted group only receiving Montanide adjuvant (n=9); **(iii)** A xenotransplanted group only receiving EBV peptides (n=9) and Montanide **(iv)** A xenotransplanted group only receiving PBMCs and Montanide and **(v)** A xenotransplanted group receiving both PBMCs, EBV peptides and Montanide (n=9). **B.** Bioluminescence measurements with the IVIS-Lumina XR® (Caliper, Life Sciences, MA, USA). Images were analyzed under the Living Image 4.1 software (Caliper Life Sciences) **C. Measure of the tumor volume.** The tumor length and width were measured with manual caliper at day 18, 23 and 25 and the tumor volumes were then determined by considering that they have an ellipsoid form (X, Y and Z axis, with X = length, Y and Z = width). The following formula was used: $Volume\ of\ the\ Tumor = \frac{4}{3} * \pi * X * Y * Z$. Data shown here represent the means of 3 separate experiments.

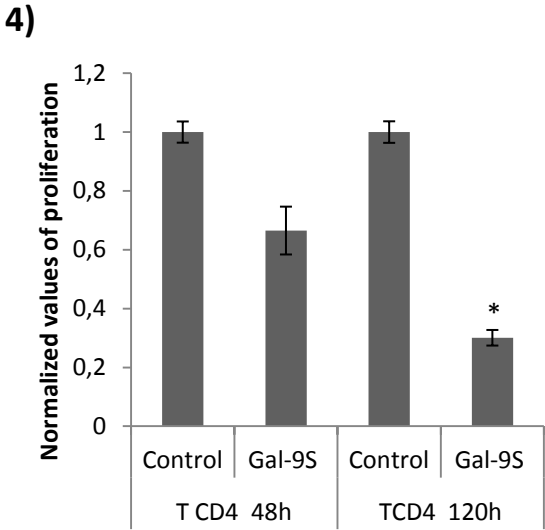
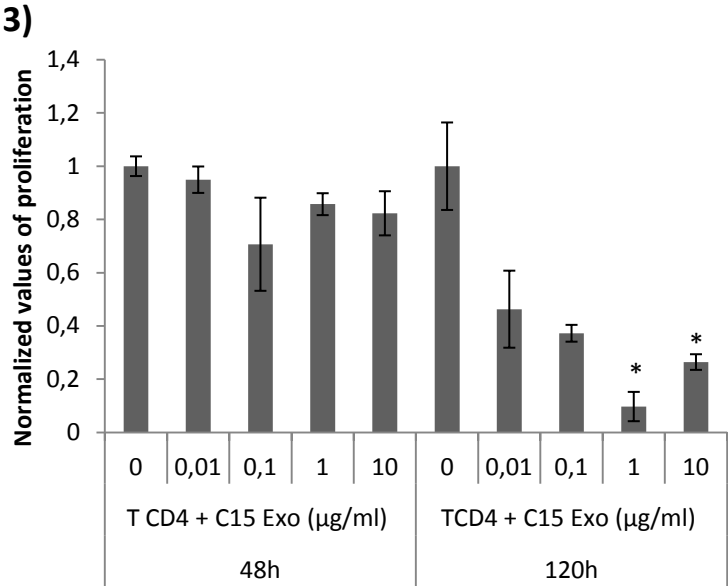
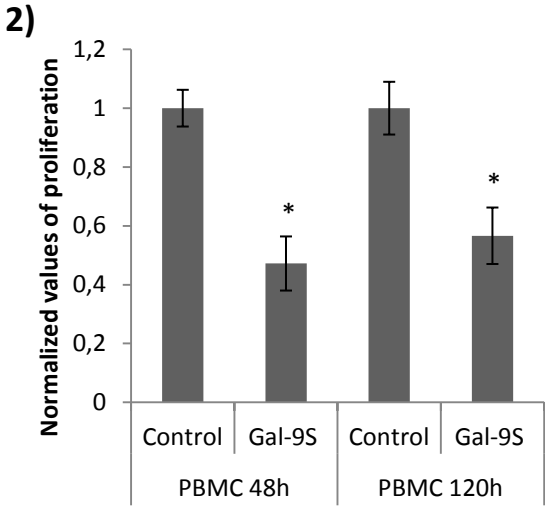
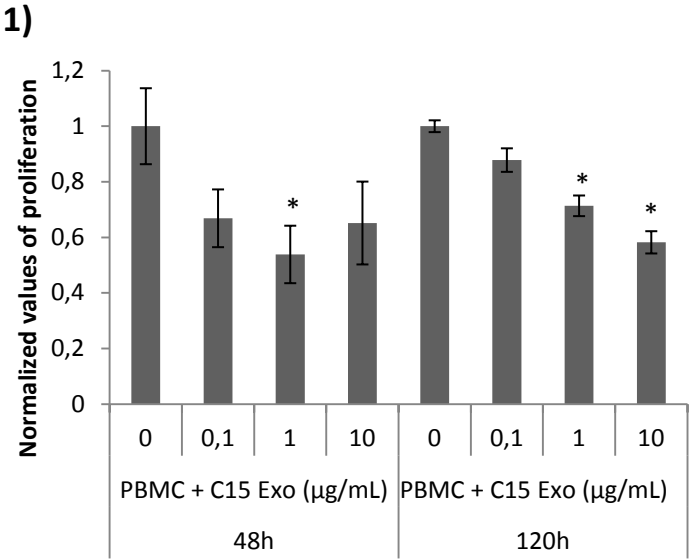
A.**B.****Figure 1**

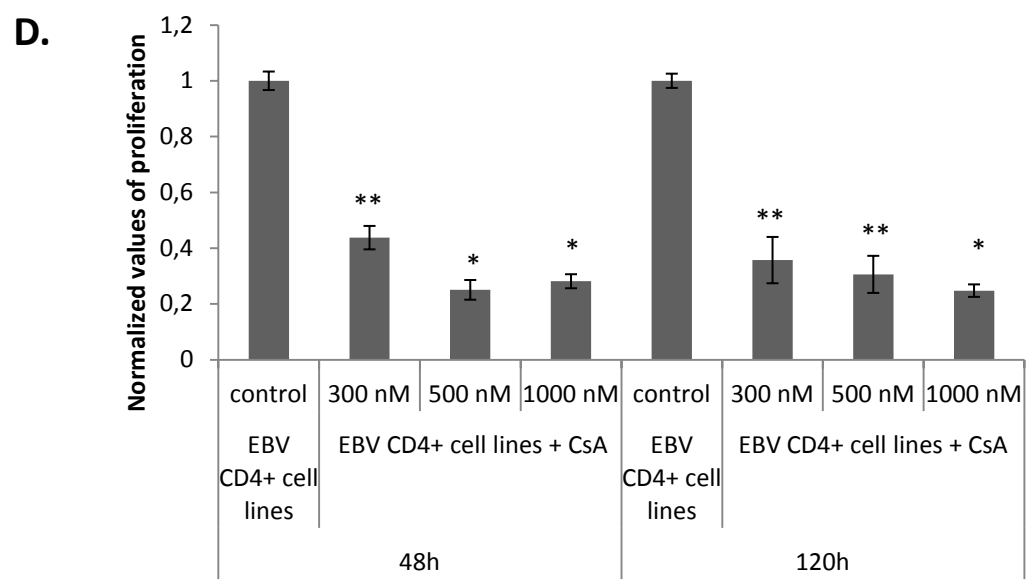
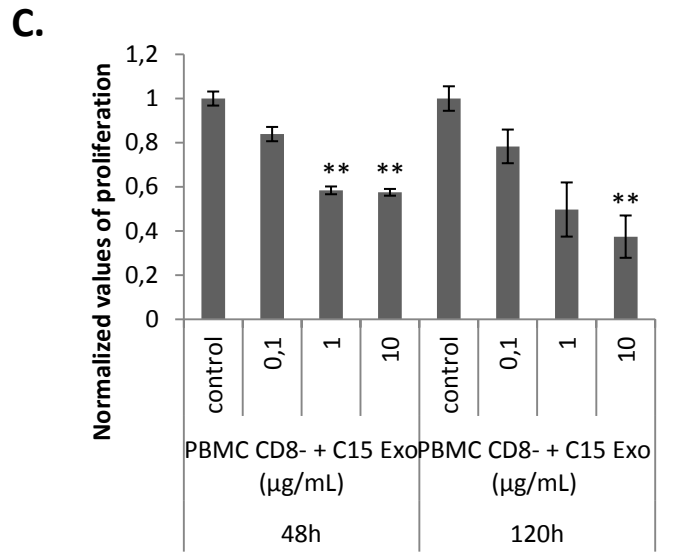
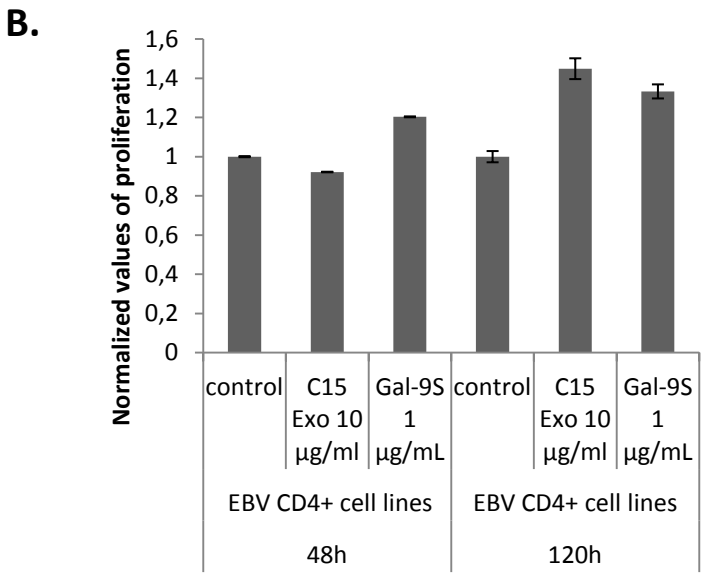
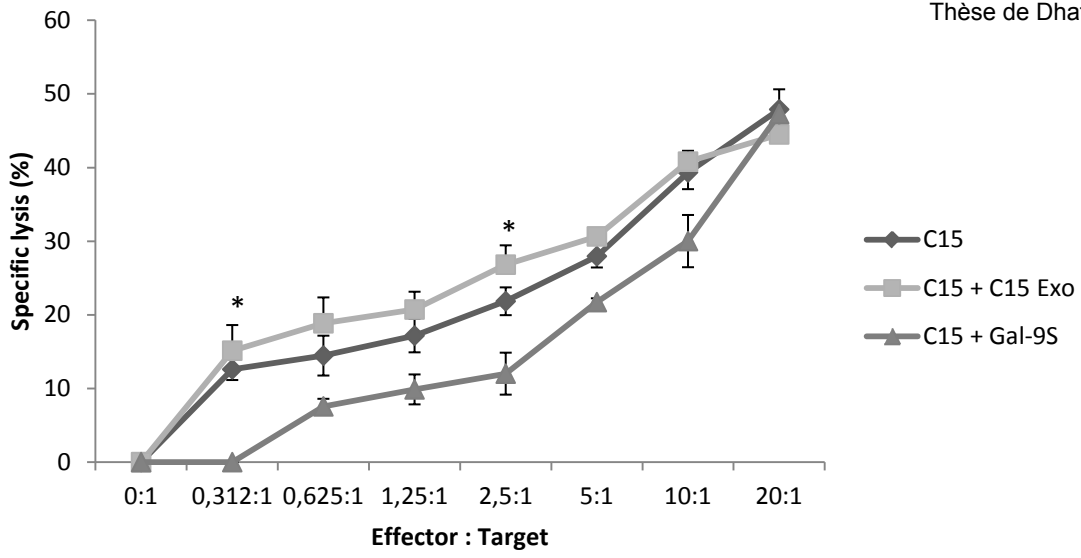
A.**B.****Figure 2**

A. B.

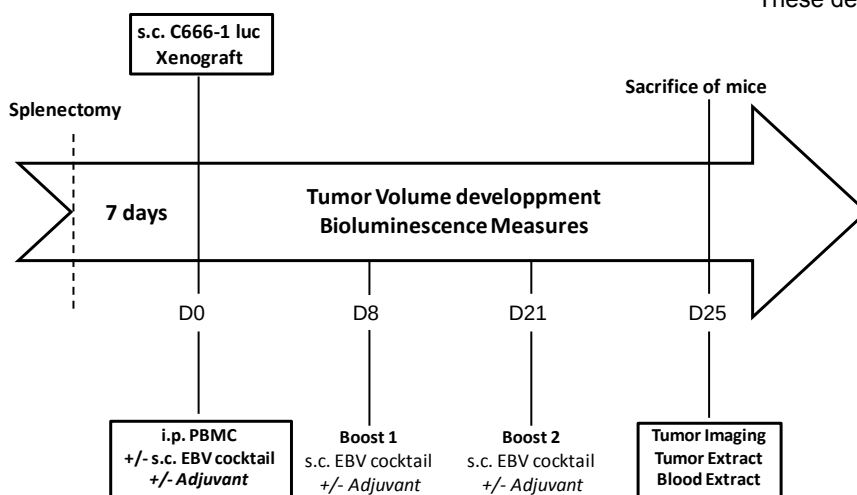


C.

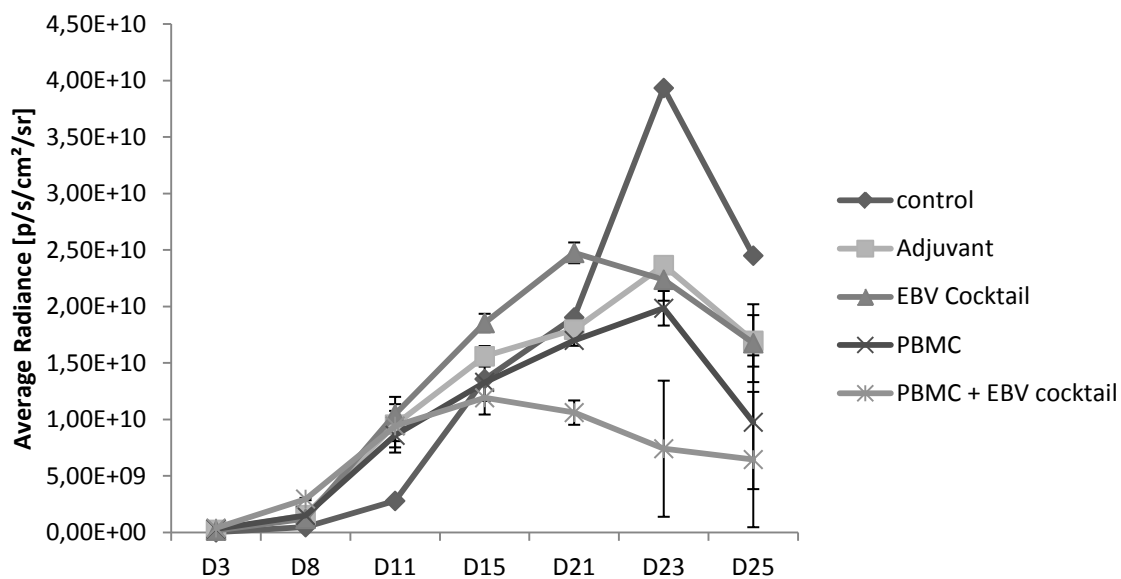




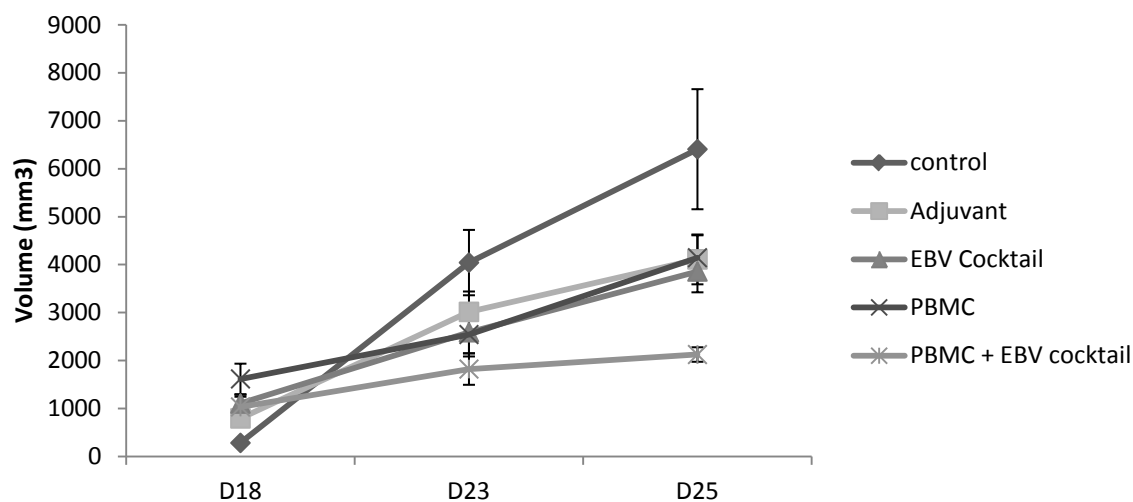
A.

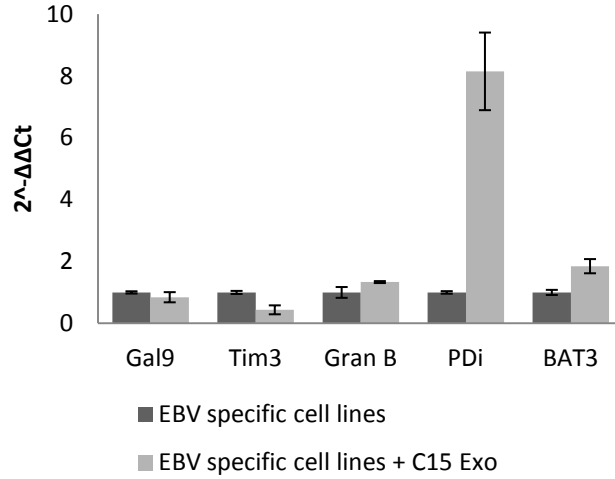
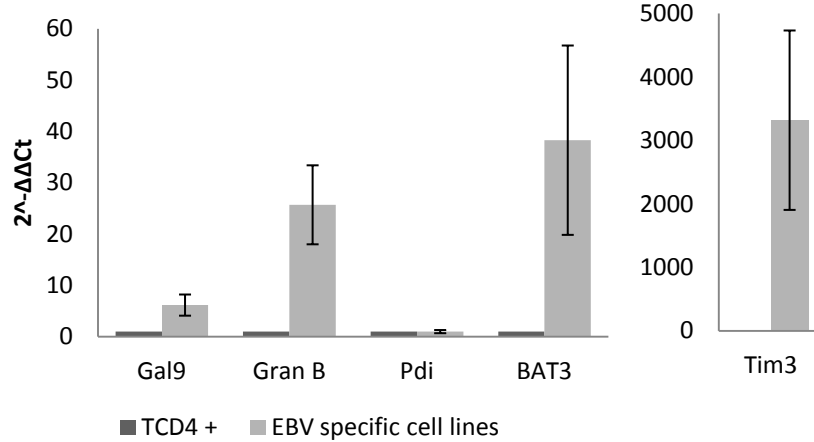
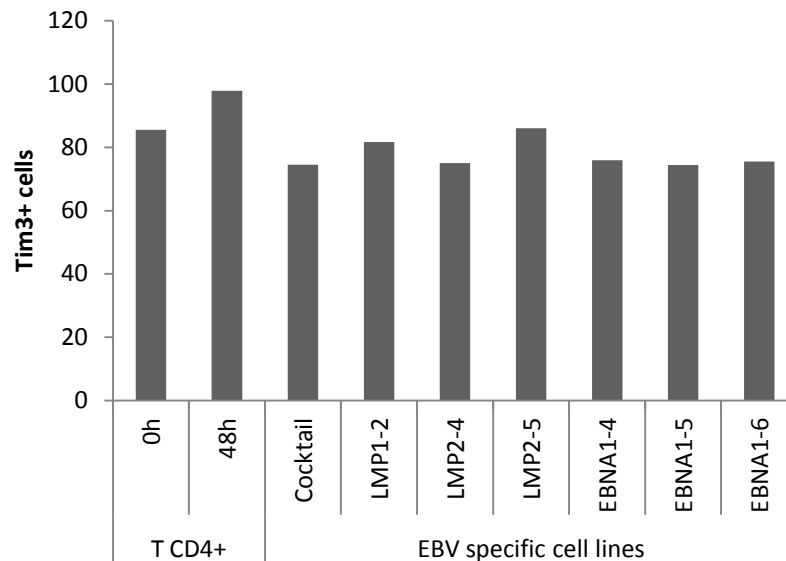


B.



C.



A.**1)****2)****B.**

Discussion, Perspectives et Conclusions

VIII. Discussion, Perspectives et Conclusions

Concernant EBV, plus de 30 épitopes dérivés des antigènes de latence ont été identifiés à ce jour (Hislop, Taylor et al. 2007). Cependant, la réponse des lymphocytes T CD4+ aux antigènes de latence II a été moins bien explorée (Leen, Meij et al. 2001; Long, Haigh et al. 2005) en raison (i) d'un manque d'intérêt pour les T CD4+ dans un domaine qui est principalement axé sur l'expansion des cellules T CD8+ au cours de la primo-infection, (ii) de la petite taille du compartiment mémoire CD4 EBV spécifique et (iii) de la description très faible d'épitopes CD4+ spécifiques d'EBV. Dans un précédent travail, notre équipe a développé une approche originale qui a permis d'identifier un cocktail de 6 peptides dérivés des antigènes de latence II d'EBV et qui sont susceptibles d'être reconnus par la majorité des cellules T CD4+ (peptides "promiscuous"). Ces peptides dérivés des protéines de latence LMP-1, LMP-2 et EBNA-1 d'EBV, ont été proposé comme vaccin potentiel dans les pathologies malignes associées à la latence II d'EBV, avec pour but de cibler les T CD4+ et d'induire une réponse protectrice (Depil, Morales et al. 2007). La cellule T CD4+ étant, en effet, considérée comme le véritable chef d'orchestre de la réponse immunitaire adaptative de part son rôle essentiel dans l'induction d'une réponse effectrice efficace contre un « pathogène » donné. Une grande partie du travail exposé dans ce manuscrit a été réalisée au cours de ma thèse et a eu pour principal objectif d'évaluer cette stratégie d'immunothérapie peptidique dans les pathologies malignes associées à EBV et plus particulièrement dans le CNP.

La manipulation de la réponse des cellules T CD4 spécifiques des antigènes de latence d'EBV peut aisément se comprendre par le fait que de nombreuses tumeurs associées à EBV sont d'origine lymphoïde et expriment les molécules du CMH de classe II (Lymphome de Hodgkin, Lymphome de Burkitt...), ce qui a également été retrouvé pour le carcinome du nasopharynx (Busson, Braham et al. 1988). De ce fait, les cellules T CD4 deviennent des outils thérapeutiques très utiles si elles sont capables de reconnaître efficacement les cellules HLA II+ exprimant l'antigène viral et/ou oncoviral relevant. La réponse des T CD4+ aux antigènes de latence d'EBV revêt une certaine importance de part le rôle des T CD4+ Th1 dans le maintien de l'immunité cellulaire médiée *in vivo* par les cellules T CD8+ et possiblement de part leur rôle effecteur direct dans la réponse antivirale et/ou antitumorale *via* leur fonction cytolytique propre. Cependant, l'induction quantitative et qualitative d'une réponse T CD4 pourrait résulter en une augmentation des populations régulatrices qui appartiennent à ce lignage et pourrait ainsi favoriser l'échappement de la réponse immunitaire dans un microenvironnement immunosuppresseur avéré dans

les cancers en général. En effet, plusieurs études montrent une prévalence accrue des cellules T régulatrices dans de nombreux cancers (Liyanage, Moore et al. 2002; Grunewald, Desai et al. 2003) et leur présence à un taux élevé semble souvent corrélé à une survie réduite (Curiel, Coukos et al. 2004). Par ailleurs, il a été montré dans des modèles animaux que la déplétion en cellules T régulatrices permettait de restaurer une réponse immune anti-tumorale efficace (Onizuka, Tawara et al. 1999).

L'analyse des populations régulatrices revêt donc une importance primordiale en immunothérapie puisque l'objectif majeur d'un tel traitement est le développement d'une réponse protectrice efficace et non d'une réponse suppressive par essence défavorable. Plusieurs études montrent qu'il existe bien des Treg spécifiques de peptides dérivés d'antigènes tumoraux (Albers, Ferris et al. 2005; Liu, Leerberg et al. 2009). Dans ce sens l'équipe de Thierry Boon a montré qu'un peptide dérivé de MAGE-A3 retreint au HLA-DP4 active en partie des cellules T CD4+ présentant les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des Treg (Francois, Ottaviani et al. 2009). Concernant EBV, des études ayant pour but l'analyse de la réponse immune à certaines protéines de latence ont montré qu'il y avait induction d'une réponse régulatrice, notamment des Tr1 et des cellules T régulatrices naturelles (CD4+CD25+). Plusieurs travaux ont montré que le processus tumoral associé à EBV s'accompagnait d'une réorientation franche de la réponse T CD4 vers un profil Th2, voire T régulateur (Malmgaard and Paludan 2003; Marshall, Christie et al. 2004). Il existe encore quelques controverses en regard de l'ontogénie des cellules T régulatrices. Les cellules T CD4+ suppressives peuvent également être générées à partir de précurseurs naïfs en périphérie, ce qui semble être plus particulièrement le cas dans le contexte de l'infection à EBV puisque la stimulation *in vitro* de précurseurs naïfs issus de PBMC, avec un peptide EBNA-1, résulte en la génération de cellules Treg EBV spécifiques (Fu, Voo et al. 2004; Voo, Peng et al. 2005). De même la réponse à LMP-1 est décrite comme principalement dominée par les Tr1, cellules T régulatrices fortement productrices d'IL-10 (Marshall, Culligan et al. 2007). En ce sens, au cours de ma thèse, nous avons montré, dans le lymphome de Hodgkin, que l'expression des protéines d'EBV (dont LMP1) augmente de façon significative l'expression des marqueurs associés aux lymphocytes T régulateurs naturels (Treg) et induits (Tr1), ainsi que l'expression des cytokines immunosuppressives IL10 et TGF- β . De façon intéressante, cette surexpression était associée avec une augmentation de l'expression de plusieurs chimiokines (CCL4, CCL17, CCL22 et CCL22) connues pour attirer les Th2 et les lymphocytes T régulateurs, pouvant ainsi contribuer à l'échappement immunitaire. Nous avons montré que la sécrétion de

l'IL-10 (principale cytokine immunosuppressive dont dépend l'activité des Tr1) était significativement augmentée dans les tumeurs et le sang des patients ayant un LH EBV-positif. En conclusion, les résultats que nous avons obtenus proposent un nouveau schéma dans lequel EBV recrute les Treg et les Tr1 au niveau du microenvironnement ganglionnaire en induisant l'expression de plusieurs chimiokines impliquées dans le recrutement des lymphocytes T régulateurs.

Ainsi les résultats, que j'ai obtenus au cours de ma thèse, suggèrent que l'expression des protéines d'EBV dans les cellules tumorales pourrait favoriser l'échappement des tumeurs à la réponse des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques du virus. En perspective de ce travail, nous envisageons d'étudier l'évolution de ces Treg périphériques dans le temps. Il serait, en effet, intéressant de vérifier le retour à la normale du nombre de T régulateurs en cas de réponse au traitement et d'étudier le rôle pronostique éventuel de ces cellules régulatrices voire de certains de leurs marqueurs associés. Leur présence à un taux élevé étant susceptible d'être associée à une survie réduite, comme cela a été décrit dans le cas du carcinome ovarien (Curiel, Coukos et al. 2004).

Dans le CNP, l'émergence d'un processus malin produisant plusieurs protéines virales immunogènes dans un contexte local d'inflammation et en présence d'un infiltrat leucocytaire massif demeure un paradoxe dans la pathogénèse. Bien qu'il ait été décrit une prédominance des Treg dans ces tumeurs associées à EBV, la recherche de facteurs immunosuppresseurs locaux a été plutôt décevante jusqu'à aujourd'hui (Huang, Sheen et al. 1999; Ho, Guo et al. 2004). Ce manque d'explication fût, en partie, compensée par la mise en évidence de la production de galectine-9 associée aux exosomes par les cellules de CNP (Pioche-Durieu, Keryer et al. 2005; Keryer-Bibens, Pioche-Durieu et al. 2006). Ces exosomes aux propriétés immunosuppressives sont produits et stockés dans les corps multivésiculaires. En accord avec la littérature, nous avons pu confirmer qu'ils ont bien une taille caractéristique de 30-100 nm et qu'ils expriment les marqueurs spécifiques du compartiment endosomal. De nombreuses études ont exploré leur mode de formation, l'expression des protéines à leur surface et leur fonction, notamment pour définir leur caractère immunogène ou immunosuppresseur (Taylor and Gercel-Taylor 2005; Chaput and Thery 2011). Il a été montré que les exosomes dérivés de tumeurs sont abondants dans le sang et les « effusions » tumorales issus de patients atteints d'un cancer. Des preuves récentes ont révélé que les exosomes tumoraux pouvaient exercer un large panel d'effets délétères sur le système immunitaire, de l'induction de l'apoptose des CTL à l'inactivation de la maturation des DC en

passant par l'activation des cellules myéloïdes suppressives et des Treg. Par conséquent, les exosomes dérivés de tumeurs peuvent être impliqués dans les processus tolérogènes ou d'autres mécanismes immunogènes. Le résultat de la sécrétion abondante et aberrante d'exosomes par les tumeurs est que ces exosomes peuvent favoriser le blocage des voies d'apprêtement et de présentation antigénique, ainsi que l'échappement à la surveillance par le système immunitaire (Whiteside 2005; Valenti, Huber et al. 2007; Thery, Ostrowski et al. 2009).

La plupart des travaux sont en faveur d'une immunosuppression locale plutôt que systémique pour expliquer le développement tumoral du CNP. Les tumeurs échappent à l'immunosurveillance en générant un microenvironnement immunosuppressif, principalement induit par la sécrétion (i) de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10, le TGF- β (Li, Wan et al. 2006; Curiel 2007; Liu, Wong et al. 2007), ou (ii) de facteurs de croissance tel que le VEGF (Gabrilovich, Chen et al. 1996), ou encore (iii) l'induction et/ou le maintien des Treg périphériques (Wada, Suzuki et al. 2009). De nombreuses études impliquent les Treg comme l'effecteur principal de l'échappement tumoral (Zou 2006). Les Treg, probablement attirés par l'excès d'antigènes tumoraux et le microenvironnement pro-inflammatoire (Nishikawa and Sakaguchi), infiltrant massivement les tumeurs et les ganglions lymphatiques drainants. Une des clefs de cette attraction est la sécrétion, par les cellules tumorales et les macrophages infiltrant la tumeur, de nombreuses chimiokines telles que CCL4, 11, 17, 20 ou 22, connues pour attirer les Treg qui expriment leurs récepteurs (CCR3, 4, 6 ou 8) (Nishikawa and Sakaguchi; Zou 2006). Il faut de même noter que la prolifération des Treg n'a pas lieu dans le thymus mais plutôt dans les organes lymphoïdes secondaires et ce principalement suite à la conversion de lymphocytes T conventionnels CD4+CD25-FoxP3- (Valzasina, Piconese et al. 2006) en présence de TGF- β (Liu, Wong et al. 2007).

En ce sens, les résultats que j'ai obtenu au cours de ma thèse, ont démontré pour la première fois que des Treg sont sélectivement recrutés dans le CNP par la chimiokine CCL20. Nous sommes en effet les premiers à définir le potentiel immunorégulateur unique des exosomes dérivés de CNP par leur capacité d'induire l'expansion des Treg et d'augmenter leurs capacités suppressives. Ils favorisent également la conversion des T CD4+CD25- conventionnels en Treg et augmentent la chimioattraction des Treg via CCL20. L'interaction des exosomes de CNP avec les Treg pourrait ainsi représenter un nouveau mécanisme dans l'induction de la tolérance menant à l'échappement du CNP à l'immunosurveillance. Les données obtenues indiquent que les NPC-Exo favorisent le potentiel régulateur inné des Treg à divers niveaux et les utilisent pour former un

microenvironnement tumoral favorable à la suppression immunitaire et à l'échappement à l'immunosurveillance de l'hôte. Ces travaux mettent également en évidence la nécessité de développer de nouvelles approches thérapeutiques ciblant principalement les Treg. En perspective de ces travaux, il serait également intéressant d'évaluer l'impact des exosomes sur le microenvironnement cellulaire et notamment sur les TAM ou les cellules dendritiques (DC). En ce sens, les résultats préliminaires que nous avons obtenus suggèrent que les exosomes de C15 affecteraient la différenciation et la maturation des DC humaines dérivées des monocytes, en faveur d'un état semi-mature. Par ailleurs, ces DC semi-matures possèdent des propriétés physiologiques qui les assimilent à des DC tolérogènes. En favorisant l'émergence de DC tolérogéniques, les exosomes CNP pourraient encourager l'échappement immunitaire des tumeurs.

L'immunothérapie des cancers basée sur l'utilisation des cellules T présente un intérêt grandissant, particulièrement pour les tumeurs associées à des virus pour lesquels des essais cliniques ciblant des antigènes viraux ont démontré leur efficacité et leur absence de toxicité (Einsele, Roosnek et al. 2002; Bollard, Aguilar et al. 2004; Straathof, Bollard et al. 2005; Savoldo, Goss et al. 2006). Cependant, l'immunothérapie de ces cancers reste problématique car il existe encore un manque d'antigènes viraux et/ou tumoraux définis. Les antigènes de tumeur (TAA, *Tumor Associated Antigens*) sont des peptides, provenant des protéines des cellules tumorales qui sont présentés aux cellules T par les molécules du CMH des deux classes. Par conséquent, ces peptides peuvent devenir les cibles d'une réponse cellulaire T spécifique de la tumeur car ils ne sont pas présents à la surface des cellules non tumorales, du moins pas à des taux suffisants pour être reconnus. Il existe plusieurs catégories d'antigènes tumoraux dont, les protéines codées par les antigènes viraux. Ces protéines oncovirales sont des protéines virales qui peuvent jouer un rôle critique dans le processus d'oncogenèse. Le fait qu'elles soient étrangères au soi leur permet d'induire une réponse des cellules T. C'est le cas par exemple les protéines E6 et E7 du virus du papillome humain de type 16, dont on connaît aujourd'hui le succès dans la prévention des cancers cervicaux (Zonfrillo and Hackley 2008). C'est dans cette catégorie que l'on retrouve les protéines de latence du virus d'Epstein-Barr qui sont exprimées dans la plupart des cellules tumorales des lymphomes et carcinomes associées à EBV.

Dans notre étude, nous avons décidé de privilégier une approche peptidique pour développer une immunothérapie basée sur la stimulation d'une réponse lymphocytaire T CD4 spécifique dans les tumeurs associées à une latence de type II d'EBV. Les avantages que peuvent

représenter les vaccins à base de peptides synthétiques sont notamment: (i) une production facile et à un coût relativement réduit; (ii) la connaissance des épitopes cibles et la possibilité de connaître leur expression par les cellules tumorales; (iii) la simplicité de leur administration en clinique; (iv) la faisabilité d'une évaluation *ex vivo* de la réponse immune dirigée contre de tels épitopes. De nombreux essais de vaccination peptidique de phase I/II ont été réalisés, notamment dans le mélanome métastatique. Les peptides utilisés étaient dérivés d'antigènes tumoraux de mélanome appartenant au groupe des antigènes de différenciation (par exemple, MelanA/MART-1, gp100, tyrosinase) et à celui des antigènes "cancers/testicules" (par exemple, MAGE-1 ou 3, NY-ESO-1). Des résultats encourageants ont été obtenus dans certaines études, avec des réponses immunologiques parfois corrélées à la réponse clinique (Rosenberg, Yang et al. 1998; Marchand, van Baren et al. 1999; Jager, Gnjjatic et al. 2000). Des peptides ont également été utilisés pour immuniser des patients atteints d'autres tumeurs, comme les tumeurs du colon, de l'ovaire, du sein, du pancréas et les carcinomes cervicaux. En effet, des résultats intéressants ont été observés chez des patients atteints d'adénocarcinome pancréatique vaccinés avec des peptides dérivés d'un oncogène Ras muté. Une réponse T spécifique a été obtenue dans 58% des cas, associée à une survie prolongée chez les patients présentant un cancer avancé (Gjertsen, Buanes et al. 2001). Par ailleurs, des patientes atteintes de cancer du sein et de l'ovaire, dont la tumeur exprimait l'antigène tumoral HER-2/neu, ont été vaccinées avec des peptides HER-2/neu contenant à la fois des épitopes *helper* et des motifs HLA-A2-restreints. Cette étude a montré l'induction d'une réponse T spécifique durable dans la majorité des cas (Knutson, Schiffman et al. 2001; Curiel, Coukos et al. 2004). Enfin, les résultats obtenus par l'équipe de Molldrem confirment l'intérêt de la vaccination peptidique en montrant la possibilité d'obtenir une rémission complète chez des patients atteints de leucémie myéloïde vaccinés par le peptide PR1 de la protéinase 3 (Qasilbash, Wieder et al. 2004). Ces résultats intéressants restent cependant à nuancer par l'existence d'un obstacle majeur à la vaccination peptidique, représenté par la restriction HLA. La plupart des essais évoqués ci dessus ont utilisé des peptides classe I-restreints et se sont limités à des patients exprimant un phénotype HLA particulier, tel HLA-A1 ou HLA-A2. La situation semble toutefois différente en ce qui concerne les molécules HLA de classe II. Dans la mesure où la poche de fixation peptidique n'est pas close, la fixation de peptides à ces molécules est moins contrainte que pour les molécules HLA de classe I et certains peptides sont capables de se fixer à un nombre élevé d'isotypes HLA de classe II (peptides *HLA II promiscuous*) (Panina-Bordignon, Tan et al. 1989; Alexander, Sidney et al. 1994; Southwood, Sidney et al. 1998).

Avant mon arrivée au laboratoire, l'équipe avait identifié des peptides HLA II *promiscuous* dérivés des antigènes de latence de type II d'EBV (Depil, Angyalosi et al. 2006; Morales, Depil et al. 2012), à savoir EBNA1, LMP1 et LMP2. Vingt-quatre peptides ont dans un premier temps été sélectionnés par l'utilisation du logiciel de prédiction TEPITOPE. Les tests de liaison ont ensuite permis de ne retenir que 6 peptides. Ces 6 peptides possèdent chacun une très bonne affinité pour au moins 7 des 12 molécules HLA II testées. L'association de ces 6 peptides en un cocktail permettait donc en théorie sa reconnaissance par une grande majorité de la population. L'immunogénicité des peptides a ensuite été évaluée en immunisant des souris Aβ° transgéniques pour la molécule HLA-DR1. Ceci a permis de mettre en évidence une réponse cellulaire et humorale spécifique, évocatrice d'une réponse CD4 de type Th1 (sécrétion d'IL-2 et d'IFN-γ, production d'anticorps avec mise en évidence d'IgG2b). Nous avons également montré que ces peptides contenaient des épitopes T CD4+ naturellement présentés au cours de l'infection virale et reconnus par des lymphocytes T CD4+ humains issus de donneurs exprimant des génotypes HLA II variés. La fréquence des cellules mémoires spécifiques des peptides du cocktail, mesurée par ELISPOT, est apparue particulièrement faible (22 à 167 SFC pour 10⁶ PBMC déplétés en lymphocytes T CD8). Cette observation est en parfait accord avec des études antérieures (Leen, Meij et al. 2001) et traduit l'absence d'expansion CD4 significative lors de l'infection à EBV. Soulignons que la faiblesse "physiologique" de la réponse T CD4 mémoire envers les antigènes de latence de type II d'EBV est un argument pour stimuler celle-ci dans les tumeurs de latence II.

Lors de mon arrivée au laboratoire, j'ai eu la chance de participer à une étude déjà en cours, dans laquelle nous avons validé l'effet spécifique du cocktail en confirmant le développement d'une forte réponse cytokinique de type Th1 après une seule stimulation et ce sur une période de 12 jours. Nous avons pu déterminer que le profil de sécrétion de cytokines des cellules T CD4+ était principalement gouverné par la sécrétion massive et soutenue d'IFN-γ, une libération précoce d'IL-2 et une sécrétion soutenue de TNF-α (à des taux moins importants). On retrouve ce profil pour pratiquement chacun des peptides et surtout pour le cocktail, suggérant qu'il existe une réelle complémentarité entre les peptides au sein du cocktail. Parallèlement, aucune sécrétion majeure de cytokines du type Th2 (IL-4, IL-10) ou régulatrice (IL-10, TGF-β) n'a été observée. Dans nos premiers essais, le screening de la réponse cytokinique aux peptides avait déjà mis en évidence une sécrétion d'IL-10, mais ces premiers résultats étaient enregistrés à 5 jours, ce qui est tout à fait en accord avec nos résultats actuels. Ces derniers mettent en évidence une sécrétion d'IL-10 précoce et mesurable sur une huitaine de jours, mais qui ne fera que

diminuer dans le temps jusqu'à atteindre un seuil équivalent à celui de cellules non-stimulées. Cette analyse a été confirmée au niveau génique avec un profil d'expression identique des marqueurs liés à l'activation. La production d'IFN- γ sans production d'IL-10 confirme bien la mise en place d'une réponse Th1. Par ailleurs, notre cocktail de peptides n'induit pas la production de cytokines immunosuppressives dans le microenvironnement déjà défavorable connu au sein des tumeurs associées à EBV. A l'heure actuelle, dans des protocoles de thérapie anti-tumorale, la sécrétion d'IFN- γ est considérée comme une preuve de l'activation d'une réponse Th1 de part son effet. En effet, l'IFN- γ a un effet pléiotropique sur les cellules tumorales et leur microenvironnement. L'IFN- γ a une forte implication dans les processus anti-tumoraux puisqu'il augmente l'immunogénicité des cellules tumorales, et qu'il stimule la réponse immune locale (Ikeda, Old et al. 2002; Rosenzweig and Holland 2005). Ainsi, des souris transgéniques (IFN γ -R $^{-/-}$ ou STAT1 $^{-/-}$) dont les déficiences résultent en une perte d'activité de l'IFN- γ auront un plus grand nombre de tumeurs, qui seront de surcroît plus agressives (Kaplan, Shankaran et al. 1998). L'IFN- γ augmente la présentation antigénique par les molécules du CMH des deux classes (Weber and Rosenberg 1988; Boehm, Klamp et al. 1997), inhibe la prolifération des cellules tumorales (Pfizenmaier, Bartsch et al. 1985; Coughlin, Salhany et al. 1998) et active les macrophages (augmentation de la phagocytose, production de cytokines pro-inflammatoires, etc.) (Xie, Whisnant et al. 1993; Boehm, Guethlein et al. 1998; Folkman 1998). De même, dans la perspective d'essais thérapeutiques, la sécrétion d'IFN- γ serait à l'avantage d'un monitoring aisé lors d'essais de vaccination. Si l'on considère l'IFN- γ comme un bio-marqueur de la réponse effectrice, une mesure rapide en ELISA (Luminex) ou par ELISPOT pourrait être ici facilement envisagée. D'autant que l'ELISPOT-IFN- γ est devenu une des techniques les plus fiables (robustesse et reproductibilité) dans le *monitoring* de la réponse immune non seulement lors d'essais *in vitro* mais aussi *in vivo* dans la mesure où les essais se basent sur des procédures (protocoles et analyses) standardisées (Zhang, Caspell et al. 2009).

Ainsi, l'ensemble des travaux auquel j'ai participé au cours de ma thèse, confirme que les peptides EBV orientent la réponse immune vers la voie Th1 avec une activation de TCD4+ mémoires sécréteurs d'IFN- γ et cytotoxiques contre des lignées EBV spécifiques. L'activation spécifique du système immunitaire effecteur cytotoxique en dehors de toute activation du système suppresseur, nous permet sérieusement d'envisager la mise en place d'essais cliniques de phase I/II. De plus, la variété des cibles lysées, nous conforte dans l'idée de pouvoir utiliser ce cocktail en ciblant non seulement les tumeurs de latence II, mais aussi celle de latence III comme le suggère les résultats intéressants obtenus sur les LCL (Latence III). Ces essais permettront alors de mettre en place des

protocoles de vaccination ou de thérapie cellulaire chez des patients en rémission (mais à risque élevé de rechute) et chez des patients réfractaires aux traitements conventionnels.

Jusqu'à présent, les stratégies thérapeutiques des tumeurs malignes liées à la latence type II, tel que le CNP, ont été élaborées en ciblant principalement l'activation des LT CD8 en tant que cellules effectrices (Amon and Farrell 2005), ou en utilisant LT CD8 polyclonaux, autologues ou allogéniques, spécifiques d'EBV ou des LMP. Les résultats obtenus ont été relativement décevants car ils ont abouti au développement de réponses partielles transitoires et non spécifiques. En effet, même s'il a été observé une diminution de la charge virale plasmatique, celle-ci n'a pas été accompagnée d'un effet clinique significatif. Cette absence d'effet clinique couplée à un manque de spécificité rend de telles thérapies inefficaces dans le CNP. C'est pourquoi l'équipe a souhaité développer une stratégie d'immunothérapie axée sur la stimulation des LT CD4 par des peptides dérivées des antigènes de latence II d'EBV. L'objectif étant d'induire une activation immunitaire spécifique pour ralentir la progression des pathologies malignes associées à ce type de latence. Il est très bien décrit que les LT CD4, lymphocytes effecteurs/helpers jouent un rôle important dans l'établissement de la défense immunitaire adaptative. Ils sont essentiels (i) au processus de commutation isotypique pour la formation d'anticorps par les lymphocytes B, (ii) ils jouent un rôle au premier plan dans l'activation et la croissance des cellules T CD8, et (iii) ils augmentent l'activité des phagocytes tels que les macrophages. Les T CD4+ jouent donc un rôle majeur dans l'activation du système immunitaire. Il est admis que tout système immunitaire sans une correcte activation et maturation des lymphocytes CD4 en LT helper (Th1, sécrétant des cytokines effectrices) et LT mémoire (contre des réinfections), sera incomplet et inefficace. Par ailleurs, il est décrit que l'activation des T CD4+ peut dans certaines conditions infectieuses, produire eux-mêmes des effets cytotoxiques (Delhem, Hadida et al. 1998).

Comme nous l'avons vu précédemment, le CNP est caractérisé par un microenvironnement immunosuppresseur spécifique, liée à une augmentation de l'infiltration des Treg (CD4+ Foxp3+ CD25high) qui peuvent représenter jusqu'à 12% du total des lymphocytes infiltrant la tumeur (Lau, Cheng et al. 2007). De plus, cet environnement est aggravé par la présence massive d'exosomes de CNP tumoraux contenant la Gal-9, ligand spécifique du récepteur de mort Tim-3 exprimé sur les LT CD4 Th1 (Klibi, Niki et al. 2009). Ainsi, en étant à l'origine de l'inhibition de la réponse immunitaire systémique et anti-tumorale, les exosomes sont des acteurs principaux de cette

immunosuppression. Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que les exosomes tumoraux puissent représenter une barrière potentielle à l'utilisation de notre cocktail peptidique dans le traitement du CNP.

Pour évaluer cette hypothèse, nous avons purifié et caractérisé des exosomes tumoraux à partir de CNP xénotransplantés dans des souris immunodéficientes de type SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency). Comme décrit dans la littérature, les exosomes que nous avons obtenus ont les caractéristiques phénotypique attendus, à la fois par la taille et par l'expression des marqueurs communs des exosomes comme CD63 et HLA-DR et spécifiques des exosomes de CNP comme LMP-1, Gal-9... (Klibi, Niki et al. 2009). De plus, les exosomes obtenus sont fonctionnellement actifs dans la mesure où nous montrons qu'ils conservent leurs propriétés immunosuppressives comme décrit dans la littérature (Klibi, Niki et al. 2009). Par ailleurs, le fait que ces exosomes tumoraux soient bien capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ autologues, valide l'hypothèse selon laquelle ils pourraient représenter un obstacle potentiel à l'utilisation du cocktail peptidique. En effet, ils pourraient inhiber les T CD4⁺ spécifiques que nous générons suite à la stimulation avec les peptides EBV. En outre, concernant l'induction d'une prolifération des T CD4⁺ humains par les exosomes de donneurs sains, ce résultat n'est pas surprenant. En effet, les travaux de L. Zitvogel montrent que des exosomes isolés de culture de cellules dendritiques saines produisent des exosomes capables d'activer les cellules immunitaires et donc que ces exosomes « sains » pourraient potentiellement être utilisés en thérapeutique (Viaud, Thery et al. 2010).

Il est intéressant de noter que certains exosomes tumoraux, comme les exosomes de CNP, possèdent des propriétés immunosuppressives alors que d'autres exosomes sont dotés de propriétés immunodulatrices et effectrices. Il est aujourd'hui bien établi que les exosomes jouent un rôle important dans la réponse immune. Ces nanovésicules sont non seulement sécrétées par les cellules immunitaires, mais elles sont potentiellement sécrétées par tous les types cellulaires ce qui leur confère des fonctions très larges au-delà de leurs fonctions immunologiques. Il leur a été attribué des fonctions en neurobiologie, dans les cellules souches et dans les cancers. Leurs applications cliniques en tant que biomarqueurs ou des outils thérapeutique a connu une évolution importante lors de ces dernières années (Bobrie, Colombo et al. 2011). Je vais discuter ici de leur implication dans la réponse immune en tant qu'activateur, mais également de leur potentiel immunosuppressif notamment dans les tumeurs.

Une fois sécrétés par la cellule dans le milieu extracellulaire, les exosomes vont être au contact de la matrice extracellulaire et vont interagir avec d'autres cellules par de multiples mécanismes. Les exosomes portant à leur surface des cytokines, des récepteurs ou des ligands vont aller se fixer sur les cellules qui expriment le récepteur ou le ligand correspondant et induire un signal. D'autres mécanismes plus complexes ont été décrits, ils impliqueraient le transfert du contenu piégé dans l'exosome à la cellule réceptrice suite à l'adhésion à celle-ci et l'internalisation en compartiments d'entocytose ou la fusion avec la membrane plasmique. Les exosomes, originaires de tous types de cellules, porteraient constamment des molécules d'adhésion ce qui favoriserait leur capture par les cellules receveuses.

Il est en effet connu que l'initiation de la réponse immune nécessite la présentation de peptides antigéniques chargés par les molécules de CMH de classe I ou II et présentés par des CPA. Certains exosomes ont la capacité de jouer le rôle de présentateur d'antigène puisqu'ils portent le matériel antigéniques et des complexes CMH-peptide ce qui a initié l'idée de leur utilisation comme présentateurs d'antigènes. Dans ce sens, plusieurs travaux ont décrit l'activation de la réponse immune par des exosomes de DCs pulsées avec des peptides ou mis en contact d'exosomes portant des antigènes spécifiques qui seront dégradés par les DCs en peptides et présentés aux cellules T. Une activation des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ a été observée, et dans plusieurs travaux il a été décrit la capacité de ces exosomes à induire des clones de CTL et une activation antigène spécifique des LT CD4⁺ (Chaput and Thery 2011). Dans les deux cas de présentation antigénique médiée par le CMH I ou le CMH II, les DCs matures induisent une activation plus efficace des cellules T que les DCs immatures (Segura, Nicco et al. 2005; Admyre, Johansson et al. 2006; Muntasell, Berger et al. 2007).

Outre les molécules du CMH, les exosomes portent de nombreuses protéines pouvant moduler la réponse immune, impliquant des voies non antigène-spécifiques. Dans le cancer, des exosomes obtenus à partir de lignées tumorales ou de patients ayant une tumeur induisent l'apoptose des cellules T via FasL (Andreola, Rivoltini et al. 2002) et galectine-9 (Klibi, Niki et al. 2009). De plus ces exosomes peuvent inhiber la prolifération des cellules T induite par l'IL-2 (Clayton, Mitchell et al. 2007), promouvoir leur différenciation en Treg (Szajnik, Czystowska et al. 2010), réduire la prolifération des LT CD8⁺ (Wieckowski, Visus et al. 2009), diminuer la réponse cytotoxique des cellules NK et affectent la différenciation des monocytes en DCs (Ashiru, Boutet et al. 2010). Les exosomes tumoraux semblent ainsi jouer un rôle pléiotropique afin de subvertir le développement d'une réponse immune anti-tumorale. D'autre part, les exosomes relargués par divers cellules infectées par un virus montrent des effets délétères sur la réponse immune de

l'hôte et favorisent la propagation de l'infection. Par exemple, des cellules infectées par le VIH sécrètent des exosomes possédant une activité pro-apoptotique dans les cellules T non-infectées (Lenassi, Cagney et al. 2010). L'infection par EBV, des cellules B ou des cellules du CNP sécrètent des protéines immunosuppressives telles que LMP1 et la galectine-9 qu'on retrouve sur les exosomes, et vont inhiber les activités des cellules T (Klibi, Niki et al. 2009).

Les exosomes représentent ainsi une sous-population de vésicules membranaires sécrétées présentant de nombreuses fonctions immunes spécifiques et contradictoires selon leur origine avec un fort potentiel d'applications dans de nombreuses pathologies, en particulier dans les pathologies tumorales. Il est donc nécessaire de prendre en considération toutes les fonctions médiées par les exosomes et d'essayer de mettre au profit du patient leurs capacités à induire la réponse immunitaire puisqu'ils véhiculent les antigènes nécessaires à son activation tout en tenant compte de la nécessité de limiter leurs effets immunosuppresseurs afin d'obtenir une « balance » positive chez le patient.

Avant d'évaluer l'impact des exosomes de CNP dans notre stratégie d'immunothérapie, il était important dans un premier temps, de s'assurer de l'immunogénicité des peptides EBV dans le contexte du CNP. Les résultats que nous avons obtenus montrent que les peptides sont actifs sur les PBMC, comme en atteste l'induction de la prolifération et la production de l'IFN- γ qui est une cytokine principalement produite dans un contexte anti-tumorale. Mais surtout, le fait que ces PBMC aient été pré-incubés avec des cellules tumorales de CNP avant d'être restimulés suggèrent que nous faisons bien appel à une réponse mémoire. Cette réponse est très importante après 72h d'incubation et se maintient à 144h même si elle diminue. Rappelons que nous sommes dans un système *ex vivo* et qu'il est difficile de maintenir des cellules primaires très longtemps en culture. On peut supposer que cette réponse soit plus soutenue *in vivo* dans un contexte physiologique. Par ailleurs, la différence de prolifération obtenue pour chacun des donneurs est liée à la variabilité inter-individuelle. Ainsi, les résultats obtenus confortent et soutiennent l'idée que le cocktail peptidique, est non seulement capable d'activer des LT CD4 isolés des LH (Depil, Angyalosi et al. 2006), mais ils peuvent aussi activer les PBMC préalablement sensibilisées par des cellules CNP EBV+. Il serait intéressant en perspective de ce travail, de valider la capacité des peptides EBV à activer des PBMC isolés de patients présentant un CNP. Pour ce faire, nous avons déjà récupéré quelques échantillons de patients algériens (Collaboration avec le Dr Rafa Hayet, Hôpital Maillot, Alger) et le recrutement prospectif des patients est actuellement en cours sur 2 autres centres hospitaliers

différents : Institut Gustave roussy (Dr P. Busson, Paris), Centre Oscar Lambret (Pr E. Lartigueau, Lille) et hôpital Maillot (Dr H. Rafa, Alger). Nous évaluerons notamment la capacité des peptides EBV à réactiver les PBMC isolés du sang des patients, en monitorant, par ELISPOT, la capacité des T CD4+ à produire de l'IFN- γ .

L'étape suivante a été de s'assurer que les lignées T CD4+ spécifiques d'EBV que nous générons, par des présentations répétées des 6 peptides EBV, soient bien capables de lyser les cellules tumorales de CNP. Les résultats que nous avons obtenus montrent très clairement que ces lignées T CD4+ induisent une lyse spécifique des cellules tumorales. On a pu mettre en évidence la lyse de 3 lignées différentes de CNP, validant ainsi l'efficacité du cocktail peptidique. Nous avons également observé que les lignées T CD4+ induisaient une lyse des cellules de CNP CNE-1 décrites comme EBV négatives. Cependant cette lyse n'excédait pas 20%, ce qui représente probablement l'activité cytotoxique basale généralement décrite au sein d'une lignée cellulaire oligoclonale enrichie en lymphocytes T CD4+. Cette lyse "apparemment" non spécifique pourrait également s'expliquer par le fait que le statut EBV de la lignée CNE1 est très discuté comme en témoigne la publication de Chang et al, qui ont publié que la lignée CNE-1, généralement décrite comme EBV négative, exprime la protéine de latence LMP1 (Chan, Choy et al. 2008). Et évidemment, cette lyse peut également être liée au simple mismatch HLA entre les effecteurs et les cibles.

L'ensemble de nos expériences de cytolyse, ont été faites en dehors du contexte massif d'exosomes, c'est pourquoi, nous avons refait les mêmes expériences en présence d'exosomes isolés de 2 types cellulaires de CNP (C15 et C-666-1). De façon inattendue, la présence des exosomes tumoraux ne semble pas altérer les capacités de lyse des lignées. Afin de comprendre ce résultat inattendu, nous avons évalué l'impact direct des exosomes tumoraux sur les lignées T CD4+ spécifiques d'EBV. Et là également, de façon inattendue, la présence des exosomes tumoraux ne semble altérer ni la prolifération, ni la viabilité des lignées, alors que les T CD4+ conventionnels autologues sont eux très sensibles à l'effet immunosuppresseur des exosomes. De la même manière, la Gal-9S recombinante n'a aucun effet sur les lignes EBV spécifiques. Pourtant, nous montrons très clairement que les lignées EBV spécifiques sont bien sensibles à d'autres immunosuppresseurs tels que la ciclosporine A. Il serait intéressant par la suite de déterminer au niveau moléculaire, comment ces lignées qui expriment pourtant Tim3 sont résistantes à la galectine-9. En effet, nous pourrions suggérer qu'une sous-expression de Tim3 puisse expliquer

cette insensibilité aux exosomes Gal9+. Cependant les résultats préliminaires que nous avons obtenus, par cytométrie de flux, montrent que les lignées cellulaires expriment le marqueur Tim3, à un niveau identique que celui observé dans les T CD4+ conventionnels activés. En outre, de façon très intéressante, nous avons observé, par PCR quantitative en temps réel, une surexpression du gène codant la Granzyme B dans les lignées EBV spécifiques (Morales, Depil et al. 2012). Or, il a été récemment décrit que la surexpression de Granzyme B dans des lignées T CD4+ cytotoxiques favorisait leur résistance à la Gal9 (Nagahara, Arikawa et al. 2008). Bien évidemment, cette piste aura besoin d'être évaluée par des expériences complémentaires.

Après avoir obtenu *in vitro* des éléments en faveur de l'utilisation des peptides « vaccinaux » dans le contexte du CNP et ce malgré la présence des exosomes tumoraux, nous avons souhaité valider *in vivo* l'efficacité des peptides dans le cadre d'une vaccination peptidique directe. Nous avons évalué l'effet anti-tumoral de la vaccination par les peptides EBV par 2 approches, d'une part en mesurant manuellement l'évolution du volume tumoral et d'autre part en mesurant la bioluminescence émise par les cellules tumorales de CNP (C666.1-Luc)

Dans un premier temps, la mesure du poids des souris dans les différents groupes montre que la vaccination et/ou la reconstitution avec des PBMC ; ne modifient pas le poids de la souris (résultats non montrés). En effet, en analysant les courbes, on observe une évolution du poids au cours du temps, correspondant à la prise de poids normale des souris SCID. Par contre, concernant la mesure directe du volume de la tumeur, on voit très clairement une nette différence entre le groupe vacciné et reconstituée, et la moyenne des autres groupes, avec une diminution globale de 50%. Ainsi, la reconstitution immunitaire couplée à une vaccination (+ 2 rappels) permet au volume de la tumeur d'être stabilisé au cours du temps et reste bien inférieur aux autres groupes. De façon intéressante, mais pas surprenante on observe également que le simple fait d'ajouter des PBMC dans le modèle SCID-CNP peut diminuer la croissance tumorale. Ce résultat s'explique probablement par l'induction et l'activation d'une réponse immunitaire des PBMC humains contre le CNP. On remarque également, mais à moindre mesure, que l'injection des peptides EBV couplé à l'adjuvant semble être favorable. On peut imaginer que cette réponse soit liée à la présence de l'adjuvant qui est connu pour favoriser un environnement pro-inflammatoire et qui pourrait, ainsi, induire l'activation des NK résiduels de la souris, dans la mesure où cette souris SCID a des NK fonctionnels (Delhem, Hadida et al. 1998).

Les données de bioluminescence tumorale que nous avons obtenues permettent de conforter ces résultats. On remarque notamment, dans le groupe de souris reconstituées et vaccinées, que les rappels faits au jour 8 et le 21 montrent une diminution reproductible de la bioluminescence. Les données sont différentes pour les autres groupes, dans lesquels on observe une augmentation constante de la bioluminescence même après les 2 rappels vaccinaux. Il convient de noter que dans les derniers jours de l'expérimentation, une nécrose tumorale est observée dans quelques unes des tumeurs récupérées au sacrifice. Cette nécrose est visible dans les différents groupes de souris, sauf dans le groupe des souris reconstituées et vaccinées. Cette nécrose tumorale peut entraîner une diminution dramatique de la bioluminescence. Par ailleurs, comme nous avons pu l'observer précédemment (lors des mesures directes de la tumeur), on remarque que le simple fait d'ajouter les PBMC humains ou les peptides EBV dans le modèle SCID-CNP, peut diminuer la croissance tumorale. En perspective de ce travail, nous souhaiterions reproduire l'expérience *in vivo* (c'est d'ailleurs en cours). Nous compléterons cette étude par des analyses en immunohistochimie et immunofluorescence, en recherchant la présence d'un infiltrat inflammatoire humain au sein de la tumeur (utilisation d'anticorps anti-CD3, CD4 et CD8). Dans un deuxième temps, nous souhaiterions utiliser ce même modèle SCID-Hu-CNP pour évaluer *in vivo* des stratégies de thérapies cellulaires. Cette thérapie consisterait à transférer *in vivo* des lignées T CD4+ autologues spécifiques des peptides EBV.

Ainsi, les résultats obtenus au cours de ma thèse permettent de consolider l'hypothèse selon laquelle les six peptides EBV, pourrait être utilisés chez les personnes atteintes d'un carcinome du nasopharynx. L'objectif principal n'est pas de remplacer les protocoles et les thérapies utilisés à ce jour, mais d'arriver en complément des protocoles thérapeutiques standards. Ces peptides vaccinaux pourraient être utilisés chez les patients réfractaires, combattre la maladie résiduelle, mais aussi être utilisés chez les patients présentant des rechutes, malheureusement très fréquentes et très agressives dans le CNP

Le processus de différenciation des T CD4+ est fortement influencé par le microenvironnement (cytokines, nature du pathogènes...) créé au préalable par la réponse primaire (innée). Ainsi, l'IFN- γ produit en amont par les NK ajouté à l'IL-12 et l'IL-18 produits par les DCs et autres CPA favorisera l'engagement des TCD4+ vers une réponse Th1. De ce point de vue, il aurait été intéressant de sortir des cellules présentatrices d'antigènes *ex vivo* et de leur soumettre nos peptides afin de confirmer une production d'IL-12 et d'IL-18, puis d'isoler des NK

pour les activer avec ces cellules dendritiques pulsées et doser la production d'IFN- γ résultante (Malmgaard and Paludan 2003; Reading, Whitney et al. 2007). Assembler ces données aurait très certainement permis de confirmer le potentiel de nos peptides en tant que puissants inducteurs de la voie Th1. Le développement d'une réponse innée de nature à créer les conditions préférentielles d'une polarisation Th1 est selon moi un des points les plus importants dans le développement d'un produit vaccinal à visée anti-tumorale. Cette problématique peut se résoudre par l'association d'adjuvants. Un vaccin sous-unitaire, comme celui que nous proposerions, nécessiterait en effet une adjuvantation adéquate capable d'amplifier et d'orienter la réponse immune spécifique sans en être la cible. En première instance, nous avons utilisé, lors des protocoles d'immunisation des souris SCID humanisées, du Montanide ISA 720. Cet adjuvant immunostimulant expérimental a déjà été utilisé chez l'homme lors d'essais cliniques, et a prouvé sa capacité à délivrer plusieurs épitopes peptidiques (Lawrence, Saul et al. 1997; Lawrence, Cheng et al. 2000; Toledo, Baly et al. 2001; Hersey, Menzies et al. 2005; Oliveira, Wetzel et al. 2005; Saul, Lawrence et al. 2005). Cependant, sur les quinze dernières années, de nouveaux composés ont commencé à faire leurs preuves en tant qu'agents de choix dans l'adjuvantation des préparations vaccinales à visée anti-tumorale, dont les Cytosine-phosphorothioate-Guanine OligoDeoxyNucléotides (CpG ODN). Ces derniers ont la capacité d'induire des réponses qui sont très nettement de type Th1 comme en témoigne l'importante sécrétion d'IL-12 et d'IFN- γ qu'ils stimulent (Halpern, Kurlander et al. 1996; Carson and Raz 1997). Cet effet passe par l'interaction des CpG avec le toll-like récepteur 9 (TLR9) (Dalpke, Zimmermann et al. 2002). Les CpG ODN sont ainsi adsorbés par endocytose et se fixent au TLR9 présent à l'intérieur d'endosomes intracellulaires, des cellules dendritiques plasmacytoïdes et des lymphocytes B (Iwasaki and Medzhitov 2004) qui l'expriment de manière constitutive, et aussi dans les cellules T CD4 (Gelman, LaRosa et al. 2006). Ils peuvent également inhiber une réponse Th2 déjà installée et l'orienter vers une réponse de type Th1 (Chu, Targoni et al. 1997). L'activation des TLR9 avec les CpG ODN a permis le développement d'une réponse cytokinique de type Th1 dans des lymphomes non-Hodgkiniens suggérant qu'il s'agirait d'une voie possiblement complémentaire à d'autres traitements (Friedberg, Kim et al. 2005; Link, Ballas et al. 2006). Les mécanismes thérapeutiques proposés, suite au traitement de ces tumeurs TLR9+ par des CpG ODN, incluent une induction préférentielle de l'apoptose des cellules tumorales accompagnée d'une augmentation de leur immunogénicité (Jahrsdorfer, Muhlenhoff et al. 2005; Jahrsdorfer, Wooldridge et al. 2005). Une étude expérimentale a permis d'évaluer l'effet des CpG ODN comme adjuvant du peptide HPV 16 E7 sur des tumeurs induites par HPV. La combinaison des deux était plus efficace que chaque

produit seul en prophylactique mais aussi en thérapeutique ; de même, une forte augmentation du nombre de lymphocytes a pu être observée dans la rate et la tumeur des animaux traités par la combinaison peptide/CpG ODN (Gendron, Rodriguez et al. 2006). Une autre équipe a observé une réponse immunologique et anti-tumorale contre des cancers du colon exprimant MUC-1 en immunisant des souris avec une combinaison de peptides MUC1 classe I et classe II, du GMCSF et des CpG ODN (Mukherjee, Pathangey et al. 2007). Des combinaisons d'agents immuno-stimulateurs semblent donc requises pour obtenir la meilleure réponse immune, dans ce contexte les CpG ODN contribueraient de manière plus efficace que les adjuvants actuellement validés (Kim, Ragupathi et al. 2000). Alors qu'il a bien été montré que les cellules B transformées par EBV comme d'autres cellules B néoplasiques (EBV+ ou EBV-) exprimaient le TLR9 (Bourke, Bosisio et al. 2003), aucune étude n'a été réalisée sur des tumeurs EBV+ à ma connaissance. Dans ce contexte, aux vues de la redondance des effets des CpG ODN et de notre cocktail peptidique, il serait intéressant d'étudier de prime abord les effets d'une combinaison CpG ODN/cocktail peptidique EBV *in vivo* dans notre modèle de souris SCID humanisées, puis de vérifier le potentiel immuno-stimulateur *ex vivo* chez le porteur sain et enfin en condition pathologique sur des cellules de patients présentant une pathologie maligne associée à la latence II de l'EBV.

Un protocole d'immunothérapie active directe par vaccination peptidique associée à un adjuvant immuno-stimulateur utilisant le cocktail peptidique pourrait être envisagé chez des patients atteints de tumeur associée à l'EBV de mauvais pronostic. L'immuno-suppression intense existant dans la maladie de Hodgkin et dans le CNP, ainsi que la présence de Treg au diagnostic incitent à n'envisager une stratégie de vaccination peptidique que chez des patients en rémission après traitement. Cette vaccination aurait pour but de contrôler la maladie résiduelle et diminuer ainsi les risques de rechute, même si en théorie, un tel traitement pourrait détruire la tolérance immune préexistante. Dans ce contexte, la chimiothérapie réalisée au préalable pourrait inhiber d'éventuelles cellules T régulatrices pré-existantes (Marshall, Christie et al. 2004). Une étude clinique a montré par exemple que le Thalidomide (en combinaison à la Fludarabine), détruit les cellules cancéreuses leucémiques, et bien que n'agissant pas sur le niveau de cellules T CD3+, engendre une diminution du nombre de cellules T régulatrices CD4+CD25+ (Giannopoulos, Dmoszynska et al. 2009). Une autre possibilité est l'utilisation du cocktail peptidique pour générer *ex vivo* des cellules T CD4 (d'origine autologue ou allogénique) EBV-spécifiques, administrées au patient après une étape d'expansion. Certaines conditions de culture pourraient alors favoriser le développement de lymphocytes T CD4+ de type Th1. Cette approche pourrait être privilégiée chez

des patients ayant obtenu une réponse de moins bonne qualité et pour lesquels la vaccination apparaît trop incertaine. Dans tous les cas, il sera intéressant d'analyser si le fait d'accroître le nombre de cellules T CD4 EBV-spécifiques *in vivo* s'accompagne d'une augmentation des réponses T CD8 dirigées contre les antigènes LMP1 et LMP2. Plusieurs épitopes classe I-restreints dérivés de ces protéines sont en effet connus, permettant un suivi des réponses T CD8 par tétramères (cf. tableaux supplémentaires dans la revue d'Hislop et al en 2007). Des peptides contenant ces épitopes T CD8 pourraient également être ajoutés par la suite dans le cocktail vaccinal de manière à stimuler à la fois les réponses T CD4 et CD8 EBV-spécifiques. De ce point de vue, il est intéressant de noter qu'un épitope CD8 est contenu dans le peptide LMP1₆₈₋₈₃. Quelle que soit l'option choisie, la possibilité de réorienter le système immunitaire d'une réponse de type régulatrice vers une réponse effectrice, après réduction tumorale, ouvrirait des perspectives thérapeutiques particulièrement intéressantes, et applicables à d'autres modèles de tumeurs.

Ainsi, l'ensemble de notre étude présente une approche optimale dans la génération d'un produit à fort potentiel d'application thérapeutique. Le lancement d'essais cliniques de phase I/II serait maintenant envisageable pour définir un futur traitement dont nos antigènes seraient le principe actif. L'optimisation de la combinaison des peptides de ce cocktail (en quantité), le dosage, l'adjuvant, le nombre et la voie des injections (pour un vaccin peptidique), etc., sont des paramètres d'importance mais de mise en œuvre onéreuse que seuls des essais cliniques pourront maintenant définir. De façon très intéressante, en termes de retombées médicales, il est à noter que notre cocktail peptidique pourrait être utilisé non seulement dans le cadre de pathologies malignes associées à la latence II d'EBV (maladie de Hodgkin, Carcinome du Nasopharynx, lymphome périphérique NK/T), mais aussi en renfort des protocoles d'immunothérapie contre les lymphoproliférations associées à la latence III d'EBV chez l'immunodéprimé, dans l'espoir d'aider les patients réfractaires aux traitements classiques, de contrôler la maladie résiduelle chez les patients répondeurs aux traitements de premières lignes et de prévenir les rechutes chez les patients à risque.

SYNTHESE

Proposition dans le CNP d'un modèle d'action des peptides EBV et des exosomes tumoraux sur les cellules immunitaires humaines (Figure 37)

Bien qu'ayant eu l'opportunité de participer à de nombreux travaux au cours de ma thèse, mon objectif principal visait à évaluer une stratégie d'immunothérapie peptidique dans le CNP. La mise en place de cette stratégie s'est rapidement heurtée à une nouvelle composante dans le CNP, à savoir la production en quantité importante d'exosomes () à la fois au sein de la tumeur et en périphérie. Ces exosomes tumoraux portent la Galectine 9 (**Gal-9**), qui en se fixant à **Tim3** (principalement exprimé sur les T CD4+ effecteurs : ) induit la mort par apoptose. L'augmentation importante du nombre de Treg :  , dans la tumeur et en périphérie est également une composante immunosuppressive importante à prendre en considération dans la mise en place de notre stratégie d'immunothérapie.

Ce schéma a pour objectif de résumer de façon synthétique les principaux résultats obtenus au cours de ma thèse et de proposer un modèle « hypothétique » d'action et de synergie d'action des différents acteurs au sein du CNP.

Action des Exosomes sur les T effecteurs (Teff) et les Treg

Les exosomes tumoraux de CNP induisent la mort par apoptose des Teff via l'interaction **Gal-9-Tim3**. Par ailleurs, ces exosomes favorisent la prolifération des Treg, en augmentant leur phénotype supresseur et en augmentant leur activité immunosuppressive sur les Teff. Ces exosomes portent la chimiokine **CCL20** qui recrute les Treg en se fixant sur leur récepteur **CCR6**, dont le gène est par ailleurs surexprimé sur les Treg au contact des exosomes de CNP. Ainsi, les exosomes de CNP recrutent fortement les Treg qui pourront alors inhiber la prolifération des Teff au niveau du site tumoral.

Les exosomes de CNP sont également capables de recruter, dans une moindre mesure, les LT CD4+ conventionnels (via l'interaction **CCL20-CCR6**) et d'induire leur conversion en T CD4+CD25^{high} via la cytokine immunosuppressive **TGF-β**. Ces Teff « convertis » en Treg possèdent des propriétés immunosuppressives importantes qui pourront contribuer au microenvironnement immunosuppressif décrit dans le CNP.

Action des Peptides EBV sur les T effecteurs et les Treg

Le cocktail de peptides EBV  induit la prolifération des Teff au niveau périphérique et intra-tumorale. Leur présentation répétée permet de générer des lignées de T CD4+ cytotoxiques capables de lyser spécifiquement des cellules de CNP EBV+. Par ailleurs, les exosomes de CNP n'ont aucun effet délétère sur les lignées T CD4+ EBV-spécifiques et n'induisent aucune modification du phénotype et de la fonction des Treg. L'utilisation du cocktail peptidique vaccinal, permettrait de surmonter l'immunosuppression induite par les exosomes de CNP.

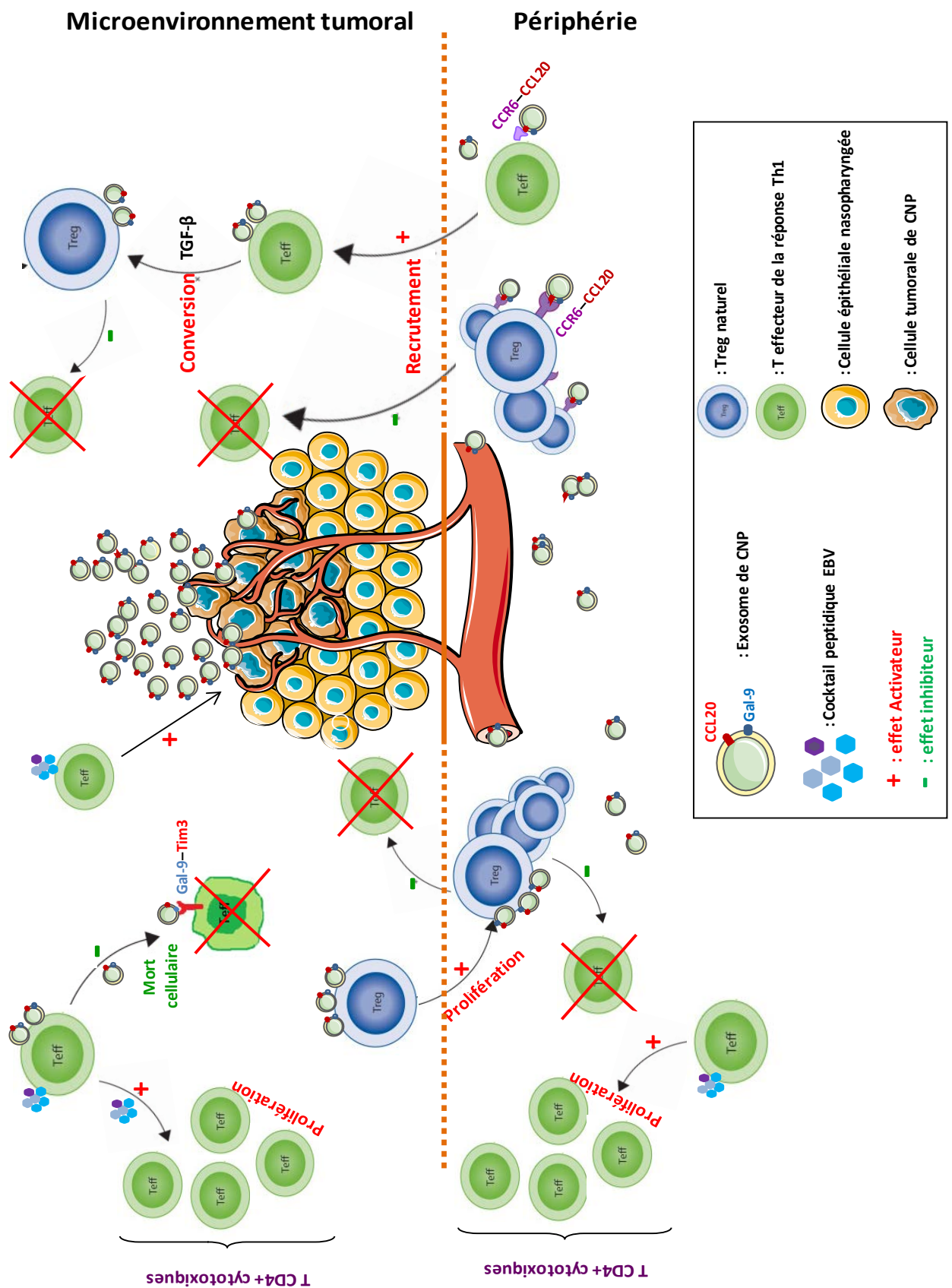


Figure 1 : Hypothèse d'action des exosomes et des peptides EBV sur les cellules immunitaires tumorales et périphériques dans le CNP.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

IX. Références Bibliographiques

- Abedin, M. J., Y. Kashio, et al. (2003). "Potential roles of galectins in myeloid differentiation into three different lineages." J Leukoc Biol **73**(5): 650-6.
- Abusamra, A. J., Z. Zhong, et al. (2005). "Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis." Blood Cells Mol Dis **35**(2): 169-73.
- Adachi, J., C. Kumar, et al. (2006). "The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins." Genome Biol **7**(9): R80.
- Adams, J. M. and S. Cory (2007). "The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy." Oncogene **26**(9): 1324-37.
- Adhikary, D., U. Behrends, et al. (2006). "Control of Epstein-Barr virus infection in vitro by T helper cells specific for virion glycoproteins." J Exp Med **203**(4): 995-1006.
- Admyre, C., S. M. Johansson, et al. (2006). "Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT." Eur J Immunol **36**(7): 1772-81.
- Ahmad, N., H. J. Gabius, et al. (2004). "Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes." J Biol Chem **279**(12): 10841-7.
- Ahn, J. and R. M. Johnstone (1993). "Origin of a soluble truncated transferrin receptor." Blood **81**(9): 2442-51.
- Ahsan, N., T. Kanda, et al. (2005). "Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 plays a critical role in virus production." J Virol **79**(7): 4415-24.
- Akashi, T., H. Oimomi, et al. (2003). "Expression and diagnostic evaluation of the human tumor-associated antigen RCAS1 in pancreatic cancer." Pancreas **26**(1): 49-55.
- Akbar, A. N., N. Borthwick, et al. (1993). "The significance of low bcl-2 expression by CD45RO T cells in normal individuals and patients with acute viral infections. The role of apoptosis in T cell memory." J Exp Med **178**(2): 427-38.
- al-Sarireh, B. and O. Eremin (2000). "Tumour-associated macrophages (TAMS): disordered function, immune suppression and progressive tumour growth." J R Coll Surg Edinb **45**(1): 1-16.
- Albers, A. E., R. L. Ferris, et al. (2005). "Immune responses to p53 in patients with cancer: enrichment in tetramer+ p53 peptide-specific T cells and regulatory T cells at tumor sites." Cancer Immunol Immunother **54**(11): 1072-81.
- Alderson, K. L., Q. Zhou, et al. (2008). "Regulatory and Conventional CD4+ T Cells Show Differential Effects Correlating with PD-1 and B7-H1 Expression after Immunotherapy." J Immunol **180**(5): 2981-8.
- Alexander, J., J. Sidney, et al. (1994). "Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides." Immunity **1**(9): 751-61.
- Algarra, I., A. Collado, et al. (1997). "Altered MHC class I antigens in tumors." Int J Clin Lab Res **27**(2): 95-102.
- Algarra, I., A. Garcia-Lora, et al. (2004). "The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape." Cancer Immunol Immunother **53**(10): 904-10.
- Aline, F., D. Bout, et al. (2004). "Toxoplasma gondii antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against T. gondii infection." Infect Immun **72**(7): 4127-37.
- Almand, B., J. R. Resser, et al. (2000). "Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer." Clin Cancer Res **6**(5): 1755-66.
- Alotaibi, S., J. Kennedy, et al. (2004). "Epstein-Barr virus in pediatric multiple sclerosis." JAMA **291**(15): 1875-9.
- Ambrosini, G., C. Adida, et al. (1998). "Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting." J Biol Chem **273**(18): 11177-82.

- Amon, W. and P. J. Farrell (2005). "Reactivation of Epstein-Barr virus from latency." Rev Med Virol **15**(3): 149-56.
- Amyes, E., C. Hatton, et al. (2003). "Characterization of the CD4+ T cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection." J Exp Med **198**(6): 903-11.
- Andre, F., N. Chaput, et al. (2004). "Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells." J Immunol **172**(4): 2126-36.
- Andreola, G., L. Rivoltini, et al. (2002). "Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles." J Exp Med **195**(10): 1303-16.
- Antman, K. and Y. Chang (2000). "Kaposi's sarcoma." N Engl J Med **342**(14): 1027-38.
- Armstrong, J. M., J. F. Chen, et al. (2001). "Gene dose effect reveals no Gs-coupled A2A adenosine receptor reserve in murine T-lymphocytes: studies of cells from A2A-receptor-gene-deficient mice." Biochem J **354**(Pt 1): 123-30.
- Ashiru, O., P. Boutet, et al. "Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes." Cancer Res **70**(2): 481-9.
- Astigiano, S., B. Morandi, et al. (2005). "Eosinophil granulocytes account for indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated immune escape in human non-small cell lung cancer." Neoplasia **7**(4): 390-6.
- Attwood, J. T. and D. H. Munn (1999). "Macrophage suppression of T cell activation: a potential mechanism of peripheral tolerance." Int Rev Immunol **18**(5-6): 515-25.
- Awwad, M. and R. J. North (1988). "Immunologically mediated regression of a murine lymphoma after treatment with anti-L3T4 antibody. A consequence of removing L3T4+ suppressor T cells from a host generating predominantly Lyt-2+ T cell-mediated immunity." J Exp Med **168**(6): 2193-206.
- Babcock, G. J., L. L. Decker, et al. (1998). "EBV persistence in memory B cells in vivo." Immunity **9**(3): 395-404.
- Babcock, G. J., D. Hochberg, et al. (2000). "The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell." Immunity **13**(4): 497-506.
- Baecher-Allan, C., J. A. Brown, et al. (2001). "CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood." J Immunol **167**(3): 1245-53.
- Baer, R., A. T. Bankier, et al. (1984). "DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome." Nature **310**(5974): 207-11.
- Bai, X. F., J. Liu, et al. (2003). "Antigenic drift as a mechanism for tumor evasion of destruction by cytolytic T lymphocytes." J Clin Invest **111**(10): 1487-96.
- Bai, X. F., J. Q. Liu, et al. (2006). "Different lineages of P1A-expressing cancer cells use divergent modes of immune evasion for T-cell adoptive therapy." Cancer Res **66**(16): 8241-9.
- Baleeiro, R. B. and J. A. Barbuto (2008). "Local secretion/shedding of tumor-derived CD83 molecules as a novel tumor escape mechanism." Mol Immunol **45**(12): 3502-4.
- Banat, G. A., O. Christ, et al. (2001). "Tumour-induced suppression of immune response and its correction." Cancer Immunol Immunother **49**(11): 573-86.
- Barboni, E. A., S. Bawumia, et al. (1999). "Kinetic measurements of binding of galectin 3 to a laminin substratum." Glycoconj J **16**(7): 365-73.
- Barondes, S. H., D. N. Cooper, et al. (1994). "Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins." J Biol Chem **269**(33): 20807-10.
- Barth, S., T. Pfuhl, et al. (2008). "Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5." Nucleic Acids Res **36**(2): 666-75.
- Beauvillain, C., M. O. Juste, et al. (2009). "Exosomes are an effective vaccine against congenital toxoplasmosis in mice." Vaccine **27**(11): 1750-7.

- Beauvillain, C., S. Ruiz, et al. (2007). "A vaccine based on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against *T. gondii* infection in syngeneic and allogeneic mice." Microbes Infect **9**(14-15): 1614-22.
- Bei, J. X., W. H. Jia, et al. (2012). "Familial and large-scale case-control studies identify genes associated with nasopharyngeal carcinoma." Semin Cancer Biol **22**(2): 96-106.
- Bell, A. I., K. Groves, et al. (2006). "Analysis of Epstein-Barr virus latent gene expression in endemic Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma tumour cells by using quantitative real-time PCR assays." J Gen Virol **87**(Pt 10): 2885-90.
- Bennett, C. L., J. Christie, et al. (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." Nat Genet **27**(1): 20-1.
- Berditchevski, F. and E. Odintsova (1999). "Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling." J Cell Biol **146**(2): 477-92.
- Bergmann, C., L. Strauss, et al. (2007). "Expansion and characteristics of human T regulatory type 1 cells in co-cultures simulating tumor microenvironment." Cancer Immunol Immunother **56**(9): 1429-42.
- Bernardi, R. and P. P. Pandolfi (2007). "Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(12): 1006-16.
- Bernstorff, W. V., J. N. Glickman, et al. (2002). "Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand expression in normal pancreas and pancreatic tumors. Implications for immune privilege and immune escape." Cancer **94**(10): 2552-60.
- Betts, G. J., S. L. Clarke, et al. (2006). "Regulating the immune response to tumours." Adv Drug Deliv Rev **58**(8): 948-61.
- Bianchini, R., O. Bistoni, et al. "CD4(+) CD25(low) GITR(+) cells: a novel human CD4(+) T-cell population with regulatory activity." Eur J Immunol **41**(8): 2269-78.
- Bidon, N., F. Brichory, et al. (2001). "Galectin-8: a complex sub-family of galectins (Review)." Int J Mol Med **8**(3): 245-50.
- Blaser, C., M. Kaufmann, et al. (1998). "Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells." Eur J Immunol **28**(8): 2311-9.
- Blazar, B., M. Patarroyo, et al. (1980). "Increased sensitivity of human lymphoid lines to natural killer cells after induction of the Epstein-Barr viral cycle by superinfection or sodium butyrate." J Exp Med **151**(3): 614-27.
- Blobe, G. C., W. P. Schiemann, et al. (2000). "Role of transforming growth factor beta in human disease." N Engl J Med **342**(18): 1350-8.
- Bobrie, A., M. Colombo, et al. "Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses." Traffic **12**(12): 1659-68.
- Bobst, S. M., M. C. Day, et al. (2005). "Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human mesangial cells and induce interleukin-6 and plasminogen activator inhibitor-1 secretion." Am J Hypertens **18**(3): 330-6.
- Boehm, U., L. Guethlein, et al. (1998). "Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma." J Immunol **161**(12): 6715-23.
- Boehm, U., T. Klamp, et al. (1997). "Cellular responses to interferon-gamma." Annu Rev Immunol **15**: 749-95.
- Bollard, C. M., L. Aguilar, et al. (2004). "Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus+ Hodgkin's disease." J Exp Med **200**(12): 1623-33.
- Borner, M. M., P. Brousset, et al. (1999). "Expression of apoptosis regulatory proteins of the Bcl-2 family and p53 in primary resected non-small-cell lung cancer." Br J Cancer **79**(5-6): 952-8.
- Borza, C. M. and L. M. Hutt-Fletcher (2002). "Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus." Nat Med **8**(6): 594-9.

- Bourke, E., D. Bosisio, et al. (2003). "The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells." Blood **102**(3): 956-63.
- Braud, V. M., P. Tomasec, et al. (2002). "Viral evasion of natural killer cells during human cytomegalovirus infection." Curr Top Microbiol Immunol **269**: 117-29.
- Brown, H. J., M. J. Song, et al. (2003). "NF-kappaB inhibits gammaherpesvirus lytic replication." J Virol **77**(15): 8532-40.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, et al. (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." Nat Genet **27**(1): 68-73.
- Buggins, A. G., W. J. Hirst, et al. (1998). "Variable expression of CD3-zeta and associated protein tyrosine kinases in lymphocytes from patients with myeloid malignancies." Br J Haematol **100**(4): 784-92.
- Bultema, R., R. Longnecker, et al. (2009). "Epstein-Barr virus LMP2A accelerates MYC-induced lymphomagenesis." Oncogene **28**(11): 1471-6.
- Burchill, M. A., J. Yang, et al. (2007). "Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis." Immunol Lett **114**(1): 1-8.
- Buschow, S. I., J. M. Liefhebber, et al. (2005). "Exosomes contain ubiquitinated proteins." Blood Cells Mol Dis **35**(3): 398-403.
- Busson, P., K. Braham, et al. (1988). "Constitutive expression of HLA class II antigens on EBV positive malignant cells from nasopharyngeal carcinoma: possible involvement in T cell infiltration." Cancer Detect Prev **12**(1-6): 363-8.
- Busson, P., T. Ooka, et al. (2004). "[Nasopharyngeal carcinomas and Epstein-Barr virus: from epidemiology and detection to therapy]." Med Sci (Paris) **20**(4): 453-7.
- Bynoe, M. S. and C. Viret (2008). "Foxp3+CD4+ T cell-mediated immunosuppression involves extracellular nucleotide catabolism." Trends Immunol **29**(3): 99-102.
- Bystry, R. S., V. Aluvihare, et al. (2001). "B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4." Nat Immunol **2**(12): 1126-32.
- Cahir-McFarland, E. D., K. Carter, et al. (2004). "Role of NF-kappa B in cell survival and transcription of latent membrane protein 1-expressing or Epstein-Barr virus latency III-infected cells." J Virol **78**(8): 4108-19.
- Callan, M. F., C. Fazou, et al. (2000). "CD8(+) T-cell selection, function, and death in the primary immune response in vivo." J Clin Invest **106**(10): 1251-61.
- Callan, M. F., L. Tan, et al. (1998). "Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo." J Exp Med **187**(9): 1395-402.
- Camby, I., M. Le Mercier, et al. (2006). "Galectin-1: a small protein with major functions." Glycobiology **16**(11): 137R-157R.
- Camisaschi, C., C. Casati, et al. (2010). "LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites." J Immunol **184**(11): 6545-51.
- Cao, X., S. F. Cai, et al. (2007). "Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance." Immunity **27**(4): 635-46.
- Carbone, E., G. Terrazzano, et al. (1999). "Recognition of autologous dendritic cells by human NK cells." Eur J Immunol **29**(12): 4022-9.
- Carson, D. A. and E. Raz (1997). "Oligonucleotide adjuvants for T helper 1 (Th1)-specific vaccination." J Exp Med **186**(10): 1621-2.
- Carter, K. L., E. Cahir-McFarland, et al. (2002). "Epstein-barr virus-induced changes in B-lymphocyte gene expression." J Virol **76**(20): 10427-36.

- Catalina, M. D., J. L. Sullivan, et al. (2001). "Differential evolution and stability of epitope-specific CD8(+) T cell responses in EBV infection." J Immunol **167**(8): 4450-7.
- Catalina, M. D., J. L. Sullivan, et al. (2002). "Phenotypic and functional heterogeneity of EBV epitope-specific CD8+ T cells." J Immunol **168**(8): 4184-91.
- Cerimele, F., T. Battle, et al. (2005). "Reactive oxygen signaling and MAPK activation distinguish Epstein-Barr Virus (EBV)-positive versus EBV-negative Burkitt's lymphoma." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(1): 175-9.
- Chabot, S., Y. Kashio, et al. (2002). "Regulation of galectin-9 expression and release in Jurkat T cell line cells." Glycobiology **12**(2): 111-8.
- Chan, K. C. and Y. M. Lo (2002). "Circulating EBV DNA as a tumor marker for nasopharyngeal carcinoma." Semin Cancer Biol **12**(6): 489-96.
- Chan, S. Y., K. W. Choy, et al. (2008). "Authentication of nasopharyngeal carcinoma tumor lines." Int J Cancer **122**(9): 2169-71.
- Chang, Y., C. H. Tung, et al. (1999). "Requirement for cell-to-cell contact in Epstein-Barr virus infection of nasopharyngeal carcinoma cells and keratinocytes." J Virol **73**(10): 8857-66.
- Chappell, D. B., T. Z. Zaks, et al. (1999). "Human melanoma cells do not express Fas (Apo-1/CD95) ligand." Cancer Res **59**(1): 59-62.
- Chaput, N. and C. Thery (2011). "Exosomes: immune properties and potential clinical implementations." Semin Immunopathol **33**(5): 419-40.
- Chatila, T. A., F. Blaeser, et al. (2000). "JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome." J Clin Invest **106**(12): R75-81.
- Chaux, P., N. Favre, et al. (1997). "Tumor-infiltrating dendritic cells are defective in their antigen-presenting function and inducible B7 expression. A role in the immune tolerance to antigenic tumors." Adv Exp Med Biol **417**: 525-8.
- Chen, R. H., M. C. Chang, et al. (1999). "Interleukin-6 inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and signal transducers and activators of transcription 3 pathways." J Biol Chem **274**(33): 23013-9.
- Cheng, Y. J., Y. C. Chien, et al. (2003). "No association between genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, NAT2, and nasopharyngeal carcinoma in Taiwan." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **12**(2): 179-80.
- Chhabra, A., N. G. Chakraborty, et al. (2008). "Silencing of endogenous IL-10 in human dendritic cells leads to the generation of an improved CTL response against human melanoma associated antigenic epitope, MART-1 27-35." Clin Immunol **126**(3): 251-9.
- Chiariotti, L., P. Salvatore, et al. (2004). "Galectin genes: regulation of expression." Glycoconj J **19**(7-9): 441-9.
- Chouaib, S., C. Asselin-Paturel, et al. (1997). "The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction." Immunol Today **18**(10): 493-7.
- Choy, E. Y., K. L. Siu, et al. (2008). "An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival." J Exp Med **205**(11): 2551-60.
- Chu, R. S., O. S. Targoni, et al. (1997). "CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity." J Exp Med **186**(10): 1623-31.
- Chua, D., J. Huang, et al. (2001). "Adoptive transfer of autologous Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells for nasopharyngeal carcinoma." Int J Cancer **94**(1): 73-80.
- Cirone, M., G. Lucania, et al. (2008). "Suppression of dendritic cell differentiation through cytokines released by Primary Effusion Lymphoma cells." Immunol Lett **120**(1-2): 37-41.
- Ciurea, A., L. Hunziker, et al. (2001). "CD4+ T-cell-epitope escape mutant virus selected in vivo." Nat Med **7**(7): 795-800.
- Clayton, A., J. P. Mitchell, et al. (2007). "Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2." Cancer Res **67**(15): 7458-66.

- Cochet, C., D. Martel-Renoir, et al. (1993). "Expression of the Epstein-Barr virus immediate early gene, BZLF1, in nasopharyngeal carcinoma tumor cells." Virology **197**(1): 358-65.
- Cohen, J. I. and K. Lekstrom (1999). "Epstein-Barr virus BARF1 protein is dispensable for B-cell transformation and inhibits alpha interferon secretion from mononuclear cells." J Virol **73**(9): 7627-32.
- Collins, M., V. Ling, et al. (2005). "The B7 family of immune-regulatory ligands." Genome Biol **6**(6): 223.
- Comoli, P., R. De Palma, et al. (2004). "Adoptive transfer of allogeneic Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells with in vitro antitumor activity boosts LMP2-specific immune response in a patient with EBV-related nasopharyngeal carcinoma." Ann Oncol **15**(1): 113-7.
- Comoli, P., R. Maccario, et al. (2005). "Treatment of EBV-related post-renal transplant lymphoproliferative disease with a tailored regimen including EBV-specific T cells." Am J Transplant **5**(6): 1415-22.
- Cooper, D. N. and S. H. Barondes (1999). "God must love galectins; he made so many of them." Glycobiology **9**(10): 979-84.
- Coughlin, C. M., K. E. Salhany, et al. (1998). "Tumor cell responses to IFNgamma affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis." Immunity **9**(1): 25-34.
- Croci, D. O., M. F. Zacarias Fluck, et al. (2007). "Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment." Cancer Immunol Immunother **56**(11): 1687-700.
- Crotzer, V. L., R. E. Christian, et al. (2000). "Immunodominance among EBV-derived epitopes restricted by HLA-B27 does not correlate with epitope abundance in EBV-transformed B-lymphoblastoid cell lines." J Immunol **164**(12): 6120-9.
- Curiel, T. J. (2007). "Tregs and rethinking cancer immunotherapy." J Clin Invest **117**(5): 1167-74.
- Curiel, T. J., G. Coukos, et al. (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." Nat Med **10**(9): 942-9.
- D'Urso, C. M., Z. G. Wang, et al. (1991). "Lack of HLA class I antigen expression by cultured melanoma cells FO-1 due to a defect in B2m gene expression." J Clin Invest **87**(1): 284-92.
- Dai, S., X. Zhou, et al. (2006). "Enhanced induction of dendritic cell maturation and HLA-A*0201-restricted CEA-specific CD8(+) CTL response by exosomes derived from IL-18 gene-modified CEA-positive tumor cells." J Mol Med (Berl) **84**(12): 1067-76.
- Dai, S. Y., R. Nakagawa, et al. (2005). "Galectin-9 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells." J Immunol **175**(5): 2974-81.
- Dalpke, A., S. Zimmermann, et al. (2002). "Immunopharmacology of CpG DNA." Biol Chem **383**(10): 1491-500.
- De Maria, R., L. Lenti, et al. (1997). "Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis." Science **277**(5332): 1652-5.
- de Melo, F. H., D. Butera, et al. (2007). "Biological applications of a chimeric probe for the assessment of galectin-3 ligands." J Histochem Cytochem **55**(10): 1015-26.
- de Vries, T. J., M. Smeets, et al. (2001). "Expression of gp100, MART-1, tyrosinase, and S100 in paraffin-embedded primary melanomas and locoregional, lymph node, and visceral metastases: implications for diagnosis and immunotherapy. A study conducted by the EORTC Melanoma Cooperative Group." J Pathol **193**(1): 13-20.
- Deaglio, S., K. M. Dwyer, et al. (2007). "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." J Exp Med **204**(6): 1257-65.
- Delhem, N., F. Hadida, et al. (1998). "Primary Th1 cell immunization against HIVgp160 in SCID-hu mice coengrafted with peripheral blood lymphocytes and skin." J Immunol **161**(4): 2060-9.

- Demers, M., K. Biron-Pain, et al. (2007). "Galectin-7 in lymphoma: elevated expression in human lymphoid malignancies and decreased lymphoma dissemination by antisense strategies in experimental model." Cancer Res **67**(6): 2824-9.
- Demetriou, M., M. Granovsky, et al. (2001). "Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation." Nature **409**(6821): 733-9.
- Depil, S., G. Angyalosi, et al. (2006). "Peptide-binding assays and HLA II transgenic Abeta degrees mice are consistent and complementary tools for identifying HLA II-restricted peptides." Vaccine **24**(13): 2225-9.
- Depil, S., O. Morales, et al. (2007). "Determination of a HLA II promiscuous peptide cocktail as potential vaccine against EBV latency II malignancies." J Immunother **30**(2): 215-26.
- Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." Genes Dev **13**(3): 239-52.
- Dias-Baruffi, M., H. Zhu, et al. (2003). "Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic recognition of leukocytes without inducing apoptosis." J Biol Chem **278**(42): 41282-93.
- Djerbi, M., V. Screpanti, et al. (1999). "The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors." J Exp Med **190**(7): 1025-32.
- Dreyfus, D. H., M. Nagasawa, et al. (1999). "Inactivation of NF-kappaB by EBV BZLF-1-encoded ZEBRA protein in human T cells." J Immunol **163**(11): 6261-8.
- Duggleby, R. C., T. N. Shaw, et al. (2007). "CD27 expression discriminates between regulatory and non-regulatory cells after expansion of human peripheral blood CD4+ CD25+ cells." Immunology **121**(1): 129-39.
- Dukers, D. F., P. Meij, et al. (2000). "Direct immunosuppressive effects of EBV-encoded latent membrane protein 1." J Immunol **165**(2): 663-70.
- Dumic, J., S. Dabelic, et al. (2006). "Galectin-3: an open-ended story." Biochim Biophys Acta **1760**(4): 616-35.
- Dyer, K. D. and H. F. Rosenberg (2001). "Transcriptional regulation of galectin-10 (eosinophil Charcot-Leyden crystal protein): a GC box (-44 to -50) controls butyric acid induction of gene expression." Life Sci **69**(2): 201-12.
- Edwards, R. H., D. Sitki-Green, et al. (2004). "Potential selection of LMP1 variants in nasopharyngeal carcinoma." J Virol **78**(2): 868-81.
- Efimova, O. V. and T. W. Kelley (2009). "Induction of granzyme B expression in T-cell receptor/CD28-stimulated human regulatory T cells is suppressed by inhibitors of the PI3K-mTOR pathway." BMC Immunol **10**: 59.
- Einsele, H., E. Roosnek, et al. (2002). "Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy." Blood **99**(11): 3916-22.
- Elola, M. T., C. Wolfenstein-Todel, et al. (2007). "Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival." Cell Mol Life Sci **64**(13): 1679-700.
- Escola, J. M., M. J. Kleijmeer, et al. (1998). "Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes." J Biol Chem **273**(32): 20121-7.
- Escudier, B., T. Dorval, et al. (2005). "Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial." J Transl Med **3**(1): 10.
- Fahlen, L., S. Read, et al. (2005). "T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells." J Exp Med **201**(5): 737-46.
- Fallarino, F., U. Grohmann, et al. (2003). "Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells." Nat Immunol **4**(12): 1206-12.

- Fantini, M. C., C. Becker, et al. (2004). "Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7." J Immunol **172**(9): 5149-53.
- Farrell, P. J. (2002). "Tumour viruses--could they be an Achilles' heel of cancer?" Eur J Cancer **38**(14): 1815-6.
- Faulkner, G. C., S. R. Burrows, et al. (1999). "X-Linked agammaglobulinemia patients are not infected with Epstein-Barr virus: implications for the biology of the virus." J Virol **73**(2): 1555-64.
- Fenton, R. G., J. A. Hixon, et al. (1998). "Inhibition of Fas (CD95) expression and Fas-mediated apoptosis by oncogenic Ras." Cancer Res **58**(15): 3391-400.
- Ferguson, T. A. and T. S. Griffith (2007). "The role of Fas ligand and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in the ocular immune response." Chem Immunol Allergy **92**: 140-54.
- Ferlazzo, G. and C. Munz (2004). "NK cell compartments and their activation by dendritic cells." J Immunol **172**(3): 1333-9.
- Ferlito, A. (1993). "The World Health Organization's revised classification of tumours of the larynx, hypopharynx, and trachea." Ann Otol Rhinol Laryngol **102**(9): 666-9.
- Feuk-Lagerstedt, E., E. T. Jordan, et al. (1999). "Identification of CD66a and CD66b as the major galectin-3 receptor candidates in human neutrophils." J Immunol **163**(10): 5592-8.
- Fevrier, B., D. Vilette, et al. (2004). "Cells release prions in association with exosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(26): 9683-8.
- Fijak, M. and A. Meinhardt (2006). "The testis in immune privilege." Immunol Rev **213**: 66-81.
- Flanagan, J., J. Middeldorp, et al. (2003). "Localization of the Epstein-Barr virus protein LMP 1 to exosomes." J Gen Virol **84**(Pt 7): 1871-9.
- Flavell, J. R., K. R. Baumforth, et al. (2008). "Down-regulation of the TGF-beta target gene, PTPRK, by the Epstein-Barr virus encoded EBNA1 contributes to the growth and survival of Hodgkin lymphoma cells." Blood **111**(1): 292-301.
- Flies, D. B. and L. Chen (2007). "The new B7s: playing a pivotal role in tumor immunity." J Immunother **30**(3): 251-60.
- Folkman, J. (1998). "Antiangiogenic gene therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9064-6.
- Fontana, A., K. Frei, et al. (1989). "Transforming growth factor-beta inhibits the generation of cytotoxic T cells in virus-infected mice." J Immunol **143**(10): 3230-4.
- Fontenot, J. D., J. L. Dooley, et al. (2005). "Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny." J Exp Med **202**(7): 901-6.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin, et al. (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." Nat Immunol **4**(4): 330-6.
- Fowell, D. and D. Mason (1993). "Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential." J Exp Med **177**(3): 627-36.
- Francois, V., S. Ottaviani, et al. (2009). "The CD4(+) T-cell response of melanoma patients to a MAGE-A3 peptide vaccine involves potential regulatory T cells." Cancer Res **69**(10): 4335-45.
- Frech, B., U. Zimmer-Strobl, et al. (1990). "Identification of Epstein-Barr virus terminal protein 1 (TP1) in extracts of four lymphoid cell lines, expression in insect cells, and detection of antibodies in human sera." J Virol **64**(6): 2759-67.
- French, L. E. and J. Tschopp (1999). "Inhibition of death receptor signaling by FLICE-inhibitory protein as a mechanism for immune escape of tumors." J Exp Med **190**(7): 891-4.
- Friberg, M., R. Jennings, et al. (2002). "Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection." Int J Cancer **101**(2): 151-5.

- Friedberg, J. W., H. Kim, et al. (2005). "Combination immunotherapy with a CpG oligonucleotide (1018 ISS) and rituximab in patients with non-Hodgkin lymphoma: increased interferon-alpha/beta-inducible gene expression, without significant toxicity." Blood **105**(2): 489-95.
- Frumento, G., R. Rotondo, et al. (2002). "Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase." J Exp Med **196**(4): 459-68.
- Fu, T., K. S. Voo, et al. (2004). "Critical role of EBNA1-specific CD4+ T cells in the control of mouse Burkitt lymphoma in vivo." J Clin Invest **114**(4): 542-50.
- Fujimoto, Y. and T. F. Tedder (2006). "CD83: a regulatory molecule of the immune system with great potential for therapeutic application." J Med Dent Sci **53**(2): 85-91.
- Fukuda, M. and T. S. Kuroda (2002). "Slac2-c (synaptotagmin-like protein homologue lacking C2 domains-c), a novel linker protein that interacts with Rab27, myosin Va/VIIa, and actin." J Biol Chem **277**(45): 43096-103.
- Fukuda, M. and R. Longnecker (2007). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A mediates transformation through constitutive activation of the Ras/PI3-K/Akt Pathway." J Virol **81**(17): 9299-306.
- Fukumori, T., Y. Takenaka, et al. (2003). "CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis." Cancer Res **63**(23): 8302-11.
- Gabrilovich, D. (2004). "Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects." Nat Rev Immunol **4**(12): 941-52.
- Gabrilovich, D. I., H. L. Chen, et al. (1996). "Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells." Nat Med **2**(10): 1096-103.
- Gallimore, A. and A. Godkin (2008). "Regulatory T cells and tumour immunity - observations in mice and men." Immunology **123**(2): 157-63.
- Gallimore, A. and S. Sakaguchi (2002). "Regulation of tumour immunity by CD25+ T cells." Immunology **107**(1): 5-9.
- Gandhi, M. K., E. Lambley, et al. (2006). "Expression of LAG-3 by tumor-infiltrating lymphocytes is coincident with the suppression of latent membrane antigen-specific CD8+ T-cell function in Hodgkin lymphoma patients." Blood **108**(7): 2280-9.
- Garin, M. I., C. C. Chu, et al. (2007). "Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells." Blood **109**(5): 2058-65.
- Garzelli, C., F. E. Taub, et al. (1984). "Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes produce monoclonal autoantibodies that react with antigens in multiple organs." J Virol **52**(2): 722-5.
- Gasser, O., C. Hess, et al. (2003). "Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils." Exp Cell Res **285**(2): 243-57.
- Gastman, B. R., Y. Atarshi, et al. (1999). "Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes." Cancer Res **59**(20): 5356-64.
- Gauvreau, M. E., M. H. Cote, et al. (2009). "Sorting of MHC class II molecules into exosomes through a ubiquitin-independent pathway." Traffic **10**(10): 1518-27.
- Gelman, A. E., D. F. LaRosa, et al. (2006). "The adaptor molecule MyD88 activates PI-3 kinase signaling in CD4+ T cells and enables CpG oligodeoxynucleotide-mediated costimulation." Immunity **25**(5): 783-93.
- Gendron, K. B., A. Rodriguez, et al. (2006). "Vaccination with human papillomavirus type 16 E7 peptide with CpG oligonucleotides for prevention of tumor growth in mice." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **132**(3): 327-32.

- Gershon, R. K. and K. Kondo (1970). "Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes." Immunology **18**(5): 723-37.
- Ghiringhelli, F., P. E. Puig, et al. (2005). "Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation." J Exp Med **202**(7): 919-29.
- Giannopoulos, K., A. Dmoszynska, et al. (2009). "Thalidomide exerts distinct molecular antileukemic effects and combined thalidomide/fludarabine therapy is clinically effective in high-risk chronic lymphocytic leukemia." Leukemia **23**(10): 1771-8.
- Girolomoni, G. and P. Ricciardi-Castagnoli (1997). "Dendritic cells hold promise for immunotherapy." Immunol Today **18**(3): 102-4.
- Gjertsen, M. K., T. Buanes, et al. (2001). "Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant: Clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma." Int J Cancer **92**(3): 441-50.
- Gondek, D. C., L. F. Lu, et al. (2005). "Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism." J Immunol **174**(4): 1783-6.
- Gopalkrishnan, R. V., T. Roberts, et al. (2000). "Molecular characterization of prostate carcinoma tumor antigen-1, PCTA-1, a human galectin-8 related gene." Oncogene **19**(38): 4405-16.
- Gordon, K. J. and G. C. Blobe (2008). "Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease." Biochim Biophys Acta **1782**(4): 197-228.
- Gorelik, L. and R. A. Flavell (2000). "Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease." Immunity **12**(2): 171-81.
- Gorelik, L. and R. A. Flavell (2002). "Transforming growth factor-beta in T-cell biology." Nat Rev Immunol **2**(1): 46-53.
- Gorsch, S. M., V. A. Memoli, et al. (1992). "Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer." Cancer Res **52**(24): 6949-52.
- Gould, S. J., A. M. Booth, et al. (2003). "The Trojan exosome hypothesis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10592-7.
- Graner, M. W., O. Alzate, et al. (2009). "Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes." FASEB J **23**(5): 1541-57.
- Greenspan, J. S., D. Greenspan, et al. (1985). "Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion." N Engl J Med **313**(25): 1564-71.
- Gregory, C. D., M. Rowe, et al. (1990). "Different Epstein-Barr virus-B cell interactions in phenotypically distinct clones of a Burkitt's lymphoma cell line." J Gen Virol **71** (Pt 7): 1481-95.
- Greil, R., A. Egle, et al. (1998). "On the role and significance of Fas (Apo-1/CD95) ligand (FasL) expression in immune privileged tissues and cancer cells using multiple myeloma as a model." Leuk Lymphoma **31**(5-6): 477-90.
- Griffioen, M., I. J. Ouwerkerk, et al. (1999). "Role of the interferon-stimulated response element in HLA-B downregulation in human melanoma cell lines." Immunogenetics **49**(4): 287-94.
- Groeger, A. M., V. Esposito, et al. (2004). "Prognostic value of immunohistochemical expression of p53, bax, Bcl-2 and Bcl-xL in resected non-small-cell lung cancers." Histopathology **44**(1): 54-63.
- Gronbaek, K., P. T. Straten, et al. (1998). "Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity." Blood **92**(9): 3018-24.
- Grossman, W. J., J. W. Verbsky, et al. (2004). "Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death." Immunity **21**(4): 589-601.

- Groux, H., F. Cottrez, et al. (1997). "Isolation and characterization of transformed human T-cell lines infected by Epstein-Barr virus." Blood **89**(12): 4521-30.
- Grunewald, K., P. Desai, et al. (2003). "Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography." Science **302**(5649): 1396-8.
- Gulley, M. L., M. B. Amin, et al. (1995). "Epstein-Barr virus is detected in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma but not in lymphoepithelioma-like carcinoma of the urinary bladder." Hum Pathol **26**(11): 1207-14.
- Guo, L., M. Tang, et al. (2012). "Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1 mediates survivin upregulation by p53 contributing to G1/S cell cycle progression in nasopharyngeal carcinoma." Int J Mol Med **29**(4): 574-80.
- Gupta, S. K., S. Masinick, et al. (1997). "Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide binds galectin-3 and other human corneal epithelial proteins." Infect Immun **65**(7): 2747-53.
- Hadari, Y. R., R. Arbel-Goren, et al. (2000). "Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis." J Cell Sci **113** (Pt 13): 2385-97.
- Hadinoto, V., M. Shapiro, et al. (2009). "The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output." PLoS Pathog **5**(7): e1000496.
- Hahne, M., D. Rimoldi, et al. (1996). "Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape." Science **274**(5291): 1363-6.
- Halpern, M. D., R. J. Kurlander, et al. (1996). "Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha." Cell Immunol **167**(1): 72-8.
- Hansson, M., S. Hermodsson, et al. (1999). "Histamine protects T cells and natural killer cells against oxidative stress." J Interferon Cytokine Res **19**(10): 1135-44.
- Harari, A., F. Vallerian, et al. (2005). "Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence." J Immunol **174**(2): 1037-45.
- Harding, C., J. Heuser, et al. (1983). "Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes." J Cell Biol **97**(2): 329-39.
- Hebner, C., J. Lasanen, et al. (2003). "The spacing between adjacent binding sites in the family of repeats affects the functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1 in transcription activation and stable plasmid maintenance." Virology **311**(2): 263-74.
- Hemler, M. E. (2003). "Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 397-422.
- Henderson, S., D. Huen, et al. (1993). "Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8479-83.
- Henle, G. and W. Henle (1976). "Epstein-Barr virus-specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma." Int J Cancer **17**(1): 1-7.
- Henle, G., W. Henle, et al. (1968). "Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis." Proc Natl Acad Sci U S A **59**(1): 94-101.
- Henle, G., E. T. Lennette, et al. (1979). "Rheumatoid factor as a cause of positive reactions in tests for Epstein-Barr virus-specific IgM antibodies." Clin Exp Immunol **36**(3): 415-22.
- Henle, W. and G. Henle (1970). "Evidence for a relation of Epstein-Barr virus to Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma." Bibl Haematol(36): 706-13.
- Henle, W., G. Henle, et al. (1987). "Antibody responses to Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen (EBNA)-1 and EBNA-2 in acute and chronic Epstein-Barr virus infection." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(2): 570-4.
- Hernandez, J. D., J. T. Nguyen, et al. (2006). "Galectin-1 binds different CD43 glycoforms to cluster CD43 and regulate T cell death." J Immunol **177**(8): 5328-36.

- Hersey, P., S. W. Menzies, et al. (2005). "Phase I/II study of immunotherapy with T-cell peptide epitopes in patients with stage IV melanoma." Cancer Immunol Immunother **54**(3): 208-18.
- Hersey, P. and X. D. Zhang (2001). "How melanoma cells evade trail-induced apoptosis." Nat Rev Cancer **1**(2): 142-50.
- Heussinger, N., M. Buttner, et al. (2004). "Expression of the Epstein-Barr virus (EBV)-encoded latent membrane protein 2A (LMP2A) in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma." J Pathol **203**(2): 696-9.
- Hicklin, D. J., Z. Wang, et al. (1998). "beta2-Microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma." J Clin Invest **101**(12): 2720-9.
- Hildesheim, A., L. M. Anderson, et al. (1997). "CYP2E1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan." J Natl Cancer Inst **89**(16): 1207-12.
- Hirabayashi, J., T. Hashidate, et al. (2002). "Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography." Biochim Biophys Acta **1572**(2-3): 232-54.
- Hirashima, M., Y. Kashio, et al. (2004). "Galectin-9 in physiological and pathological conditions." Glycoconj J **19**(7-9): 593-600.
- Hislop, A. D., N. E. Annels, et al. (2002). "Epitope-specific evolution of human CD8(+) T cell responses from primary to persistent phases of Epstein-Barr virus infection." J Exp Med **195**(7): 893-905.
- Hislop, A. D., N. H. Gudgeon, et al. (2001). "EBV-specific CD8+ T cell memory: relationships between epitope specificity, cell phenotype, and immediate effector function." J Immunol **167**(4): 2019-29.
- Hislop, A. D., M. E. Rensing, et al. (2007). "A CD8+ T cell immune evasion protein specific to Epstein-Barr virus and its close relatives in Old World primates." J Exp Med **204**(8): 1863-73.
- Hislop, A. D., G. S. Taylor, et al. (2007). "Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus." Annu Rev Immunol **25**: 587-617.
- Ho, S. Y., H. R. Guo, et al. (2004). "Prognostic implications of Fas-ligand expression in nasopharyngeal carcinoma." Head Neck **26**(11): 977-83.
- Hochberg, D., T. Souza, et al. (2004). "Acute infection with Epstein-Barr virus targets and overwhelms the peripheral memory B-cell compartment with resting, latently infected cells." J Virol **78**(10): 5194-204.
- Hokama, A., E. Mizoguchi, et al. (2008). "Roles of galectins in inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **14**(33): 5133-7.
- Hokama, A., E. Mizoguchi, et al. (2004). "Induced reactivity of intestinal CD4(+) T cells with an epithelial cell lectin, galectin-4, contributes to exacerbation of intestinal inflammation." Immunity **20**(6): 681-93.
- Holowaty, M. N., M. Zeghouf, et al. (2003). "Protein profiling with Epstein-Barr nuclear antigen-1 reveals an interaction with the herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease HAUSP/USP7." J Biol Chem **278**(32): 29987-94.
- Hori, S., T. Nomura, et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-61.
- Hoshino, Y., T. Morishima, et al. (1999). "Antigen-driven expansion and contraction of CD8+-activated T cells in primary EBV infection." J Immunol **163**(10): 5735-40.
- Hotta, K., T. Funahashi, et al. (2001). "Galectin-12, an Adipose-expressed Galectin-like Molecule Possessing Apoptosis-inducing Activity." J Biol Chem **276**(36): 34089-97.
- Hoyer, K. K., M. Pang, et al. (2004). "An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas." Am J Pathol **164**(3): 893-902.
- Huang, C. T., C. J. Workman, et al. (2004). "Role of LAG-3 in regulatory T cells." Immunity **21**(4): 503-13.

- Huang, S., S. Apasov, et al. (1997). "Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion." Blood **90**(4): 1600-10.
- Huang, Y. T., T. S. Sheen, et al. (1999). "Profile of cytokine expression in nasopharyngeal carcinomas: a distinct expression of interleukin 1 in tumor and CD4+ T cells." Cancer Res **59**(7): 1599-605.
- Huflejt, M. E. and H. Leffler (2004). "Galectin-4 in normal tissues and cancer." Glycoconj J **20**(4): 247-55.
- Hughes, R. C. (1999). "Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins." Biochim Biophys Acta **1473**(1): 172-85.
- Hurley, J. H. (2008). "ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies." Curr Opin Cell Biol **20**(1): 4-11.
- Ichihara, F., K. Kono, et al. (2003). "Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers." Clin Cancer Res **9**(12): 4404-8.
- Iellem, A., M. Mariani, et al. (2001). "Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells." J Exp Med **194**(6): 847-53.
- Ikedo, H., L. J. Old, et al. (2002). "The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting." Cytokine Growth Factor Rev **13**(2): 95-109.
- Imaizumi, T., M. Kumagai, et al. (2002). "Interferon-gamma stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells." J Leukoc Biol **72**(3): 486-91.
- Inge, T. H., K. M. McCoy, et al. (1992). "Immunomodulatory effects of transforming growth factor-beta on T lymphocytes. Induction of CD8 expression in the CTLL-2 cell line and in normal thymocytes." J Immunol **148**(12): 3847-56.
- Irmeler, M., M. Thome, et al. (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." Nature **388**(6638): 190-5.
- Ishida, T. and R. Ueda (2006). "CCR4 as a novel molecular target for immunotherapy of cancer." Cancer Sci **97**(11): 1139-46.
- Ishida, Y., Y. Agata, et al. (1992). "Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death." EMBO J **11**(11): 3887-95.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." Nat Immunol **5**(10): 987-95.
- Iwasaki, T., M. Nakashima, et al. (2000). "Expression and prognostic significance in lung cancer of human tumor-associated antigen RCAS1." Int J Cancer **89**(6): 488-93.
- Jacquot, S., T. Kobata, et al. (1997). "CD27/CD70 interaction contributes to the activation and the function of human autoreactive CD27+ regulatory T cells." Cell Immunol **179**(1): 48-54.
- Jager, E., S. Gnjatic, et al. (2000). "Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(22): 12198-203.
- Jahrsdorfer, B., L. Muhlenhoff, et al. (2005). "B-cell lymphomas differ in their responsiveness to CpG oligodeoxynucleotides." Clin Cancer Res **11**(4): 1490-9.
- Jahrsdorfer, B., J. E. Wooldridge, et al. (2005). "Immunostimulatory oligodeoxynucleotides induce apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia cells." J Leukoc Biol **77**(3): 378-87.
- Jalbout, M., N. Bouaouina, et al. (2003). "Polymorphism of the stress protein HSP70-2 gene is associated with the susceptibility to the nasopharyngeal carcinoma." Cancer Lett **193**(1): 75-81.
- Jeannel, D., A. Hubert, et al. (1990). "Diet, living conditions and nasopharyngeal carcinoma in Tunisia--a case-control study." Int J Cancer **46**(3): 421-5.

- Jellison, E. R., S. K. Kim, et al. (2005). "Cutting edge: MHC class II-restricted killing in vivo during viral infection." J Immunol **174**(2): 614-8.
- Jia, W. H., Q. H. Pan, et al. (2009). "A case-control and a family-based association study revealing an association between CYP2E1 polymorphisms and nasopharyngeal carcinoma risk in Cantonese." Carcinogenesis **30**(12): 2031-6.
- Jiang, J. H., W. H. Jia, et al. (2004). "Genetic polymorphisms of CYP2A13 and its relationship to nasopharyngeal carcinoma in the Cantonese population." J Transl Med **2**(1): 24.
- Jie, H. B., N. Gildener-Leapman, et al. "Intratumoral regulatory T cells upregulate immunosuppressive molecules in head and neck cancer patients." Br J Cancer.
- Jieyong, B., W. Zhong, et al. (2006). "Decompressive craniectomy and mild hypothermia reduces infarction size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after permanent focal ischemia in rats." Neurosurg Rev **29**(2): 168-72.
- Joffre, O., N. Gorse, et al. (2004). "Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes." Blood **103**(11): 4216-21.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, et al. (2002). "Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells." J Exp Med **196**(2): 255-60.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, et al. (2001). "Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood." J Exp Med **193**(11): 1285-94.
- Jung, T., D. Castellana, et al. (2009). "CD44v6 dependence of premetastatic niche preparation by exosomes." Neoplasia **11**(10): 1093-105.
- Kageshita, T., Y. Kashio, et al. (2002). "Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance." Int J Cancer **99**(6): 809-16.
- Kaplan, D. H., V. Shankaran, et al. (1998). "Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(13): 7556-61.
- Karlsson, M., S. Lundin, et al. (2001). "'Tolerosomes' are produced by intestinal epithelial cells." Eur J Immunol **31**(10): 2892-900.
- Kashio, Y., K. Nakamura, et al. (2003). "Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway." J Immunol **170**(7): 3631-6.
- Katzmann, D. J., M. Babst, et al. (2001). "Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I." Cell **106**(2): 145-55.
- Kaul, R., M. Murakami, et al. (2007). "Epstein-Barr virus latent nuclear antigens can induce metastasis in a nude mouse model." J Virol **81**(19): 10352-61.
- Keating, S., S. Prince, et al. (2002). "The lytic cycle of Epstein-Barr virus is associated with decreased expression of cell surface major histocompatibility complex class I and class II molecules." J Virol **76**(16): 8179-88.
- Keller, S., C. Rupp, et al. (2007). "CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid." Kidney Int **72**(9): 1095-102.
- Kennedy, G., J. Komano, et al. (2003). "Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14269-74.
- Keryer-Bibens, C., C. Pioche-Durieu, et al. (2006). "Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9." BMC Cancer **6**: 283.
- Khanna, R. and S. R. Burrows (2000). "Role of cytotoxic T lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated diseases." Annu Rev Microbiol **54**: 19-48.

- Khanna, R., S. R. Burrows, et al. (1992). "Localization of Epstein-Barr virus cytotoxic T cell epitopes using recombinant vaccinia: implications for vaccine development." J Exp Med **176**(1): 169-76.
- Khanna, R., S. R. Burrows, et al. (1997). "Targeting Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) through the class II pathway restores immune recognition by EBNA1-specific cytotoxic T lymphocytes: evidence for HLA-DM-independent processing." Int Immunol **9**(10): 1537-43.
- Khanna, R., D. J. Moss, et al. (1999). "Vaccine strategies against Epstein-Barr virus-associated diseases: lessons from studies on cytotoxic T-cell-mediated immune regulation." Immunol Rev **170**: 49-64.
- Khanolkar, A., H. Yagita, et al. (2001). "Preferential utilization of the perforin/granzyme pathway for lysis of Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells by virus-specific CD4+ T cells." Virology **287**(1): 79-88.
- Kharaziha, P., S. Ceder, et al. (2012). "Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle." Biochim Biophys Acta **1826**(1): 103-11.
- Khattari, R., T. Cox, et al. (2003). "An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells." Nat Immunol **4**(4): 337-42.
- Khong, H. T. and N. P. Restifo (2002). "Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes." Nat Immunol **3**(11): 999-1005.
- Kiessling, R., K. Wasserman, et al. (1999). "Tumor-induced immune dysfunction." Cancer Immunol Immunother **48**(7): 353-62.
- Kim, S. H., N. Bianco, et al. (2006). "Exosomes derived from genetically modified DC expressing FasL are anti-inflammatory and immunosuppressive." Mol Ther **13**(2): 289-300.
- Kim, S. K., G. Ragupathi, et al. (2000). "Effect of immunological adjuvant combinations on the antibody and T-cell response to vaccination with MUC1-KLH and GD3-KLH conjugates." Vaccine **19**(4-5): 530-7.
- Kingsley, C. I., M. Karim, et al. (2002). "CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses." J Immunol **168**(3): 1080-6.
- Kitamura, R., T. Sekimoto, et al. (2006). "Nuclear import of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 mediated by NPI-1 (Importin alpha5) is up- and down-regulated by phosphorylation of the nuclear localization signal for which Lys379 and Arg380 are essential." J Virol **80**(4): 1979-91.
- Klein, S., C. C. Kretz, et al. (2010). "Reduction of regulatory T cells in skin lesions but not in peripheral blood of patients with systemic sclerosis." Ann Rheum Dis **70**(8): 1475-81.
- Klibi, J., T. Niki, et al. (2009). "Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells." Blood **113**(9): 1957-66.
- Knox, P. G., Q. X. Li, et al. (1996). "In vitro production of stable Epstein-Barr virus-positive epithelial cell clones which resemble the virus:cell interaction observed in nasopharyngeal carcinoma." Virology **215**(1): 40-50.
- Knutson, K. L., K. Schiffman, et al. (2001). "Immunization with a HER-2/neu helper peptide vaccine generates HER-2/neu CD8 T-cell immunity in cancer patients." J Clin Invest **107**(4): 477-84.
- Kobie, J. J., P. R. Shah, et al. (2006). "T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine." J Immunol **177**(10): 6780-6.
- Koguchi, K., D. E. Anderson, et al. (2006). "Dysregulated T cell expression of TIM3 in multiple sclerosis." J Exp Med **203**(6): 1413-8.
- Kondoh, N., T. Wakatsuki, et al. (1999). "Identification and characterization of genes associated with human hepatocellular carcinogenesis." Cancer Res **59**(19): 4990-6.

- Korkolopoulou, P., L. Kaklamanis, et al. (1996). "Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer." Br J Cancer **73**(2): 148-53.
- Kryczek, I., L. Zou, et al. (2006). "B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma." J Exp Med **203**(4): 871-81.
- Kubach, J., P. Lutter, et al. (2007). "Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function." Blood **110**(5): 1550-8.
- Kuhn, R., J. Lohler, et al. (1993). "Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis." Cell **75**(2): 263-74.
- Kurth, J., T. Spieker, et al. (2000). "EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency." Immunity **13**(4): 485-95.
- Kusano, S. and N. Raab-Traub (2001). "An Epstein-Barr virus protein interacts with Notch." J Virol **75**(1): 384-95.
- Kuwabara, I., Y. Kuwabara, et al. (2002). "Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release." J Biol Chem **277**(5): 3487-97.
- Labarriere, N., E. Diez, et al. (1997). "Optimal T cell activation by melanoma cells depends on a minimal level of antigen transcription." J Immunol **158**(3): 1238-45.
- Laichalk, L. L., D. Hochberg, et al. (2002). "The dispersal of mucosal memory B cells: evidence from persistent EBV infection." Immunity **16**(5): 745-54.
- Lamparski, H. G., A. Metha-Damani, et al. (2002). "Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells." J Immunol Methods **270**(2): 211-26.
- Lan, Y. Y., J. R. Hsiao, et al. "Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A promotes invasion of nasopharyngeal carcinoma cells through ERK/Fra-1-mediated induction of matrix metalloproteinase 9." J Virol **86**(12): 6656-67.
- Landais, E., X. Saulquin, et al. (2004). "Direct killing of Epstein-Barr virus (EBV)-infected B cells by CD4 T cells directed against the EBV lytic protein BHRF1." Blood **103**(4): 1408-16.
- Lassoued, S., R. Ben Ameer, et al. (2008). "Epstein-Barr virus induces an oxidative stress during the early stages of infection in B lymphocytes, epithelial, and lymphoblastoid cell lines." Mol Cell Biochem **313**(1-2): 179-86.
- Lau, K. M., S. H. Cheng, et al. (2007). "Increase in circulating Foxp3+CD4+CD25(high) regulatory T cells in nasopharyngeal carcinoma patients." Br J Cancer **96**(4): 617-22.
- Lawrence, G., Q. Q. Cheng, et al. (2000). "Effect of vaccination with 3 recombinant asexual-stage malaria antigens on initial growth rates of Plasmodium falciparum in non-immune volunteers." Vaccine **18**(18): 1925-31.
- Lawrence, G. W., A. Saul, et al. (1997). "Phase I trial in humans of an oil-based adjuvant SEPPIC MONTANIDE ISA 720." Vaccine **15**(2): 176-8.
- Le Clorennec, C., I. Youlyouze-Marfak, et al. (2006). "EBV latency III immortalization program sensitizes B cells to induction of CD95-mediated apoptosis via LMP1: role of NF-kappaB, STAT1, and p53." Blood **107**(5): 2070-8.
- Lee, S. H., M. S. Shin, et al. (1999). "Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in non-small cell lung cancer." Oncogene **18**(25): 3754-60.
- Leelawat, K., S. Engprasert, et al. (2005). "Receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells can be detected in metastatic lymph nodes from gastrointestinal cancers." World J Gastroenterol **11**(38): 6014-7.
- Leen, A., P. Meij, et al. (2001). "Differential immunogenicity of Epstein-Barr virus latent-cycle proteins for human CD4(+) T-helper 1 responses." J Virol **75**(18): 8649-59.
- Leffler, H., S. Carlsson, et al. (2004). "Introduction to galectins." Glycoconj J **19**(7-9): 433-40.

- Lehmann, J., J. Huehn, et al. (2002). "Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 13031-6.
- Lekishvili, T., E. Fromm, et al. (2008). "The tumour-associated antigen L6 (L6-Ag) is recruited to the tetraspanin-enriched microdomains: implication for tumour cell motility." J Cell Sci **121**(Pt 5): 685-94.
- Lenassi, M., G. Cagney, et al. "HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells." Traffic **11**(1): 110-22.
- Letterio, J. J. and A. B. Roberts (1998). "Regulation of immune responses by TGF-beta." Annu Rev Immunol **16**: 137-61.
- Li, H. P. and Y. S. Chang (2003). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: structure and functions." J Biomed Sci **10**(5): 490-504.
- Li, M. O., Y. Y. Wan, et al. (2006). "Transforming growth factor-beta regulation of immune responses." Annu Rev Immunol **24**: 99-146.
- Liang, B., C. Workman, et al. (2008). "Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II." J Immunol **180**(9): 5916-26.
- Liang, S., P. Alard, et al. (2005). "Conversion of CD4+ CD25- cells into CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus." J Exp Med **201**(1): 127-37.
- Lin, C. L., H. Li, et al. (2003). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic origin (ori-Lyt)-dependent DNA replication: identification of the ori-Lyt and association of K8 bZip protein with the origin." J Virol **77**(10): 5578-88.
- Link, B. K., Z. K. Ballas, et al. (2006). "Oligodeoxynucleotide CpG 7909 delivered as intravenous infusion demonstrates immunologic modulation in patients with previously treated non-Hodgkin lymphoma." J Immunother **29**(5): 558-68.
- Linkermann, A., J. Qian, et al. (2005). "Considering Fas ligand as a target for therapy." Expert Opin Ther Targets **9**(1): 119-34.
- Lipkowitz, M. S., E. Leal-Pinto, et al. (2004). "Galectin 9 is the sugar-regulated urate transporter/channel UAT." Glycoconj J **19**(7-9): 491-8.
- Lissoni, P., F. Malugani, et al. (2001). "Abnormally enhanced blood concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastatic cancer patients and their relation to circulating dendritic cells, IL-12 and endothelin-1." J Biol Regul Homeost Agents **15**(2): 140-4.
- Liu, C., S. Yu, et al. (2006). "Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function." J Immunol **176**(3): 1375-85.
- Liu, F. T., R. J. Patterson, et al. (2002). "Intracellular functions of galectins." Biochim Biophys Acta **1572**(2-3): 263-73.
- Liu, F. T. and G. A. Rabinovich (2005). "Galectins as modulators of tumour progression." Nat Rev Cancer **5**(1): 29-41.
- Liu, V. C., L. Y. Wong, et al. (2007). "Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta." J Immunol **178**(5): 2883-92.
- Liu, X. S., J. Leerberg, et al. (2009). "IFN-gamma promotes generation of IL-10 secreting CD4+ T cells that suppress generation of CD8 responses in an antigen-experienced host." J Immunol **183**(1): 51-8.
- Liu, Y., X. Xiang, et al. (2010). "Contribution of MyD88 to the tumor exosome-mediated induction of myeloid derived suppressor cells." Am J Pathol **176**(5): 2490-9.
- Liyanage, U. K., T. T. Moore, et al. (2002). "Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma." J Immunol **169**(5): 2756-61.

- Lo, K. W. and D. P. Huang (2002). "Genetic and epigenetic changes in nasopharyngeal carcinoma." Semin Cancer Biol **12**(6): 451-62.
- Long, H. M., T. A. Haigh, et al. (2005). "CD4+ T-cell responses to Epstein-Barr virus (EBV) latent-cycle antigens and the recognition of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines." J Virol **79**(8): 4896-907.
- Lotz, M., C. D. Tsoukas, et al. (1985). "Regulation of Epstein-Barr virus infection by recombinant interferons. Selected sensitivity to interferon-gamma." Eur J Immunol **15**(5): 520-5.
- Louis, C. U., K. Straathof, et al. (2010). "Adoptive transfer of EBV-specific T cells results in sustained clinical responses in patients with locoregional nasopharyngeal carcinoma." J Immunother **33**(9): 983-90.
- Louis, C. U., K. Straathof, et al. (2009). "Enhancing the in vivo expansion of adoptively transferred EBV-specific CTL with lymphodepleting CD45 monoclonal antibodies in NPC patients." Blood **113**(11): 2442-50.
- Lu, J., M. Murakami, et al. (2011). "Epstein-Barr Virus nuclear antigen 1 (EBNA1) confers resistance to apoptosis in EBV-positive B-lymphoma cells through up-regulation of survivin." Virology **410**(1): 64-75.
- Lukyanov, P., V. Furtak, et al. (2005). "Galectin-3 interacts with membrane lipids and penetrates the lipid bilayer." Biochem Biophys Res Commun **338**(2): 1031-6.
- Luzio, J. P., B. A. Rous, et al. (2000). "Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis." J Cell Sci **113** (Pt 9): 1515-24.
- Mabjeesh, N. J. and S. Amir (2007). "Hypoxia-inducible factor (HIF) in human tumorigenesis." Histol Histopathol **22**(5): 559-72.
- Macswen, K. F. and D. H. Crawford (2003). "Epstein-Barr virus-recent advances." Lancet Infect Dis **3**(3): 131-40.
- Madsen, P., H. H. Rasmussen, et al. (1995). "Cloning, expression, and chromosome mapping of human galectin-7." J Biol Chem **270**(11): 5823-9.
- Magnaldo, T., D. Fowles, et al. (1998). "Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia." Differentiation **63**(3): 159-68.
- Maini, M. K., N. Gudgeon, et al. (2000). "Clonal expansions in acute EBV infection are detectable in the CD8 and not the CD4 subset and persist with a variable CD45 phenotype." J Immunol **165**(10): 5729-37.
- Malmgaard, L. and S. R. Paludan (2003). "Interferon (IFN)-alpha/beta, interleukin (IL)-12 and IL-18 coordinately induce production of IFN-gamma during infection with herpes simplex virus type 2." J Gen Virol **84**(Pt 9): 2497-500.
- Maloy, K. J. and F. Powrie (2001). "Regulatory T cells in the control of immune pathology." Nat Immunol **2**(9): 816-22.
- Maloy, K. J., L. Salaun, et al. (2003). "CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms." J Exp Med **197**(1): 111-9.
- Mantovani, A., B. Bottazzi, et al. (1992). "The origin and function of tumor-associated macrophages." Immunol Today **13**(7): 265-70.
- Mantovani, A., P. Romero, et al. (2008). "Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment." Lancet **371**(9614): 771-83.
- Marchand, M., N. van Baren, et al. (1999). "Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1." Int J Cancer **80**(2): 219-30.
- Marechal, V. and T. Piolot (2000). "Lytic infection by double-strand DNA viruses and cell cycle alterations." Pathol Biol (Paris) **48**(3): 289-300.
- Marincola, F. M., P. Shamamian, et al. (1994). "Loss of HLA haplotype and B locus down-regulation in melanoma cell lines." J Immunol **153**(3): 1225-37.

- Marks, J. E., J. L. Phillips, et al. (1998). "The National Cancer Data Base report on the relationship of race and national origin to the histology of nasopharyngeal carcinoma." Cancer **83**(3): 582-8.
- Marshall, N. A., L. E. Christie, et al. (2004). "Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma." Blood **103**(5): 1755-62.
- Marshall, N. A., D. J. Culligan, et al. (2007). "CD4(+) T-cell responses to Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 in infectious mononucleosis and EBV-associated non-Hodgkin lymphoma: Th1 in active disease but Tr1 in remission." Br J Haematol **139**(1): 81-9.
- Marshall, N. A., M. A. Vickers, et al. (2003). "Regulatory T cells secreting IL-10 dominate the immune response to EBV latent membrane protein 1." J Immunol **170**(12): 6183-9.
- Masciopinto, F., C. Giovani, et al. (2004). "Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes." Eur J Immunol **34**(10): 2834-42.
- Masmoudi, A., N. Toumi, et al. (2007). "Epstein-Barr virus-targeted immunotherapy for nasopharyngeal carcinoma." Cancer Treat Rev **33**(6): 499-505.
- Matarrese, P., O. Fusco, et al. (2000). "Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties." Int J Cancer **85**(4): 545-54.
- Mathivanan, S., H. Ji, et al. "Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication." J Proteomics **73**(10): 1907-20.
- Matsumoto, R., H. Matsumoto, et al. (1998). "Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes." J Biol Chem **273**(27): 16976-84.
- Matsuo, H., J. Chevallier, et al. (2004). "Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization." Science **303**(5657): 531-4.
- Mautner, J., D. Pich, et al. (2004). "Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 evades direct immune recognition by CD4+ T helper cells." Eur J Immunol **34**(9): 2500-9.
- McHugh, R. S., M. J. Whitters, et al. (2002). "CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor." Immunity **16**(2): 311-23.
- McShane, M. P., M. M. Mullen, et al. (2003). "Mutational analysis of the HLA class II interaction with Epstein-Barr virus glycoprotein 42." J Virol **77**(13): 7655-62.
- Medema, J. P., J. de Jong, et al. (1999). "Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein." J Exp Med **190**(7): 1033-8.
- Meij, P., M. B. Vervoort, et al. (1999). "Restricted low-level human antibody responses against Epstein-Barr virus (EBV)-encoded latent membrane protein 1 in a subgroup of patients with EBV-associated diseases." J Infect Dis **179**(5): 1108-15.
- Meij, P., M. B. Vervoort, et al. (2002). "Antibody responses to Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 (LMP1) and expression of LMP1 in juvenile Hodgkin's disease." J Med Virol **68**(3): 370-7.
- Mellor, A. L., D. B. Keskin, et al. (2002). "Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses." J Immunol **168**(8): 3771-6.
- Mellor, A. L. and D. H. Munn (1999). "Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation?" Immunol Today **20**(10): 469-73.
- Mellor, A. L. and D. H. Munn (2004). "IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism." Nat Rev Immunol **4**(10): 762-74.
- Menon, R. P. and R. C. Hughes (1999). "Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex." Eur J Biochem **264**(2): 569-76.
- Merchant, M., R. Swart, et al. (2001). "The effects of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A on B cell function." Int Rev Immunol **20**(6): 805-35.

- Miceli, M. C., M. Moran, et al. (2001). "Co-stimulation and counter-stimulation: lipid raft clustering controls TCR signaling and functional outcomes." Semin Immunol **13**(2): 115-28.
- Middeldorp, J. M. and D. M. Pegtel (2008). "Multiple roles of LMP1 in Epstein-Barr virus induced immune escape." Semin Cancer Biol **18**(6): 388-96.
- Miyara, M. and S. Sakaguchi (2007). "Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression." Trends Mol Med **13**(3): 108-16.
- Moiseeva, E. P., B. Williams, et al. (2003). "Galectin-1 interacts with beta-1 subunit of integrin." Biochem Biophys Res Commun **310**(3): 1010-6.
- Molesworth, S. J., C. M. Lake, et al. (2000). "Epstein-Barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells." J Virol **74**(14): 6324-32.
- Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, et al. (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." Annu Rev Immunol **19**: 683-765.
- Moore, K. W., P. Vieira, et al. (1990). "Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1." Science **248**(4960): 1230-4.
- Morales, O., S. Depil, et al. (2012). "EBV Latency II-derived peptides induce a specific CD4+ cytotoxic T-cell activity and not a CD4+ regulatory T-cell response." J Immunother **35**(3): 254-66.
- Morford, L. A., L. H. Elliott, et al. (1997). "T cell receptor-mediated signaling is defective in T cells obtained from patients with primary intracranial tumors." J Immunol **159**(9): 4415-25.
- Mori, Y., M. Koike, et al. (2008). "Human herpesvirus-6 induces MVB formation, and virus egress occurs by an exosomal release pathway." Traffic **9**(10): 1728-42.
- Morris, M. A., C. W. Dawson, et al. (2009). "Role of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1, LMP1, in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma." Future Oncol **5**(6): 811-25.
- Morrison, J. A. and N. Raab-Traub (2005). "Roles of the ITAM and PY motifs of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A in the inhibition of epithelial cell differentiation and activation of {beta}-catenin signaling." J Virol **79**(4): 2375-82.
- Morrison, T. E., A. Mauser, et al. (2001). "Inhibition of IFN-gamma signaling by an Epstein-Barr virus immediate-early protein." Immunity **15**(5): 787-99.
- Morse, M. A., J. Garst, et al. (2005). "A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer." J Transl Med **3**(1): 9.
- Moss, D. J., C. J. Bishop, et al. (1985). "T lymphocytes in infectious mononucleosis. I. T cell death in vitro." Clin Exp Immunol **60**(1): 61-9.
- Mottet, C. and D. Golshayan (2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells: from basic research to potential therapeutic use." Swiss Med Wkly **137**(45-46): 625-34.
- Mottet, C., H. H. Uhlig, et al. (2003). "Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol **170**(8): 3939-43.
- Mukherjee, P., L. B. Pathangey, et al. (2007). "MUC1-specific immune therapy generates a strong anti-tumor response in a MUC1-tolerant colon cancer model." Vaccine **25**(9): 1607-18.
- Mullauer, L., I. Mosberger, et al. (2000). "Fas ligand is expressed in normal breast epithelial cells and is frequently up-regulated in breast cancer." J Pathol **190**(1): 20-30.
- Munn, D. H., M. Zhou, et al. (1998). "Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism." Science **281**(5380): 1191-3.
- Muntasell, A., A. C. Berger, et al. (2007). "T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes." Embo J **26**(19): 4263-72.
- Munz, C., K. L. Bickham, et al. (2000). "Human CD4(+) T lymphocytes consistently respond to the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA1." J Exp Med **191**(10): 1649-60.

- Murakami, M., K. Lan, et al. (2005). "Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 interacts with Nm23-H1 in lymphoblastoid cell lines and inhibits its ability to suppress cell migration." *J Virol* **79**(3): 1559-68.
- Murray, R. J., M. G. Kurilla, et al. (1992). "Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the immune control of EBV-positive malignancies." *J Exp Med* **176**(1): 157-68.
- Nagahara, K., T. Arikawa, et al. (2008). "Galectin-9 increases Tim-3+ dendritic cells and CD8+ T cells and enhances antitumor immunity via galectin-9-Tim-3 interactions." *J Immunol* **181**(11): 7660-9.
- Naka, E. L., V. C. Ponciano, et al. (2009). "Detection of the Tim-3 ligand, galectin-9, inside the allograft during a rejection episode." *Int Immunopharmacol* **9**(6): 658-62.
- Nakabayashi, H., M. Nakashima, et al. (2007). "Clinico-pathological significance of RCAS1 expression in gliomas: a potential mechanism of tumor immune escape." *Cancer Lett* **246**(1-2): 182-9.
- Nakagomi, H., R. Dolcetti, et al. (1994). "The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) induces interleukin-10 production in Burkitt lymphoma lines." *Int J Cancer* **57**(2): 240-4.
- Nakamura, K., A. Kitani, et al. (2001). "Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta." *J Exp Med* **194**(5): 629-44.
- Nakashima, M., K. Sonoda, et al. (1999). "Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1." *Nat Med* **5**(8): 938-42.
- Nanbo, A., K. Inoue, et al. (2002). "Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon-alpha-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma." *EMBO J* **21**(5): 954-65.
- Nangia-Makker, P., S. Nakahara, et al. (2007). "Galectin-3 in apoptosis, a novel therapeutic target." *J Bioenerg Biomembr* **39**(1): 79-84.
- Nicholls, J. M., A. Agathangelou, et al. (1997). "The association of squamous cell carcinomas of the nasopharynx with Epstein-Barr virus shows geographical variation reminiscent of Burkitt's lymphoma." *J Pathol* **183**(2): 164-8.
- Nickel, W. (2003). "The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes." *Eur J Biochem* **270**(10): 2109-19.
- Niederkorn, J. Y. (2007). "The induction of anterior chamber-associated immune deviation." *Chem Immunol Allergy* **92**: 27-35.
- Niedobitek, G. (2000). "Epstein-Barr virus infection in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma." *Mol Pathol* **53**(5): 248-54.
- Niedobitek, G., A. Agathangelou, et al. (1996). "Epstein-Barr virus infection and the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma: viral gene expression, tumour cell phenotype, and the role of the lymphoid stroma." *Semin Cancer Biol* **7**(4): 165-74.
- Niedobitek, G., L. S. Young, et al. (1992). "Expression of Epstein-Barr virus genes and of lymphocyte activation molecules in undifferentiated nasopharyngeal carcinomas." *Am J Pathol* **140**(4): 879-87.
- Nikiforow, S., K. Bottomly, et al. (2001). "CD4+ T-cell effectors inhibit Epstein-Barr virus-induced B-cell proliferation." *J Virol* **75**(8): 3740-52.
- Nishi, N., A. Itoh, et al. (2006). "Galectin-8 and galectin-9 are novel substrates for thrombin." *Glycobiology* **16**(11): 15C-20C.
- Nishikawa, H. and S. Sakaguchi "Regulatory T cells in tumor immunity." *Int J Cancer* **127**(4): 759-67.
- Nishiuchi, R., N. Sanzen, et al. (2005). "Potentiation of the ligand-binding activity of integrin alpha3beta1 via association with tetraspanin CD151." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(6): 1939-44.

- Noguchi, K., M. Enjoji, et al. (2001). "Expression of a tumor-associated antigen RCAS1 in hepatocellular carcinoma." Cancer Lett **168**(2): 197-202.
- North, R. J. and I. Bursucker (1984). "Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. I. Ly-1+2- suppressor T cells down-regulate the generation of Ly-1-2+ effector T cells." J Exp Med **159**(5): 1295-311.
- O'Connell, J., M. W. Bennett, et al. (1999). "The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege." Immunol Today **20**(1): 46-52.
- O'Connell, J., A. Houston, et al. (2001). "Immune privilege or inflammation? Insights into the Fas ligand enigma." Nat Med **7**(3): 271-4.
- O'Connell, J., G. C. O'Sullivan, et al. (1996). "The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand." J Exp Med **184**(3): 1075-82.
- O'Reilly, R. J., T. N. Small, et al. (1997). "Biology and adoptive cell therapy of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders in recipients of marrow allografts." Immunol Rev **157**: 195-216.
- Ochieng, J., M. L. Leite-Browning, et al. (1998). "Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3." Biochem Biophys Res Commun **246**(3): 788-91.
- Ochieng, J., P. Warfield, et al. (1999). "Galectin-3 regulates the adhesive interaction between breast carcinoma cells and elastin." J Cell Biochem **75**(3): 505-14.
- Ogino, T., S. Moriai, et al. (2007). "Association of immunoescape mechanisms with Epstein-Barr virus infection in nasopharyngeal carcinoma." Int J Cancer **120**(11): 2401-10.
- Ohannesian, D. W., D. Lotan, et al. (1995). "Carcinoembryonic antigen and other glycoconjugates act as ligands for galectin-3 in human colon carcinoma cells." Cancer Res **55**(10): 2191-9.
- Ohta, A., E. Gorelik, et al. (2006). "A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(35): 13132-7.
- Oliveira, G. A., K. Wetzel, et al. (2005). "Safety and enhanced immunogenicity of a hepatitis B core particle Plasmodium falciparum malaria vaccine formulated in adjuvant Montanide ISA 720 in a phase I trial." Infect Immun **73**(6): 3587-97.
- Onizuka, S., I. Tawara, et al. (1999). "Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody." Cancer Res **59**(13): 3128-33.
- Openo, K. P., M. M. Kadrofske, et al. (2000). "Galectin-3 expression and subcellular localization in senescent human fibroblasts." Exp Cell Res **255**(2): 278-90.
- Orazi, A., R. A. Hromas, et al. (1997). "Posttransplantation lymphoproliferative disorders in bone marrow transplant recipients are aggressive diseases with a high incidence of adverse histologic and immunobiologic features." Am J Clin Pathol **107**(4): 419-29.
- Ostman, S., M. Taube, et al. (2005). "Tolerosome-induced oral tolerance is MHC dependent." Immunology **116**(4): 464-76.
- Oudejans, J. J., N. M. Jiwa, et al. (1997). "Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease: more than just an innocent bystander." J Pathol **181**(4): 353-6.
- Oyama, T., S. Ran, et al. (1998). "Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells." J Immunol **160**(3): 1224-32.
- Ozaki, K., K. Inoue, et al. (2004). "Functional variation in LGALS2 confers risk of myocardial infarction and regulates lymphotoxin-alpha secretion in vitro." Nature **429**(6987): 72-5.
- Ozeki, Y., T. Matsui, et al. (1995). "Tissue fibronectin is an endogenous ligand for galectin-1." Glycobiology **5**(2): 255-61.
- Paludan, C., K. Bickham, et al. (2002). "Epstein-Barr nuclear antigen 1-specific CD4(+) Th1 cells kill Burkitt's lymphoma cells." J Immunol **169**(3): 1593-603.
- Pang, M. F., K. W. Lin, et al. (2009). "The signaling pathways of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A (LMP2A) in latency and cancer." Cell Mol Biol Lett **14**(2): 222-47.

- Panina-Bordignon, P., A. Tan, et al. (1989). "Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells." Eur J Immunol **19**(12): 2237-42.
- Pappworth, I. Y., E. C. Wang, et al. (2007). "The switch from latent to productive infection in Epstein-Barr virus-infected B cells is associated with sensitization to NK cell killing." J Virol **81**(2): 474-82.
- Pardali, K. and A. Moustakas (2007). "Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer." Biochim Biophys Acta **1775**(1): 21-62.
- Parry, R. V., J. M. Chemnitz, et al. (2005). "CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms." Mol Cell Biol **25**(21): 9543-53.
- Pathmanathan, R., U. Prasad, et al. (1995). "Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma." N Engl J Med **333**(11): 693-8.
- Patnaik, S. K., B. Potvin, et al. (2006). "Complex N-glycans are the major ligands for galectin-1, -3, and -8 on Chinese hamster ovary cells." Glycobiology **16**(4): 305-17.
- Paya, C. V., J. J. Fung, et al. (1999). "Epstein-Barr virus-induced posttransplant lymphoproliferative disorders. ASTS/ASTP EBV-PTLD Task Force and The Mayo Clinic Organized International Consensus Development Meeting." Transplantation **68**(10): 1517-25.
- Pêche, H., K. Renaudin, et al. (2006). "Induction of tolerance by exosomes and short-term immunosuppression in a fully MHC-mismatched rat cardiac allograft model." Am J Transplant **6**(7): 1541-50.
- Pedneault, L., N. Lapointe, et al. (1996). "Antibody responses to two Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigens (EBNA-1 and EBNA-2) during EBV primary infection in children born to mothers infected with human immunodeficiency virus." Clin Infect Dis **23**(4): 806-8.
- Pegtel, D. M., J. Middeldorp, et al. (2004). "Epstein-Barr virus infection in ex vivo tonsil epithelial cell cultures of asymptomatic carriers." J Virol **78**(22): 12613-24.
- Pegtel, D. M., A. Subramanian, et al. (2005). "Epstein-Barr-virus-encoded LMP2A induces primary epithelial cell migration and invasion: possible role in nasopharyngeal carcinoma metastasis." J Virol **79**(24): 15430-42.
- Peli, J., M. Schroter, et al. (1999). "Oncogenic Ras inhibits Fas ligand-mediated apoptosis by downregulating the expression of Fas." EMBO J **18**(7): 1824-31.
- Perillo, N. L., C. H. Uittenbogaart, et al. (1997). "Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes." J Exp Med **185**(10): 1851-8.
- Peters, P. J., H. J. Geuze, et al. (1989). "Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes." Eur J Immunol **19**(8): 1469-75.
- Pfeffer, S., M. Zavolan, et al. (2004). "Identification of virus-encoded microRNAs." Science **304**(5671): 734-6.
- Pfeffer, S. R. (2009). "Two Rabs for exosome release." Nat Cell Biol **12**(1): 3-4.
- Pfizenmaier, K., H. Bartsch, et al. (1985). "Differential gamma-interferon response of human colon carcinoma cells: inhibition of proliferation and modulation of immunogenicity as independent effects of gamma-interferon on tumor cell growth." Cancer Res **45**(8): 3503-9.
- Piccirillo, C. A. and E. M. Shevach (2001). "Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells." J Immunol **167**(3): 1137-40.
- Pioche-Durieu, C., C. Keryer, et al. (2005). "In nasopharyngeal carcinoma cells, Epstein-Barr virus LMP1 interacts with galectin 9 in membrane raft elements resistant to simvastatin." J Virol **79**(21): 13326-37.

- Piriou, E. R., K. van Dort, et al. (2004). "Altered EBV viral load setpoint after HIV seroconversion is in accordance with lack of predictive value of EBV load for the occurrence of AIDS-related non-Hodgkin lymphoma." J Immunol **172**(11): 6931-7.
- Pisitkun, T., R. F. Shen, et al. (2004). "Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(36): 13368-73.
- Pitti, R. M., S. A. Marsters, et al. (1998). "Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer." Nature **396**(6712): 699-703.
- Pols, M. S. and J. Klumperman (2009). "Trafficking and function of the tetraspanin CD63." Exp Cell Res **315**(9): 1584-92.
- Powrie, F., J. Carlino, et al. (1996). "A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells." J Exp Med **183**(6): 2669-74.
- Precopio, M. L., J. L. Sullivan, et al. (2003). "Differential kinetics and specificity of EBV-specific CD4+ and CD8+ T cells during primary infection." J Immunol **170**(5): 2590-8.
- Pudney, V. A., A. M. Leese, et al. (2005). "CD8+ immunodominance among Epstein-Barr virus lytic cycle antigens directly reflects the efficiency of antigen presentation in lytically infected cells." J Exp Med **201**(3): 349-60.
- Qasibash, M. H., E. Wieder, et al. (2004). "Vaccination with the PR1 leukemia-associated antigen can induce complete remission in patients with myeloid leukemia (abstract 259)." Blood **104**: 77a.
- Qin, Z., G. Richter, et al. (1998). "B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity." Nat Med **4**(5): 627-30.
- Raab-Traub, N. (2002). "Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC." Semin Cancer Biol **12**(6): 431-41.
- Rabesandratana, H., J. P. Toutant, et al. (1998). "Decay-accelerating factor (CD55) and membrane inhibitor of reactive lysis (CD59) are released within exosomes during In vitro maturation of reticulocytes." Blood **91**(7): 2573-80.
- Rabinovich, G. A., L. G. Baum, et al. (2002). "Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response?" Trends Immunol **23**(6): 313-20.
- Rabinovich, G. A., M. A. Toscano, et al. (2007). "Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices." Curr Opin Struct Biol **17**(5): 513-20.
- Rajendran, L., M. Honsho, et al. (2006). "Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(30): 11172-7.
- Rankin, E. B. and A. J. Giaccia (2008). "The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis." Cell Death Differ **15**(4): 678-85.
- Raposo, G., H. W. Nijman, et al. (1996). "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles." J Exp Med **183**(3): 1161-72.
- Read, S., V. Malmstrom, et al. (2000). "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation." J Exp Med **192**(2): 295-302.
- Reading, P. C., P. G. Whitney, et al. (2007). "IL-18, but not IL-12, regulates NK cell activity following intranasal herpes simplex virus type 1 infection." J Immunol **179**(5): 3214-21.
- Rechreche, H., G. V. Mallo, et al. (1997). "Cloning and expression of the mRNA of human galectin-4, an S-type lectin down-regulated in colorectal cancer." Eur J Biochem **248**(1): 225-30.
- Reddy, S. P., W. F. Raslan, et al. (1995). "Prognostic significance of keratinization in nasopharyngeal carcinoma." Am J Otolaryngol **16**(2): 103-8.
- Renner, C., S. Ohnesorge, et al. (1996). "T cells from patients with Hodgkin's disease have a defective T-cell receptor zeta chain expression that is reversible by T-cell stimulation with CD3 and CD28." Blood **88**(1): 236-41.

- Ressing, M. E., D. van Leeuwen, et al. (2003). "Interference with T cell receptor-HLA-DR interactions by Epstein-Barr virus gp42 results in reduced T helper cell recognition." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(20): 11583-8.
- Ressing, M. E., D. van Leeuwen, et al. (2005). "Epstein-Barr virus gp42 is posttranslationally modified to produce soluble gp42 that mediates HLA class II immune evasion." J Virol **79**(2): 841-52.
- Restifo, N. P. (2000). "Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape." Nat Med **6**(5): 493-5.
- Restifo, N. P. (2001). "Countering the 'counterattack' hypothesis." Nat Med **7**(3): 259.
- Rhodes, G., H. Rumpold, et al. (1987). "Autoantibodies in infectious mononucleosis have specificity for the glycine-alanine repeating region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen." J Exp Med **165**(4): 1026-40.
- Rickinson, A. B. and D. J. Moss (1997). "Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection." Annu Rev Immunol **15**: 405-31.
- Riker, A., J. Cormier, et al. (1999). "Immune selection after antigen-specific immunotherapy of melanoma." Surgery **126**(2): 112-20.
- Robinson, N., J. Pleasance, et al. (2010). "The kinetics of local cytokine and galectin expression after challenge infection with the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*." Int J Parasitol **41**(5): 487-93.
- Rochaix, P., S. Krajewski, et al. (1999). "In vivo patterns of Bcl-2 family protein expression in breast carcinomas in relation to apoptosis." J Pathol **187**(4): 410-5.
- Ronchetti, S., O. Zollo, et al. (2004). "GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations." Eur J Immunol **34**(3): 613-22.
- Rosenberg, S. A., J. C. Yang, et al. (1998). "Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma." Nat Med **4**(3): 321-7.
- Rosenzweig, S. D. and S. M. Holland (2005). "Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways." Immunol Rev **203**: 38-47.
- Roth, W., S. Isenmann, et al. (2001). "Soluble decoy receptor 3 is expressed by malignant gliomas and suppresses CD95 ligand-induced apoptosis and chemotaxis." Cancer Res **61**(6): 2759-65.
- Rowe, D. T., L. Qu, et al. (1997). "Use of quantitative competitive PCR to measure Epstein-Barr virus genome load in the peripheral blood of pediatric transplant patients with lymphoproliferative disorders." J Clin Microbiol **35**(6): 1612-5.
- Rubinstein, N., J. M. Ilarregui, et al. (2004). "The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response." Tissue Antigens **64**(1): 1-12.
- Saas, P., P. R. Walker, et al. (1997). "Fas ligand expression by astrocytoma in vivo: maintaining immune privilege in the brain?" J Clin Invest **99**(6): 1173-8.
- Sadlack, B., J. Lohler, et al. (1995). "Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells." Eur J Immunol **25**(11): 3053-9.
- Sakaguchi, S. (2004). "Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses." Annu Rev Immunol **22**: 531-62.
- Sakaguchi, S., K. Fukuma, et al. (1985). "Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease." J Exp Med **161**(1): 72-87.

- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." J Immunol **155**(3): 1151-64.
- Sallusto, F., D. Lenig, et al. (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." Nature **401**(6754): 708-12.
- Salomoni, P., B. J. Ferguson, et al. (2008). "New insights into the role of PML in tumour suppression." Cell Res **18**(6): 622-40.
- Sanda, M. G., N. P. Restifo, et al. (1995). "Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer." J Natl Cancer Inst **87**(4): 280-5.
- Saridakis, V., Y. Sheng, et al. (2005). "Structure of the p53 binding domain of HAUSP/USP7 bound to Epstein-Barr nuclear antigen 1 implications for EBV-mediated immortalization." Mol Cell **18**(1): 25-36.
- Saul, A., G. Lawrence, et al. (2005). "A human phase 1 vaccine clinical trial of the Plasmodium falciparum malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1 in Montanide ISA720 adjuvant." Vaccine **23**(23): 3076-83.
- Saussez, S. and R. Kiss (2006). "Galectin-7." Cell Mol Life Sci **63**(6): 686-97.
- Savina, A., M. Vidal, et al. (2002). "The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11." J Cell Sci **115**(Pt 12): 2505-15.
- Savoldo, B., J. A. Goss, et al. (2006). "Treatment of solid organ transplant recipients with autologous Epstein Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs)." Blood **108**(9): 2942-9.
- Schaefer, B. C., J. L. Strominger, et al. (1997). "Host-cell-determined methylation of specific Epstein-Barr virus promoters regulates the choice between distinct viral latency programs." Mol Cell Biol **17**(1): 364-77.
- Schnitzer, J. K., S. Berzel, et al. (2010). "Fragments of antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes induce protective immunity against Leishmania major." Vaccine **28**(36): 5785-93.
- Schreiber, H., T. H. Wu, et al. (2002). "Immunodominance and tumor escape." Semin Cancer Biol **12**(1): 25-31.
- Scotet, E., J. David-Ameline, et al. (1996). "T cell response to Epstein-Barr virus transactivators in chronic rheumatoid arthritis." J Exp Med **184**(5): 1791-800.
- Scully, R., S. Qin, et al. (1994). "Mechanisms in CD4 antibody-mediated transplantation tolerance: kinetics of induction, antigen dependency and role of regulatory T cells." Eur J Immunol **24**(10): 2383-92.
- Secondino, S., M. Zecca, et al. (2011). "T-cell therapy for EBV-associated nasopharyngeal carcinoma: preparative lymphodepleting chemotherapy does not improve clinical results." Ann Oncol **23**(2): 435-41.
- Seddiki, N., B. Santner-Nanan, et al. (2006). "Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells." J Exp Med **203**(7): 1693-700.
- Seddon, B. and D. Mason (1999). "Peripheral autoantigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity." J Exp Med **189**(5): 877-82.
- Seelenmeyer, C., S. Wegehingel, et al. (2005). "Cell surface counter receptors are essential components of the unconventional export machinery of galectin-1." J Cell Biol **171**(2): 373-81.
- Segura, E., S. Amigorena, et al. (2005). "Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses." Blood Cells Mol Dis **35**(2): 89-93.
- Segura, E., C. Nicco, et al. (2005). "ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming." Blood **106**(1): 216-23.

- Seki, M., S. Oomizu, et al. (2008). "Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis." Clin Immunol **127**(1): 78-88.
- Seliger, B., T. Cabrera, et al. (2002). "HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells." Semin Cancer Biol **12**(1): 3-13.
- Seliger, B., A. Hohne, et al. (1997). "Expression and function of the peptide transporters in escape variants of human renal cell carcinomas." Exp Hematol **25**(7): 608-14.
- Semenza, G. L. (2002). "HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics." Trends Mol Med **8**(4 Suppl): S62-7.
- Shah, K. M., S. E. Stewart, et al. (2009). "The EBV-encoded latent membrane proteins, LMP2A and LMP2B, limit the actions of interferon by targeting interferon receptors for degradation." Oncogene.
- Shannon-Lowe, C. D., B. Neuhierl, et al. (2006). "Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(18): 7065-70.
- Sharma, S., M. Stolina, et al. (1999). "T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function." J Immunol **163**(9): 5020-8.
- Sharp, T. V., D. A. Raine, et al. (1999). "Activation of the interferon-inducible (2'-5') oligoadenylate synthetase by the Epstein-Barr virus RNA, EBER-1." Virology **257**(2): 303-13.
- Shen, L., A. C. Liang, et al. (2002). "Frequent deletion of Fas gene sequences encoding death and transmembrane domains in nasal natural killer/T-cell lymphoma." Am J Pathol **161**(6): 2123-31.
- Sheng, Y., V. Saridakis, et al. (2006). "Molecular recognition of p53 and MDM2 by USP7/HAUSP." Nat Struct Mol Biol **13**(3): 285-91.
- Sheu, L. F., A. Chen, et al. (1996). "Enhanced malignant progression of nasopharyngeal carcinoma cells mediated by the expression of Epstein-Barr nuclear antigen 1 in vivo." J Pathol **180**(3): 243-8.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, et al. (1999). "Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity." J Immunol **163**(10): 5211-8.
- Shire, K., P. Kapoor, et al. (2006). "Regulation of the EBNA1 Epstein-Barr virus protein by serine phosphorylation and arginine methylation." J Virol **80**(11): 5261-72.
- Sica, G. L., I. H. Choi, et al. (2003). "B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity." Immunity **18**(6): 849-61.
- Sitkovsky, M., D. Lukashev, et al. (2008). "Adenosine A2A receptor antagonists: blockade of adenosinergic effects and T regulatory cells." Br J Pharmacol **153** Suppl 1: S457-64.
- Sitkovsky, M. V. and A. Ohta (2005). "The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors?" Trends Immunol **26**(6): 299-304.
- Skubitz, K. M., K. D. Campbell, et al. (1996). "CD63 associates with tyrosine kinase activity and CD11/CD18, and transmits an activation signal in neutrophils." J Immunol **157**(8): 3617-26.
- Smith, C., J. Tsang, et al. (2012). "Effective treatment of metastatic forms of Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma with a novel adenovirus-based adoptive immunotherapy." Cancer Res **72**(5): 1116-25.
- Soong, T. W. and K. M. Hui (1992). "Locus-specific transcriptional control of HLA genes." J Immunol **149**(6): 2008-20.
- Southwood, S., J. Sidney, et al. (1998). "Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires." J Immunol **160**(7): 3363-73.
- Spano, J. P., P. Busson, et al. (2003). "Nasopharyngeal carcinomas: an update." Eur J Cancer **39**(15): 2121-35.

- Speck, P. and R. Longnecker (2000). "Infection of breast epithelial cells with Epstein-Barr virus via cell-to-cell contact." J Natl Cancer Inst **92**(22): 1849-51.
- Spitzenberger, F., J. Graessler, et al. (2001). "Molecular and functional characterization of galectin 9 mRNA isoforms in porcine and human cells and tissues." Biochimie **83**(9): 851-62.
- Staveley-O'Carroll, K., E. Sotomayor, et al. (1998). "Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(3): 1178-83.
- Steigerwald-Mullen, P., M. G. Kurilla, et al. (2000). "Type 2 cytokines predominate in the human CD4(+) T-lymphocyte response to Epstein-Barr virus nuclear antigen 1." J Virol **74**(15): 6748-59.
- Stenmark, H. (2009). "Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(8): 513-25.
- Stephens, L. A. and D. Mason (2000). "CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations." J Immunol **165**(6): 3105-10.
- Steven, N. M., N. E. Annels, et al. (1997). "Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response." J Exp Med **185**(9): 1605-17.
- Steven, N. M., A. M. Leese, et al. (1996). "Epitope focusing in the primary cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus and its relationship to T cell memory." J Exp Med **184**(5): 1801-13.
- Stoorvogel, W., M. J. Kleijmeer, et al. (2002). "The biogenesis and functions of exosomes." Traffic **3**(5): 321-30.
- Straathof, K. C., C. M. Bollard, et al. (2005). "Treatment of nasopharyngeal carcinoma with Epstein-Barr virus--specific T lymphocytes." Blood **105**(5): 1898-904.
- Straathof, K. C., C. M. Bollard, et al. (2003). "Immunotherapy for Epstein-Barr virus-associated cancers in children." Oncologist **8**(1): 83-98.
- Strand, S., W. J. Hofmann, et al. (1996). "Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion?" Nat Med **2**(12): 1361-6.
- Strang, G. and A. B. Rickinson (1987). "Multiple HLA class I-dependent cytotoxicities constitute the "non-HLA-restricted" response in infectious mononucleosis." Eur J Immunol **17**(7): 1007-13.
- Strome, S. E., H. Dong, et al. (2003). "B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma." Cancer Res **63**(19): 6501-5.
- Strowig, T., F. Brilot, et al. (2008). "Tonsilar NK cells restrict B cell transformation by the Epstein-Barr virus via IFN-gamma." PLoS Pathog **4**(2): e27.
- Sturm, A., M. Lensch, et al. (2004). "Human galectin-2: novel inducer of T cell apoptosis with distinct profile of caspase activation." J Immunol **173**(6): 3825-37.
- Subra, C., K. Laulagnier, et al. (2007). "Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies." Biochimie **89**(2): 205-12.
- Suffia, I., S. K. Reckling, et al. (2005). "A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of Leishmania major infection." J Immunol **174**(9): 5444-55.
- Sun, Q., R. L. Burton, et al. (2002). "Cytokine production and cytolytic mechanism of CD4(+) cytotoxic T lymphocytes in ex vivo expanded therapeutic Epstein-Barr virus-specific T-cell cultures." Blood **99**(9): 3302-9.
- Suzuki, H., T. M. Kundig, et al. (1995). "Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta." Science **268**(5216): 1472-6.
- Suzuki, T., H. Tahara, et al. (1995). "Viral interleukin 10 (IL-10), the human herpes virus 4 cellular IL-10 homologue, induces local anergy to allogeneic and syngeneic tumors." J Exp Med **182**(2): 477-86.
- Swarte, V. V., R. E. Mebius, et al. (1998). "Lymphocyte triggering via L-selectin leads to enhanced galectin-3-mediated binding to dendritic cells." Eur J Immunol **28**(9): 2864-71.

- Szajnik, M., M. Czystowska, et al. (2010). "Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg)." PLoS One **5**(7): e11469.
- Takahama, Y., Y. Yamada, et al. (2002). "The prognostic significance of overexpression of the decoy receptor for Fas ligand (DcR3) in patients with gastric carcinomas." Gastric Cancer **5**(2): 61-8.
- Takahashi, T., T. Tagami, et al. (2000). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." J Exp Med **192**(2): 303-10.
- Takahashi, Y., V. Lallemand-Breitenbach, et al. (2004). "PML nuclear bodies and apoptosis." Oncogene **23**(16): 2819-24.
- Takegawa, S., Z. Jin, et al. (2008). "Expression of CCL17 and CCL22 by latent membrane protein 1-positive tumor cells in age-related Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorder." Cancer Sci **99**(2): 296-302.
- Tamaki, H., B. L. Beaulieu, et al. (1995). "Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus in children." J Infect Dis **172**(3): 739-46.
- Tao, Q. and A. T. Chan (2007). "Nasopharyngeal carcinoma: molecular pathogenesis and therapeutic developments." Expert Rev Mol Med **9**(12): 1-24.
- Tarbell, K. V., S. Yamazaki, et al. (2004). "CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes." J Exp Med **199**(11): 1467-77.
- Tartour, E., S. Latour, et al. (1995). "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 **63**(2): 205-12.
- Taylor, D. D. and C. Gercel-Taylor (2005). "Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects." Br J Cancer **92**(2): 305-11.
- Taylor, G. S., H. M. Long, et al. (2006). "A role for intercellular antigen transfer in the recognition of EBV-transformed B cell lines by EBV nuclear antigen-specific CD4+ T cells." J Immunol **177**(6): 3746-56.
- Taylor, P. A., C. J. Lees, et al. (2002). "The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality." Blood **99**(10): 3493-9.
- Temme, S., A. M. Eis-Hubinger, et al. "The herpes simplex virus-1 encoded glycoprotein B diverts HLA-DR into the exosome pathway." J Immunol **184**(1): 236-43.
- Terness, P., T. M. Bauer, et al. (2002). "Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites." J Exp Med **196**(4): 447-57.
- Thery, C., M. Boussac, et al. (2001). "Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles." J Immunol **166**(12): 7309-18.
- Thery, C., L. Duban, et al. (2002). "Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes." Nat Immunol **3**(12): 1156-62.
- Thery, C., M. Ostrowski, et al. (2009). "Membrane vesicles as conveyors of immune responses." Nat Rev Immunol **9**(8): 581-93.
- Thery, C., A. Regnault, et al. (1999). "Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73." J Cell Biol **147**(3): 599-610.
- Thompson, R. H., M. D. Gillett, et al. (2005). "Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma." Cancer **104**(10): 2084-91.

- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." J Exp Med **188**(2): 287-96.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (2000). "Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific." J Immunol **164**(1): 183-90.
- Tiwawech, D., P. Srivatanakul, et al. (2006). "Cytochrome P450 2A6 polymorphism in nasopharyngeal carcinoma." Cancer Lett **241**(1): 135-41.
- Toh, H. C., W. K. Chia, et al. (2010). "Graft-vs-tumor effect in patients with advanced nasopharyngeal cancer treated with nonmyeloablative allogeneic PBSC transplantation." Bone Marrow Transplant **46**(4): 573-9.
- Toledo, H., A. Baly, et al. (2001). "A phase I clinical trial of a multi-epitope polypeptide TAB9 combined with Montanide ISA 720 adjuvant in non-HIV-1 infected human volunteers." Vaccine **19**(30): 4328-36.
- Tomkinson, B. E., R. Maziarz, et al. (1989). "Characterization of the T cell-mediated cellular cytotoxicity during acute infectious mononucleosis." J Immunol **143**(2): 660-70.
- Tourkova, I. L., G. V. Shurin, et al. (2005). "Restoration by IL-15 of MHC class I antigen-processing machinery in human dendritic cells inhibited by tumor-derived gangliosides." J Immunol **175**(5): 3045-52.
- Trajkovic, K., C. Hsu, et al. (2008). "Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes." Science **319**(5867): 1244-7.
- Trams, E. G., C. J. Lauter, et al. (1981). "Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles." Biochim Biophys Acta **645**(1): 63-70.
- Tsao, S. W., G. Tramoutanis, et al. (2002). "The significance of LMP1 expression in nasopharyngeal carcinoma." Semin Cancer Biol **12**(6): 473-87.
- Tsuboi, T. and M. Fukuda (2006). "Rab3A and Rab27A cooperatively regulate the docking step of dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells." J Cell Sci **119**(Pt 11): 2196-203.
- Tsuji, S., R. Hosotani, et al. (2003). "Endogenous decoy receptor 3 blocks the growth inhibition signals mediated by Fas ligand in human pancreatic adenocarcinoma." Int J Cancer **106**(1): 17-25.
- Tugizov, S. M., J. W. Berline, et al. (2003). "Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells." Nat Med **9**(3): 307-14.
- Tureci, O., H. Schmitt, et al. (1997). "Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease." J Biol Chem **272**(10): 6416-22.
- Tytell, M. (2005). "Release of heat shock proteins (Hsps) and the effects of extracellular Hsps on neural cells and tissues." Int J Hyperthermia **21**(5): 445-55.
- Uhlig, H. H., J. Coombes, et al. (2006). "Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis." J Immunol **177**(9): 5852-60.
- Uyttenhove, C., L. Pilotte, et al. (2003). "Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase." Nat Med **9**(10): 1269-74.
- Valenti, R., V. Huber, et al. (2007). "Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression." Cancer Res **67**(7): 2912-5.
- Valentine, R., C. W. Dawson, et al. "Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 inhibits the canonical NF-kappaB pathway in carcinoma cells by inhibiting IKK phosphorylation." Mol Cancer **9**: 1.
- Valzasina, B., S. Piconese, et al. (2006). "Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4+CD25- lymphocytes is thymus and proliferation independent." Cancer Res **66**(8): 4488-95.

- van Beek, J., A. A. Brink, et al. (2003). "In vivo transcription of the Epstein-Barr virus (EBV) BamHI-A region without associated in vivo BARF0 protein expression in multiple EBV-associated disorders." J Gen Virol **84**(Pt 10): 2647-59.
- van der Merwe, P. A. and S. J. Davis (2003). "Molecular interactions mediating T cell antigen recognition." Annu Rev Immunol **21**: 659-84.
- Vega, V. L., M. Rodriguez-Silva, et al. (2008). "Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages." J Immunol **180**(6): 4299-307.
- Versteeg, R., K. M. Kruse-Wolters, et al. (1989). "Suppression of class I human histocompatibility leukocyte antigen by c-myc is locus specific." J Exp Med **170**(3): 621-35.
- Viaud, S., C. Thery, et al. "Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next?" Cancer Res **70**(4): 1281-5.
- Vidal, S. M. and L. L. Lanier (2006). "NK cell recognition of mouse cytomegalovirus-infected cells." Curr Top Microbiol Immunol **298**: 183-206.
- Viguer, M., F. Lemaitre, et al. (2004). "Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells." J Immunol **173**(2): 1444-53.
- von Boehmer, H. (2005). "Mechanisms of suppression by suppressor T cells." Nat Immunol **6**(4): 338-44.
- Voo, K. S., G. Peng, et al. (2005). "Functional characterization of EBV-encoded nuclear antigen 1-specific CD4+ helper and regulatory T cells elicited by in vitro peptide stimulation." Cancer Res **65**(4): 1577-86.
- Wada, J., K. Ota, et al. (1997). "Developmental regulation, expression, and apoptotic potential of galectin-9, a beta-galactoside binding lectin." J Clin Invest **99**(10): 2452-61.
- Wada, J., H. Suzuki, et al. (2009). "The contribution of vascular endothelial growth factor to the induction of regulatory T-cells in malignant effusions." Anticancer Res **29**(3): 881-8.
- Walker, J. D., C. L. Maier, et al. (2009). "Cytomegalovirus-infected human endothelial cells can stimulate allogeneic CD4+ memory T cells by releasing antigenic exosomes." J Immunol **182**(3): 1548-59.
- Walker, L. S., A. Chodos, et al. (2003). "Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo." J Exp Med **198**(2): 249-58.
- Wang, F., R. M. Blaese, et al. (1987). "Suppressor T cell clones from patients with acute Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis." J Clin Invest **79**(1): 7-14.
- Wang, J. L., R. M. Gray, et al. (2004). "Nucleocytoplasmic lectins." Biochim Biophys Acta **1673**(1-2): 75-93.
- Weber, J. S. and S. A. Rosenberg (1988). "Modulation of murine tumor major histocompatibility antigens by cytokines in vivo and in vitro." Cancer Res **48**(20): 5818-24.
- Webster, W. S., R. H. Thompson, et al. (2007). "Targeting molecular and cellular inhibitory mechanisms for improvement of antitumor memory responses reactivated by tumor cell vaccine." J Immunol **179**(5): 2860-9.
- Wei, W. I. and D. L. Kwong (2010). "Current management strategy of nasopharyngeal carcinoma." Clin Exp Otorhinolaryngol **3**(1): 1-12.
- Wei, W. I. and J. S. Sham (2005). "Nasopharyngeal carcinoma." Lancet **365**(9476): 2041-54.
- White, I. J., L. M. Bailey, et al. (2006). "EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation." EMBO J **25**(1): 1-12.
- Whiteside, T. L. (1992). "Tumor-infiltrating lymphocytes as antitumor effector cells." Biotherapy **5**(1): 47-61.
- Whiteside, T. L. (2005). "Tumour-derived exosomes or microvesicles: another mechanism of tumour escape from the host immune system?" Br J Cancer **92**(2): 209-11.

- Whitney, B. M., A. T. Chan, et al. (2002). "Frequency of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes in the blood of Southern Chinese blood donors and nasopharyngeal carcinoma patients." J Med Virol **67**(3): 359-63.
- Wieckowski, E. U., C. Visus, et al. (2009). "Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8+ T lymphocytes." J Immunol **183**(6): 3720-30.
- Wildin, R. S., F. Ramsdell, et al. (2001). "X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy." Nat Genet **27**(1): 18-20.
- Williams, H., K. McAulay, et al. (2005). "The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells." Br J Haematol **129**(2): 266-74.
- Wilson, A. D., J. C. Hopkins, et al. (2001). "In vitro cytokine production and growth inhibition of lymphoblastoid cell lines by CD4+ T cells from Epstein-Barr virus (EBV) seropositive donors." Clin Exp Immunol **126**(1): 101-10.
- Wilson, A. D., I. Redchenko, et al. (1998). "CD4+ T cells inhibit growth of Epstein-Barr virus-transformed B cells through CD95-CD95 ligand-mediated apoptosis." Int Immunol **10**(8): 1149-57.
- Wilson, J. B., J. L. Bell, et al. (1996). "Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice." EMBO J **15**(12): 3117-26.
- Winberg, G., L. Matskova, et al. (2000). "Latent membrane protein 2A of Epstein-Barr virus binds WW domain E3 protein-ubiquitin ligases that ubiquitinate B-cell tyrosine kinases." Mol Cell Biol **20**(22): 8526-35.
- Wintterle, S., B. Schreiner, et al. (2003). "Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis." Cancer Res **63**(21): 7462-7.
- Wohlfart, S., D. Seibinger, et al. (2004). "FAS (CD95) mutations are rare in gastric MALT lymphoma but occur more frequently in primary gastric diffuse large B-cell lymphoma." Am J Pathol **164**(3): 1081-9.
- Wolfers, J., A. Lozier, et al. (2001). "Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming." Nat Med **7**(3): 297-303.
- Wollert, T., C. Wunder, et al. (2009). "Membrane scission by the ESCRT-III complex." Nature **458**(7235): 172-7.
- Woo, E. Y., C. S. Chu, et al. (2001). "Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer." Cancer Res **61**(12): 4766-72.
- Wood, V. H., J. D. O'Neil, et al. (2007). "Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 regulates cellular gene transcription and modulates the STAT1 and TGFbeta signaling pathways." Oncogene **26**(28): 4135-47.
- Woodberry, T., T. J. Suscovich, et al. (2005). "Differential targeting and shifts in the immunodominance of Epstein-Barr virus--specific CD8 and CD4 T cell responses during acute and persistent infection." J Infect Dis **192**(9): 1513-24.
- Wu, H., P. Kapoor, et al. (2002). "Separation of the DNA replication, segregation, and transcriptional activation functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1." J Virol **76**(5): 2480-90.
- Wubbolts, R., R. S. Leckie, et al. (2003). "Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation." J Biol Chem **278**(13): 10963-72.
- Xiang, X., Y. Liu, et al. (2010). "TLR2-mediated expansion of MDSCs is dependent on the source of tumor exosomes." Am J Pathol **177**(4): 1606-10.

- Xie, Q. W., R. Whisnant, et al. (1993). "Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide." *J Exp Med* **177**(6): 1779-84.
- Xiong, W., Z. Y. Zeng, et al. (2004). "A susceptibility locus at chromosome 3p21 linked to familial nasopharyngeal carcinoma." *Cancer Res* **64**(6): 1972-4.
- Yamaguchi, T., K. Hirota, et al. (2007). "Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor." *Immunity* **27**(1): 145-59.
- Yamazaki, S., T. Iyoda, et al. (2003). "Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells." *J Exp Med* **198**(2): 235-47.
- Yang, Q. S., K. Ying, et al. (2002). "Cloning and expression of a novel human galectin cDNA, predominantly expressed in placenta(1)." *Biochim Biophys Acta* **1574**(3): 407-11.
- Yang, R. Y., D. K. Hsu, et al. (1996). "Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(13): 6737-42.
- Yang, R. Y., D. K. Hsu, et al. (2001). "Cell cycle regulation by galectin-12, a new member of the galectin superfamily." *J Biol Chem* **276**(23): 20252-60.
- Yin, C., C. M. Knudson, et al. (1997). "Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo." *Nature* **385**(6617): 637-40.
- Young, A. R., G. J. Barcham, et al. (2009). "Functional characterization of an eosinophil-specific galectin, ovine galectin-14." *Glycoconj J* **26**(4): 423-32.
- Young, L. S., C. W. Dawson, et al. (1988). "Epstein-Barr virus gene expression in nasopharyngeal carcinoma." *J Gen Virol* **69** (Pt 5): 1051-65.
- Young, L. S., C. W. Dawson, et al. (2000). "The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes." *Mol Pathol* **53**(5): 238-47.
- Young, L. S. and P. G. Murray (2003). "Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours." *Oncogene* **22**(33): 5108-21.
- Young, L. S. and A. B. Rickinson (2004). "Epstein-Barr virus: 40 years on." *Nat Rev Cancer* **4**(10): 757-68.
- Yue, F. Y., R. Dummer, et al. (1997). "Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules." *Int J Cancer* **71**(4): 630-7.
- Zamanakou, M., A. E. Germenis, et al. (2007). "Tumor immune escape mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase." *Immunol Lett* **111**(2): 69-75.
- Zeidler, R., G. Eissner, et al. (1997). "Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10." *Blood* **90**(6): 2390-7.
- Zeng, Y. X. and W. H. Jia (2002). "Familial nasopharyngeal carcinoma." *Semin Cancer Biol* **12**(6): 443-50.
- Zhang, J., H. Chen, et al. (2001). "Epstein-Barr virus BamHi-a rightward transcript-encoded RPMS protein interacts with the CBF1-associated corepressor CIR to negatively regulate the activity of EBNA2 and Notch1C." *J Virol* **75**(6): 2946-56.
- Zhang, Q., L. Brooks, et al. (1994). "Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 increases HLA class II expression in an EBV-negative B cell line." *Eur J Immunol* **24**(6): 1467-70.
- Zhang, W., R. Caspell, et al. (2009). "ELISPOT assays provide reproducible results among different laboratories for T-cell immune monitoring-even in hands of ELISPOT-inexperienced investigators." *J Immunotoxicol*.
- Zhao, D. M., A. M. Thornton, et al. (2006). "Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes." *Blood* **107**(10): 3925-32.
- Zhu, C., A. C. Anderson, et al. (2005). "The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity." *Nat Immunol* **6**(12): 1245-52.

- Zitvogel, L., N. Fernandez, et al. (1999). "Dendritic cells or their exosomes are effective biotherapies of cancer." Eur J Cancer **35 Suppl 3**: S36-8.
- Zitvogel, L., A. Regnault, et al. (1998). "Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes." Nat Med **4**(5): 594-600.
- Zonfrillo, N. J. and B. Hackley (2008). "The quadrivalent human papillomavirus vaccine: potential factors in effectiveness." J Midwifery Womens Health **53**(3): 188-94.
- Zou, L., B. Barnett, et al. (2004). "Bone marrow is a reservoir for CD4+CD25+ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals." Cancer Res **64**(22): 8451-5.
- Zou, W. (2006). "Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy." Nat Rev Immunol **6**(4): 295-307.
- Zuniga, E., G. A. Rabinovich, et al. (2001). "Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis." J Leukoc Biol **70**(1): 73-9.
- Zuo, J., A. Currin, et al. (2009). "The Epstein-Barr virus G-protein-coupled receptor contributes to immune evasion by targeting MHC class I molecules for degradation." PLoS Pathog **5**(1): e1000255.
- Zuo, J., W. Thomas, et al. (2008). "The DNase of gammaherpesviruses impairs recognition by virus-specific CD8+ T cells through an additional host shutoff function." J Virol **82**(5): 2385-93.

Article 4

ARTICLE 4

La présence du virus d'Epstein-Barr dans les cellules tumorales induit une augmentation des cellules T régulatrices de type 1 (Tr1) chez les patients présentant un Lymphome de Hodgkin.

Epstein-Barr virus Infection Induces an Increase of T Regulatory Type 1 Cells in Hodgkin's Lymphoma Patients.

PlosOne, Manuscrit accepté 2013 (révision mineure)

Olivier Morales*, **Dhafer Mrizak***, Violaine François, Rami Mustapha, Céline Miroux, Stéphane Depil, Anne-Valérie Decouvelaere, Pauline Lionne-Huyghe, Claude Auriault, Yvan de Launoit, Véronique Pancré and Nadira Delhem.

*Co-premier auteur.

Contexte et objectif de l'étude

Chez environ 50% des patients atteints d'un lymphome de Hodgkin (LH), le virus d'Epstein Barr (EBV), un herpès virus oncogène, est présent dans les cellules néoplasiques. L'existence d'un environnement immunosuppresseur chez les patients avec un LH a été clairement décrite dans la littérature, cependant très peu de choses sont connues concernant le mécanisme régulateur induit par l'expression des protéines d'EBV dans les cellules tumorales.

Dans cette étude, notre principal objectif était de mettre en évidence une éventuelle association entre le statut EBV positif chez les patients avec un LH et la présence des lymphocytes T régulateurs.

Méthodologie et résultats

Par une analyse transcriptomique réalisée sur les ARN isolés des tumeurs de LH EBV-positives et EBV-négatives, nous avons mis en évidence que l'infection par EBV augmente de façon significative (i) l'expression des marqueurs associés aux lymphocytes T régulateurs naturels : nTreg (CD4+, CD25, FoxP3, GITR, CTLA4), (ii) l'expression des marqueurs associés aux lymphocytes T régulateurs de type 1 : Tr1 (CD4+, CD49b, CD18, LAG3), ainsi que (ii) l'expression des cytokines immunosuppressives qui sont associées à l'activité suppressive de ces deux sous-population régulatrices (IL10, TGF- β).

De façon intéressante, cette surexpression est associée avec une augmentation de l'expression de plusieurs chimiokines (CCL17, CCL22, CCL4 and CCL20) connues pour attirer les Th2 et les lymphocytes T régulateurs pouvant ainsi contribuer à l'échappement immunitaire. Par ailleurs, le recrutement des Tr1 dans le LH EBV-positif a été confirmé par une analyse en

immunohistochimie sur des biopsies de ganglions et par une analyse en cytométrie de flux sur des PBMC isolés de sang de patients.

Et enfin, nous avons montré par des expériences de Q-PCR, l'ELISA, d'immunohistochimie et de cytométrie de flux que la sécrétion de l'IL-10 (principale cytokine immunosuppressive dont dépend l'activité des Tr1) était significativement augmentée dans les tumeurs et le sang des patients LH EBV-positifs.

Conclusion

Nos résultats proposent un nouveau schéma dans lequel l'EBV recrute les Tr1 au niveau du microenvironnement ganglionnaire en induisant l'expression de plusieurs chimiokines impliquées dans le recrutement des lymphocytes T régulateurs. Nos données suggèrent que l'expression des protéines d'EBV dans les cellules tumorales pourrait favoriser l'échappement des tumeurs à la réponse des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques du virus.

Expéditeur: PLOS ONE <plosone@plos.org>

Date: 25 novembre 2013 20:35:42 UTC+1

Destinataire: Olivier MORALES <olivier.morales@ibl.cnrs.fr>

Objet: PLOS ONE Decision: Revise [PONE-D-13-43159] - [EMID:2bb0b6f38067811b]
PONE-D-13-43159

Epstein-Barr virus Infection Induces an Increase of T Regulatory Type 1 Cells in Hodgkin's Lymphoma Patients.
PLOS ONE

Dear Dr MORALES,

Thank you for submitting your manuscript for review to PLOS ONE. After careful consideration, we feel that your manuscript will likely be suitable for publication if it is revised to address the points below. Therefore, my decision is "**Minor Revision**".

We invite you to submit a revised version of the manuscript that addresses the reviewers comments.

Please note that PLoS does not copy edit accepted manuscripts and as such you need to ensure that your manuscript is free from grammatical/typographical errors. The reviewers have pointed out some of these errors.

We encourage you to submit your revision within forty-five days of the date of this decision.

When your files are ready, please submit your revision by logging on to <http://pone.edmgr.com/> and following the Submissions Needing Revision link. Do not submit a revised manuscript as a new submission. Before uploading, you should proofread your manuscript very closely for mistakes and grammatical errors. Should your manuscript be accepted for publication, you may not have another chance to make corrections as we do not offer pre-publication proofs.

If you would like to make changes to your financial disclosure, please include your updated statement in your cover letter.

Please also include a rebuttal letter that responds to each point brought up by the academic editor and reviewer(s). This letter should be uploaded as a Response to Reviewers file.

In addition, please provide a marked-up copy of the changes made from the previous article file as a Manuscript with Tracked Changes file. This can be done using 'track changes' in programs such as MS Word and/or highlighting any changes in the new document.

If you choose not to submit a revision, please notify us.

Yours sincerely,

Gulfaraz Khan, PhD
Academic Editor
PLOS ONE

Epstein-Barr virus Infection Induces an Increase of T Regulatory Type 1 Cells in Hodgkin's Lymphoma Patients.

Olivier Morales^{1*}, Dhafer Mrizak^{1*}, Violaine François^{1,2}, Rami Mustapha¹, Céline Miroux¹, Stéphane Depil^{1,3,4}, Anne-Valérie Decouvlaere^{5,6}, Pauline Lionne-Huyghe^{3,7}, Claude Auriault^{1,8}, Yvan de Launoit¹, Véronique Pancré¹ and Nadira Delhem^{1,9}.

*Equally contributed to the work.

¹ Institut de Biologie de Lille ; UMR 8161, CNRS, Institut Pasteur de Lille, Université Lille-Nord de France; Lille, FRANCE

² Laboratory of Immunology, ULB Gosselie, Avenue F.D Roosevelt, 50- 1050 Bruxelles, Belgique.

³ Service des Maladies du Sang, Hôpital Huriez CHRU Lille, 2 Avenue Oscar Lambret, 59037 Lille, France.

⁴ Service d'Hématologie, Institut Gustave Roussy, Rue Edouard Vaillant, 94800 Villejuif, France.

⁵ Service d'Anatomo-pathologie, Pôle Biologie Pathologie Eurasanté, 59000 Lille, France.

⁶ Service Anatomie et Cytologie Pathologiques. Centre Léon Bérard, 28, Rue Laennec 69008 Lyon, France.

⁷ Service Hématologie Clinique. Centre hospitalier Besnier, boulevard Besnier 62022 Arras France.

⁸ IPMC UMR 6097, 660 Route des Lucioles - Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France.

⁹ UFR de Biologie Université des Sciences et Technologies de Lille, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

Running title: Tr1 recruitment in EBV-positive HL patients

Key Words: EBV, Hodgkin's Lymphoma, Tr1, IL-10, chemokines

Corresponding Author

Dr. Nadira Delhem

IRCV UMR 8161 Institut de Biologie de Lille

1 rue du Professeur Calmette, CS 50447

59021 Lille Cedex, France.

Tel : +33 320 87 12 53

Fax : +33 320 87 10 19

e-mail : nadira.delhem@ibl.fr

ABSTRACT

Background

In ~ 50% of patients with Hodgkin's Lymphoma, EBV is present in the neoplastic cells. Although, an immunosuppressive environment is currently described in Hodgkin's Lymphoma patients, very little is known concerning regulatory mechanism induced by the expression of EBV proteins in tumor cells. So, we intended here to investigate an association between regulatory T cells and EBV tissue positivity in Hodgkin Lymphoma patients.

Methodology / Principal findings

After transcriptomic analysis of both EBV-positive and -negative tumors, we found that EBV infection increased gene expression of Tr1-related markers (CD4+, CD49b, CD18, LAG3) and associated-immunosuppressive cytokines (IL10, TGF- β). This up-regulation was associated with an over-expression of several chemokines (CCL17, CCL22, CCL4 and CCL20) known to attract Th2 and regulatory T cells thus contributing to immune suppression. Moreover, recruitment of Tr1 cells in EBV-positive Hodgkin Lymphoma was confirmed by immunohistochemical analysis of frozen nodes biopsies and by flow cytometric analysis of PBMCs of EBV-positive patients. Additionally, we showed that IL-10 production was significantly enhanced in tumors and blood of EBV-positive Hodgkin Lymphoma patients.

Conclusions / Significance

Our results propose a new model in which EBV can recruit Tr1 cells to the nodes' microenvironment by inducing the expression of several chemokines implicated in regulatory T cell recruitment. Our data suggests the expression of EBV proteins in tumor cells could enable the escape of EBV-infected tumors cells from the virus-specific CTL response.

Introduction

The Epstein-Barr virus (EBV) is associated with the development of several human malignancies, including Hodgkin's lymphoma (HL) and EBV-positive undifferentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC) [1]. HL is characterized by the presence of the malignant Hodgkin's and Reed-Sternberg (HRS) cells. These cells only constitute a minority of the total tumor mass and are surrounded by a rich background of T cells, B cells, macrophage, and other inflammatory cells [2]. In approximately one-half of HL patients, EBV can be detected in the HRS cells, in which the virus expresses a limited subset of viral genes including the Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA)-1 and the latent membrane proteins (LMP)-1 and LMP-2 [3].

Although EBV-specific cytotoxic T cells (CTLs) can be detected in HL patients and have been shown to kill LMP-1 and LMP-2 expressing cells in vitro, they are unable to eliminate EBV-infected tumor cells in vivo [4]. Several hypotheses have been made to explain the apparent inefficiency of the antitumoral immune response in HL patients. Some studies suggest that CD4⁺ T lymphocytes producing Th2 cytokines and chemokines could probably contribute to the local immunosuppression of Th1 cellular immune response [5,6]. On the other hand, this failure could be caused by an increase in the recruitment of regulatory T cells (Tregss). Tregs are described as specialized immunosuppressive CD4⁺ T cells that play an essential role in controlling autoimmunity and inhibiting the development of a successful antitumoral immune response [7,8,9,10].

Some studies have shown that the number of natural Tregs with CD4⁺CD25⁺ phenotype (nTregs) is elevated in the peripheral blood of HL patients compared to healthy donors, as well as in the blood of patients having an active disease compared to those in remission [11,12]. Their number is also increased in HL tumor tissues where they are found in close

proximity to HRS cells [11,13,14]. Moreover, it has been shown that the expression of EBNA-1 in HL cells mediates up-regulation of CCL20 facilitating the migration of nTregs into the tumor [15].

Another type of regulatory T CD4⁺ cells, with immunosuppressive functions, has also been characterized, termed T regulatory cell 1 (Tr1). Others as well as our group have shown that Tr1 principally express CD18 (Integrin- β 2) and CD49b (Integrin- α 2)[16,17], are generated in the periphery and exert cytokine-mediated suppression. Tr1 have been described as secreting high level of IL-10, moderate levels of transforming growth factor (TGF- β), IFN γ and IL-5 and almost undetectable levels IL-4 [18,19].

Previous studies have clearly demonstrated the involvement of IL-10 mediated suppression in HL disease. Indeed, serum level of IL-10 were frequently elevated in patients with HL and decreased substantially after conventional chemotherapy [20]. It has been also shown that HL patients with elevated IL-10 levels were more likely to have an advanced stage disease and a decreased probability of event-free survival [21]. Moreover, a very interesting study has shown that the cytokines produced by human CD4⁺ T cells stimulated with autologous EBV-transformed lymphoblastoid cell lines include IL-10 [22], suggesting that EBV antigens might induce a Tr1 like response.

But, to date, an involvement of Tr1 cell subpopulation in HL disease has never been described. Moreover, very little is known concerning the regulatory mechanisms induced in presence of EBV. The data presented here firmly establishes the preferred recruitment of Tr1 in HL patients and more particularly in the context of EBV tissue positivity. Our data suggests that EBV expression in tumor cells might enable the escape of EBV-infected HL cells from the virus-specific CTL response.

110 **Materials and Methods**

111 **Patients and Clinical samples**

112 Nodes biopsies

113 Snap frozen biopsies from 60 patients with a histological diagnosis of nodular sclerosis (NS)
114 HL were obtained from the Department of Anatomic-Pathology of the University Hospital
115 Center of Lille. The study was approved by the Institut de Biologie de Lille (CNRS) and
116 University Hospital Center of Lille Institutional Review Boards, and informed consent was
117 obtained in writing for each donor. All biopsies were performed as part of the routine medical
118 follow-up and were snap frozen for subsequent RNA extraction and histological analysis.

119 Patients with HL were included in a retrospective, population-based study and classified
120 according to the WHO classification, and EBV status was assessed by in situ hybridization of
121 LMP1 and EBER in tumoral Reed-Steinberg cells.

122 The study cohort was divided into three groups according to EBV HL status. A first group
123 considered as control was composed of thirty one patients with follicular hyperplasia or
124 chronic lymphadenitis (Table I). This control group was compared to 38 EBV-tissue negative
125 (Table II) and 22 EBV-tissue positive (Table III) HL patients.

126 Blood samples

127 Human blood samples were collected from healthy adult donors (n=9). This procedure was
128 applied with patient's informed consent obtained in accordance with Institutional Review
129 Board approval from the Institut de Biologie de Lille.

130 Human blood from HL patients was obtained by venipuncture directly used for PBMC
131 preparation. EBV status of HL patients was provided by blood sample analysis. EBV + status
132 was confirmed by the presence of anti-VCA IgG (from 116 to 750 U/ml), anti-VCA IgM

(<10 U/ml) and anti-EBNA IgG (from 125 to 579 U/ml) and was also completed by an EBV PCR (from 33 to 88 copies/ μ g of DNA). EBV-negative ($n=6$) and EBV-positive ($n=4$) HL patients were different from those who participated in the biopsies transcriptomic study. All these donors gave informed written consent before the sampling procedure according to the Huriet Law.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from fresh blood samples of healthy volunteers and HL patients by Ficoll density gradient centrifugation (GE healthcare Bio-sciences AB, Uppsala, Sweden).

Real-Time Quantitative PCR assays

Biopsy and serum RNA extraction

Extraction of total RNA from nodes biopsy samples was performed using TRIzolTM reagent (GIBCO BRL, Invitrogen, Scotland UK) as described by the manufacturer. Tissue samples were homogenized in 300 μ l of TRIzol. Homogenized samples were incubated for 5 minutes at room temperature and resuspended in 60 μ l of chloroform (PROLABO, Merck eurolab, France). Total RNA was then immunoprecipitate with 100 μ l of isopropanol (ACROS Organics, USA). The RNA pellet was finally washed twice with 75% ethanol (CARLO ERBA Reagent, France) and dissolved in DNase, Rnase-free distilled water (GIBCO BRL, Invitrogen, Scotland UK). Before reverse transcription, a DNase treatment was performed using the kit Message clean (GenHunter corp, France). Eight μ l of RNA from 1 to 5 μ g were incubated 30 minutes at room temperature, with 1 μ l of 10 X buffer (Kit), 1 μ l of Dnase I (10U/ μ l, Kit) and 0.1 μ l of Rnasin (40U/ μ l from Promega, Charbonnières, France). Finally, 4 μ l of the following mix [1 μ l of EDTA 20mM Rnase free + 3 μ l of H₂O] were added, followed by incubation at 70° C during 15 minutes.

Serum mRNA extraction was achieved using the QIAamp[®] Viral RNA kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France), as described by the manufacturer. Briefly, a serum sample was incubated with AVL buffer supplemented with Carrier RNA. After the addition of ethanol, the sample was applied to the QIAamp spin column and centrifuged. The column was then cleaned, and mRNA were eluted and then stored at -80°C prior to analysis.

Reverse Transcription

About 1 to 4 µg of total RNA were completed with 5µl of the following master mix [1 µl oligo dT (Roche, Meylan, France) + 0.1 µl RNAsin (40 U/µl, PROMEGA, Charbonnières; France) + 4 µl H₂O] and then incubated at 70°C for 5 to 10 minutes. After, 5 minutes at room temperature, 10 µl of the following mix were added [6µl buffer 5X (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) + 1µl DTT (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) + 2µl d NTPs 10 mM + 0.1 µl RNAsin (PROMEGA, Charbonnières; France) + 1µl Superscript (Invitrogen, Cergy Pontoise, France)]. The reaction was then followed by a first incubation step at 45°C for 45 to 60 minutes and a second incubation at 95°C during 5 minutes. Finally, 70µl of H₂O were added for each µg of RNA, to obtain a concentration of 10ng total RNA/1µl.

ABI PRISM[®] 7000 Sequence Detection System

Quantitative PCR reactions were used to quantify gene expression of (i) related nTregs and Tr1 cell markers, (ii) chemokines and their receptor markers and (iii) immunosuppressive and pro-inflammatory cytokines markers. The quantification of transcripts was performed by real-time quantitative RT-PCR using the ABI PRISM[®] 7000 sequence detection system (Applied Biosystems, CA, USA). The mix is optimized for real-time PCR analysis using SYBR Green 1 Dye, Amplitaq Gold[®] DNA polymerase, dNTPs with UTP, Passive Reference 1 required for signal normalization, and optimized buffer components, in a total volume of 50 µl. Each sample was run in 96 wells plate containing 94 primers by performing an initial denaturation

at 95°C for 5 minutes, the PCR reactions were cycled 40 times as follows: 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C. Fluorescence intensity was measured at the end of each elongation phase. The melting curve analysis was carried out immediately after amplification, following the manufacturer's instructions. Amplification of nodes cDNA was successfully repeated twice with cDNA from the same extraction.

All primers were design for real-time PCR use and were purchased from MWG-Biotech (Germany) (Table IV). Housekeeping genes β -actin, GAPDH, HPRT and Ubiquitin were used as control. Samples are quantified using relative standard curves for each amplification reaction, and results were normalized to the housekeeping genes.

Light Cycler-based PCR assay.

cDNA was synthesized from total RNA at a concentration of 100ng/ μ l using oligo dT primers and Superscript reverse transcriptase (GIBCO BRL, Invitrogen, Scotland UK). The quantification of transcripts from samples was confirmed by real-time quantitative RT-PCR using the Light Cycler system (Roche Diagnostics, Meylan, France). The PCR mixture contained the following: *Taq* polymerase, 1X of LightCycler-DNA master SYBRGreen I (Roche Diagnostics, Meylan France), 3mM of $MgCl_2$, 0.5 μ mol/L of each primer and 1 μ l of cDNA preparation (patient cDNA samples) in a total volume of 20 μ l. Sixteen samples were run in parallel by performing an initial denaturation at 95°C for 8 minutes, the PCR reactions were cycled 35 to 40 times as follows: 15 seconds at 95°C, 7 seconds at the appropriate annealing temperature (Table IV), and 18 to 64 seconds at 72°C according to the length of the target sequence annealing (40s at 58° C). Fluorescence intensity was measured at the end of each elongation phase. The melting curve analysis was carried out immediately after amplification, following the manufacturer's instructions. After each Light Cycler run, agarose gel electrophoresis with TBE (Tris-Borate-EDTA)-1.5% agarose (SIGMA-ALDRICH,

Germany) gel, followed by DNA staining with ethidium bromide, was performed to have an independent validation check of the presence of an amplicon. In order to control the length of the amplicon generated, a 100-bp DNA ladder (GIBCO BRL, Invitrogen, Scotland UK) was used.

Data's interpretation and Statistical analysis

PCR results were analysed using the "Relative Gene Expression Method" as described in [23]. Briefly, individual CT values were normalized using average CT values for housekeeping genes ($\Delta CT = CT - CT_{HKG}$). Average ΔCT values for each group were compared to ΔCT values of the control group ($\Delta\Delta CT = \Delta CT - \Delta CT_{S\ group}$). Then evaluation of $2^{-\Delta\Delta CT}$ indicates the fold change in gene expression relative to the control group.

The PCR results relevance were validated by the statistic rank sum Mann-Whitney test. Data were analyzed using the statistical package SigmaStat for Windows 3.0.1 (SPSS) and Sigma XL. All quoted *P*-values are two-sided, with $P < 0.05$ and $P < 0.01$ being respectively considered statistically significant and highly significant.

Histological analysis.

Nodes biopsies were placed in OCT compound (Miles-Elkhart, Naperville, OH) and snap-frozen in liquid nitrogen for subsequent immunohistochemical analysis. We used the DAKO LSAB[®]2 System, HRP (Dako, Carpinteria, CA) based on a modified labelled avidin-biotin technique. Briefly, the 5- μ m frozen sections were fixed in cold acetone. After blocking for 10 min with 0.1% H₂O₂ and normal horse serum in Tris-buffered saline (TBS) for 10 min, slides were incubated with primary Ab (see below) diluted in TBS 2% FCS for 30 min (anti IL-10 Ab: 1/10, other antibodies: 1/40). After washing, biotinylated rabbit anti-mouse IgG (Dako, Carpinteria, CA) diluted in TBS was added for 15 min. The avidin-biotin complex was added

for 10 min followed by 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) for 3 min. Slides were finally counterstained with Mayer's hematoxylin.

Anti-human mAbs CD4, CD25, IL-10, Integrin- α 2 (CD49b), and Integrin- β 2 (CD18) were purchased from Santa Cruz (Tebu-Bio, France).

Slides were examined by two of the authors (ND and VF), who were blinded to the diagnosis. Positive cells exhibiting characteristic red staining were counted for each sample (magnification X200), and the mean number of positive cells was calculated for each patient group.

Flow cytometry analysis.

Cell immunophenotype was analysed by flow cytometry using FACSCalibur flow cytometer powered by CellQuest Pro software. After their harvest, cells were washed with Phosphate-Buffered Saline (PBS) (GIBCO-Life technologies) and labeled with fluochrome-conjugated mAbs. For each assay, the appropriate isotypic control mAbs were used for markers setting (BD Biosciences, USA). Finally, data were analysed with FlowJo software.

MAbs anti-CD4-phycoerythrin(PE)-cyanin(Cy)5 or CD4-fluorescein isothiocyanate (FITC), -CD25-FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA), -CD25-PE (Miltenyi Biotech, Germany), -CD49b-FITC, CD18-PE (BD Biosciences, USA) were used for detection of cell surface antigens. For IL-10 intracellular staining, PBMC were previously permeabilized and stained with PE-IL-10 (BD Biosciences, USA) according to the manufacturer's instructions.

IL-10 production (ELISA)

Serum from healthy donors (n=9), EBV-tissue negative (n=6) and EBV-tissue positive (n=4) HL patients were tested for IL-10 cytokine production by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) method as previously described [24]. 96-well plates (NUNC, Denmark) were

coated overnight with 50µl of a primary antibody solution at a concentration of 2µg/ml. After washes, the plates were saturated with PBS-BSA (Sigma-Aldrich, USA), and serum diluted to half in PBS-BSA, were applied in duplicate and left overnight. A recombinant cytokine range (Pharmingen, Becton Dickinson, USA) was then applied to each plate at rates ranging from 10 ng/ml to 10 pg/ml. After that, the biotin-coupled secondary antibody (1µg/ml) was added, and an amplification phase was performed using streptavidin-peroxidase. Plates were revealed and the revelation reaction was stopped by the addition of HCl 2N. The plates were then read at 492nm and the results were expressed as the mean of triplicate wells after subtraction of the background.

CONFIDENTIEL

Results

Qualitative validation of RNA samples from frozen biopsy

The quality of the RNA extracted from lymph node biopsies of all the patients from the 3 groups (non-tumoral patients, EBV-negative and EBV-positive HL patients) was first verified by electrophoresis gel analysis to view the 18 S and 28 S rRNA bands (Figure 1A).

In addition, RT-QPCR analysis of these RNA samples from the three patient groups showed similar levels of expression of four housekeeping (β -actin, GAPDH, HPRT and ubiquitin) indicating that these samples are directly comparable (Figure 1B).

Modification of Tregs-related gene expression in primary EBV-positive HL

The levels of expression of 17 markers known to be associated with the immunosuppressive phenotype and function of Tregs and Tr1 cells were analyzed via RT-QPCR of cDNA of 91 patients divided into three groups: 22 EBV-positive HL nodes, 38 EBV-negative HL nodes and 31 non-tumoral control nodes.

First of all, comparing the EBV-positive HL nodes with the control nodes revealed a significant or highly significant increase in the gene expression of 10 of these markers: CD4 (8 fold increase, $p < 0.01$), CD25 (3.5 fold increase, $p < 0.05$), FoxP3 (5.5 fold increase, $p < 0.01$), GITR (17 fold increase, $p < 0.01$), CTLA4 (5 fold increase, $p < 0.01$), CD49b (6 fold increase, $p < 0.05$), CD18 (11 fold increase, $p < 0.05$), P-Selectin (5 fold increase, $p < 0.01$), CD40L (3 fold increase, $p < 0.01$) and Lag3 (35 fold increase, $p < 0.01$).

Next, by comparing the EBV-negative HL with control nodes, no significant difference in the expression was observed.

Furthermore, we analyzed how the expression of these markers varied with EBV status by comparing the EBV-positive with the negative nodes. Interestingly, the results revealed a significant up-regulation of 6 markers in the positive tumors: CD4 (8.5 fold increase, $p < 0.05$), FoxP3 (6 fold increase, $p < 0.05$), CTLA4 (5.5 fold increase, $p < 0.01$), CD49b (6.5 fold increase, $p < 0.01$), P-Selectin (6 fold increase, $p < 0.05$) and LAG3 (5 fold increase, $p < 0.05$) (Figure 2A).

Finally, this up-regulation was further validated by performing gel electrophoresis of the amplicons obtained from the RT-QPCR analysis. The results show a similar amplification of GAPDH housekeeping gene in all the samples which allows the further comparison of the genes of interest. Indeed, an increase in the gene expression of: CD4, CD18, CD49b and LAG3 was observed. Electrophoresis gel analysis for 5 patients representative of each group is shown (Figure 2B).

Modification of cytokines and chemokines gene expression in primary EBV-positive HL

In a similar way, the transcriptional profile of cytokines, chemokines and their receptors was analyzed and compared between the same three groups. First of all, comparing the EBV-positive HL nodes with the control nodes revealed a significant or highly significant increase in the gene expression of the immunosuppressive cytokine: IL-10 (7.5 fold increase, $p < 0.01$) and TGF- β 1 (3 fold increase, $p < 0.05$) and their receptors, respectively IL-10-R α (6 fold increase, $p < 0.01$); -R β (5 fold increase, $p < 0.01$) and TGF- β -RII (3.5 fold increase, $p < 0.05$). An increase in the pro-inflammatory cytokines gene expression was also observed: IFN- γ (11 fold increase, $p < 0.05$) and TNF- α (38 fold increase, $p < 0.05$) (Figure 3A). An up-regulation

was also confirmed for several chemokines (CCL17, CCL4, CCL5, CCL22, CCL20 and CXCL9) and some of their receptors (CCR4, CCR5, CCR7) (Figure 3B).

Next, by comparing the EBV-negative HL nodes with control nodes, a significant difference in the expression was only observed in the case of CCR4.

Furthermore, we analyzed how the expression of cytokines, chemokines and chemokine-related markers varied with EBV status by comparing the EBV-positive with the negative nodes. Importantly, the results revealed a significant up-regulation in the gene expression for IL-10 (7.5 fold increase, $p < 0.05$), IL10-R α (6 fold increase, $p < 0.01$), IL10-R β (5 fold increase, $p < 0.01$), TGF- β 1 (3.5 fold increase, $p < 0.05$), IFN- γ (12 fold increase, $p < 0.05$) and TNF- α (38 fold increase, $p < 0.05$) in EBV-positive HL tumors (Figure 3A). In addition, a significant up-regulation of chemokines known to attract regulatory T cells (CCL17, CCL4, CCL5, CCL19, CCL20 and CXCL9) and some of their related-receptors was also observed (CCR5 and CCR7) (Figure 3B).

Protein levels of Tr1 cells markers in nodes biopsies of primary HL patients

The intra-nodal RT-QPCR results were confirmed at the protein level by immunohistochemical analysis which revealed an over-expression of Tr1-specific markers in the nodes of EBV-positive HL patients when compared to those of EBV-negative HL patients (Figure 4A). These results showed that Tr1 markers were mainly over-expressed in the nodes of HL patients along with expression of EBV proteins in HRS cells, whereas Tregs cell markers were increased in the same manner in both EBV-positive and EBV-negative HL tumors compared to the non-tumoral nodes (*data not shown*).

Phenotypic Tr1 cells characterization in blood of primary HL patients

PBMCs were extracted from whole blood of either healthy donors (n=9), EBV-negative (n=6) and EBV-positive HL patients (n=4). These cells were then analyzed by bi-parametric or tri-parametric flow cytometry to study the impact of EBV positivity on the Tr1 population. The results were summarized in Table IV which shows the distribution by percentage of different human immune cell populations in the blood. The results clearly show an increase in the percentage of CD4⁺IL-10⁺ cells, within PBMCs, in HL patients with this increase being greater in EBV-positive patients (4.31% +/-0.85) than in EBV-negative patients (1.53% +/- 1.23). Similarly, an increase in the percentage of CD4⁺CD49b⁺CD18⁺ cells, within PBMCs, was observed in HL patients with this increase again being greater in the EBV-positive patients (4.34% +/- 0.2) than in the EBV-negative patients (2.21% +/- 0.31) (Table IV). Figure 4B, which shows a representative Tri-parametric FACS analysis of CD4⁺CD49b⁺CD18⁺ cells among PBMCs, further demonstrates an augmentation in the percentage of this cell population in the blood of EBV+HL patient when compared to its percentage in the blood of healthy donors. On the contrary, similar work done on the Treg cell population characterized by its co-expression of CD4, CD25 and FoxP3⁺ revealed an increase in the percentage of this population in HL patients that was irrelevant to EBV-status when compared to its percentage in healthy donors (*data not shown*).

Tr1-associated immunosuppressive cytokine: IL-10 in EBV-positive HL patients

The effect of EBV-positivity on IL-10 was essayed at several levels. First of all, RT-QPCR analysis revealed an increase in the IL-10 mRNA expression in the node and serum of EBV-positive HL patients by 7.5 and 4.5 folds respectively when compared to non-tumoral control patients (p<0.01) and by 7.5 and 2.5 folds respectively when compared to EBV-negative HL patients (p<0.05). Next, the amplicons of the RT-QPCR on RNA from the nodes, were further

analyzed by gel electrophoresis. Similar amplification of the β -Actin housekeeping gene in all the samples allows the comparison of IL-10 expression confirming its increase (Figure 5B).

Furthermore, at the protein level, the increase in IL-10 levels was confirmed by immunohistochemistry (Figure 5C). The mean number of IL-10 positive cells was higher in EBV-positive HL tumors (108.6 ± 3.5) than in EBV-negative HL tumors (48 ± 0.2) or non-tumoral controls (0) (Table VI). Moreover, IL-10 levels in the sera, determined by ELISA, were significantly higher by 3.5 folds in EBV-positive HL patients compared to healthy donors ($p < 0.01$), and by 1.75 folds compared with EBV-negative HL patients ($p < 0.05$).

Finally, flow cytometric analysis revealed an increase in the percentage of $CD4^+IL-10^+$ fraction in the blood of EBV-positive HL patients when compared with its percentage in the blood of EBV-negative HL patients (Table IV). (Figure 5E) illustrates a representative biparametric FACS analysis of IL-10 producing $CD4^+$ T cells among PBMCs.

Discussion

Patients with Hodgkin's disease, at presentation or in remission, exhibit a persistent defect in cellular immunity. This defect appears to be the result of increased sensitivity to the activity of suppressor monocytes and regulatory T cells, in addition to abnormal interleukin-2 production. Moreover, patients with advanced disease have an inherent T-lymphocyte defect [25]. In accordance with the literature, our findings in fact do support this immunosuppression, as we have been able to prove, in the context of Hodgkin lymphoma, when compared non-tumoral follicular hyperplasia, an increase in the expression of several genes associated to the two main regulatory T cells sub-populations (Tregs and Tr1). Even more importantly, we are the first to report the contribution of EBV to the preferential recruitment of Tr1 cells in the peripheral blood and nodes of HL patients.

First of all, using two complementary approaches of real time quantitative PCR, we initially showed in HL patients a significant increase in the expression of several markers known to be associated with the phenotype suppressive properties of natural regulatory T cells. These markers include CD25 [26], Foxp3 [27,28], GITR [29], CTLA-4 [30,31], ICAM-1 (CD54) [32], P-selectin [33] and LAG-3 [34]. These results are in correlation with previous data demonstrating the presence of such a population of regulatory T cells infiltrating the tumoral nodes of HL patients; however our work takes these findings one step further by studying the impact of viral status on this population in terms of both quantity and function [14].

Recently, Baumforth et al have also observed a recruitment of Tregs in HL patients, and they were able to demonstrate that the expression of the EBV protein EBNA1 can up-regulate Treg markers. However, by studying FoxP3 expression they showed that the number of Tregs

in primary HL does not vary with EBV status. It's well described that FoxP3 expression on T lymphocytes is mainly restricted to CD4⁺ cells and is a faithful marker of Tregs [35]. On the contrary, in our study, not only have we demonstrated a significant up-regulation of FoxP3, but also of GITR, CTLA-4, P-Selectin and LAG3 in EBV-positive HL tumors confirming a higher infiltration of CD4⁺CD25⁺ cells in a context of HL associated with EBV staining in the HRS cells.

In addition, our collaboration with Hervé Groux, who has described two specific markers of the Tr1 cell subpopulation, allowed us to verify for the first time the implication of these regulatory T cells in HL. Indeed, others as well as our group, have confirmed that the specific expression of two integrins (CD18 and CD49b) on CD4⁺ T cells characterizes the Tr1 cell subpopulation [16,17]. In this study, quantitative gene and protein expressions of CD18 and CD49b significantly increased in tumor biopsy samples of EBV-positive HL patients. We thus carried out flow cytometric analysis of PBMCs of patients with HL confirming that Tr1 levels were enhanced in blood of patients with EBV tissue positivity. Even more interestingly, we have also observed a significant up-regulation of LAG3, currently known to be associated with the Tregs subpopulation, in EBV-positive HL patients. Indeed, Gagliani *et al* have, recently, identified the surface markers CD49b and lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) as being stably and selectively co-expressed on mouse and human Tr1 cells. They showed that the co-expression of CD49b and LAG-3 enables the isolation of highly suppressive human Tr1 cells [36].

Furthermore, our results were in correlation with the analysis of the major cytokines of immunosuppression. Indeed, we found by RT-QPCR an up-regulation of TGF- β in EBV-positive HL tumors, while showing that there is no significant difference in TGF- β expression between EBV-negative HL tumors and non-tumoral nodes. The presence of this anti-

inflammatory cytokine in the nodes of the control group and the EBV-negative patients at the same levels is not surprising since the follicular hyperplasia is a non-specific inflammation of the lymph nodes. TGF- β could have been produced by regulatory CD4⁺CD25⁺ cells or Tr1, but we cannot exclude that it could have been secreted by the HRS cells and eosinophils present in the tissue [6]. In addition, we have observed a significant increase in the intra-nodal expression and secretion of IL-10 in EBV-positive HL patients. We also observed an increase of the CD4⁺ T cells secreting IL-10 in the blood of EBV-positive HL patients. These results are in accordance with studies on the immunosuppressive activity of Tr1 cells being described as largely dependent on IL-10 production and to a lesser extent on TGF- β [19].

Combined together, these results suggest that in EBV-positive Hodgkin's lymphoma, we have a preferential recruitment of the regulatory Tr1 subpopulation whose activity is mainly dependent of IL-10 production. In addition, the significant up-regulation, observed in EBV-positive HL patients, of the alpha and beta chain of the IL-10 receptors suggests an increased sensitivity to IL-10 in EBV-positive lymph node, allowing Tr1 to have a more immunosuppressive effect. As described in the literature concerning the Tr1 subpopulation [37], we observed a moderate expression of IL-5 and no change in the expression of IL-2 nor IL-4. We also measured a massive up-regulation of IFN- γ expression. This production was probably due, in part; to the Th1 effectors' responses in HL patients and; in part; to activated Tr1 cells which are also capable of secreting IFN- γ .

Very interestingly, we also described an overexpression of chemokines CCL-3, CCL-4, CCL-5 in EBV-positive HL nodes, which are described as having the ability to attract Th1 cells via their CCR5 receptor. This could be at the origin of the recruitment of effector T cells to the tumoral nodes. In parallel, we also observed, essentially in EBV-positive HL tumors, an

increased expression of several chemokines (CCL-17, -19, -20, -21, -22, CXCL9). All these chemokines have been described as attractants of Th2 cells and regulatory T cells [38,39,40,41,42,43]. In the context of HL, these results confirm data obtained by Baumforth and al, showing that expression of the EBNA 1 protein in Hodgkin's Lymphoma Cells mediates an up-regulation of CCL20 and the migration of natural regulatory T cells [15]. Furthermore, these results do correlate with the preferential recruitment of regulatory T cells in lymph node of EBV-positive HL tumors. In addition, we have observed an up-regulation of chemokine-associated receptors such as CCR4. It is clear that various subpopulations of Tregs endowed with various clinical significances co-exist in cancer patients [44]. For example, it has been described that Tregs expressing activation markers such as CCR4 may exert more robust immunosuppressive functions and hence be more closely associated with negative prognosis than the general Tregs population [45].

In summary, our results suggest that EBV positivity in HRS cells could stimulate the chemotaxis of Tregs and Tr1 cells probably by inducing expression of several chemokines, which may in turn explain how EBV inhibits virus-specific CTL responses. Although, several studies have suggested that the presence or absence of the virus has no association with disease-free or overall survival, others have suggested an association in very young and in very old patients [46,47,48]. Indeed, the association of Epstein-Barr virus (EBV) with Hodgkin's lymphoma (HL) has been investigated over the last few years. The impact of EBV on the clinical outcome is still controversial, however, some studies have demonstrated that the impact of tumor EBV status on prognosis may be age dependent and young patients with latent EBV infection have favorable prognosis [48,49]. It would be interesting in this study, to increase the number of patients, in an attempt to find a correlation between the age of patients, the recruitment of Tr1 and the clinical outcome.

It would also be interesting to determine the antigenic specificity of Tr1 cells, particularly in the context of EBV-positive Hodgkin's lymphoma where the viral antigens could be presented by dendritic cells or intra-ganglion cells and where HRS cells could induce regulatory T cells. Little is known about the antigen specificity of regulatory T cells. The association of some HL with EBV infection could serve to identify possible targets for these Tr1 cells. For example, it has been already described that peptides of LMP1 and EBNA-1 can induce *in vitro* regulatory T cells [50,51] or recruit them via CCL20 and CCL22 [15], but nothing is known concerning Tr1 cells.

Although many advances have been made in understanding the physiopathology of HL, there is much room for improvement mainly in reducing the long-term risks of its treatment. Further investigation of how EBV recruits and modifies Tr1 suppressive function will contribute not only to our understanding of the pathogenesis of virus-associated malignancies but also to the development of immunotherapeutic strategies targeting Tr1 cells activity.

Acknowledgments

This work received the financial support from the “Association de Recherche contre le Cancer”, the “Fondation de Recherche Médical”, OSEO and the Nord-Pas-de Calais Region. This work was also supported by SIRIC ONCOLille. The authors would like to thank Han Vorng VORNG for his technical assistance

517 **References**

- 518 1. Young LS, Rickinson AB (2004) Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 4: 757-
519 768.
- 520 2. Depil S, Morales O, Auriault C (2004) [Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus]. *Ann Biol*
521 *Clin (Paris)* 62: 639-648.
- 522 3. Young LS, Murray PG (2003) Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to
523 tumours. *Oncogene* 22: 5108-5121.
- 524 4. Chapman AL, Rickinson AB, Thomas WA, Jarrett RF, Crocker J, et al. (2001) Epstein-Barr
525 virus-specific cytotoxic T lymphocyte responses in the blood and tumor site of
526 Hodgkin's disease patients: implications for a T-cell-based therapy. *Cancer Res* 61:
527 6219-6226.
- 528 5. Poppema S, Potters M, Emmens R, Visser L, van den Berg A (1999) Immune reactions in
529 classical Hodgkin's lymphoma. *Semin Hematol* 36: 253-259.
- 530 6. Skinnider BF, Mak TW (2002) The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*
531 99: 4283-4297.
- 532 7. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, et al. (2004) Specific recruitment of
533 regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced
534 survival. *Nat Med* 10: 942-949.
- 535 8. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and
536 function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 330-336.
- 537 9. Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM (1998) CD4+CD25+ T cells inhibit
538 both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique
539 lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 160: 1212-1218.
- 540 10. Wei WZ, Morris GP, Kong YC (2004) Anti-tumor immunity and autoimmunity: a balancing
541 act of regulatory T cells. *Cancer Immunol Immunother* 53: 73-78.
- 542 11. Barath S, Aleksza M, Keresztes K, Toth J, Sipka S, et al. (2006) Immunoregulatory T
543 cells in the peripheral blood of patients with Hodgkin's lymphoma. *Acta Haematol*
544 116: 181-185.
- 545 12. Gandhi MK, Lambley E, Duraiswamy J, Dua U, Smith C, et al. (2006) Expression of LAG-
546 3 by tumor-infiltrating lymphocytes is coincident with the suppression of latent
547 membrane antigen-specific CD8+ T-cell function in Hodgkin lymphoma patients.
548 *Blood* 108: 2280-2289.
- 549 13. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, Bosch R, Garcia JF, et al. (2005) Outcome in
550 Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic
551 and regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 11: 1467-1473.
- 552 14. Marshall NA, Christie LE, Munro LR, Culligan DJ, Johnston PW, et al. (2004)
553 Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of
554 Hodgkin lymphoma. *Blood* 103: 1755-1762.
- 555 15. Baumforth KR, Birgersdotter A, Reynolds GM, Wei W, Kapatai G, et al. (2008)
556 Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in
557 Hodgkin's lymphoma cells mediates Up-regulation of CCL20 and the migration of
558 regulatory T cells. *Am J Pathol* 173: 195-204.
- 559 16. Carpentier A, Conti F, Carriere M, Aoudjehane L, Miroux C, et al. (2009) Analysis of gene
560 transcription in sera during chronic hepatitis C infection. *J Med Virol* 81: 473-480.
- 561 17. Ramoun AA, Darweish SA, Abou El-Ghait HA, Fattouh el SM (2006) Effect of
562 enhancement of uterine involution and earlier initiation of post-partum cyclicity on the
563 reproductive performance of buffalo. *Reprod Fertil Dev* 18: 545-550.
- 564 18. Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG (1996) Interleukin-10 induces a long-term
565 antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* 184: 19-29.
- 566 19. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, et al. (1997) A CD4+ T-cell
567 subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:
568 737-742.

20. Gaiolla RD, Domingues MA, Niero-Melo L, de Oliveira DE Serum levels of interleukins 6, 10, and 13 before and after treatment of classic Hodgkin lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 135: 483-489.
21. Hohaus S, Giachelia M, Massini G, Vannata B, Criscuolo M, et al. (2009) Clinical significance of interleukin-10 gene polymorphisms and plasma levels in Hodgkin lymphoma. *Leuk Res* 33: 1352-1356.
22. Wilson AD, Hopkins JC, Morgan AJ (2001) In vitro cytokine production and growth inhibition of lymphoblastoid cell lines by CD4+ T cells from Epstein-Barr virus (EBV) seropositive donors. *Clin Exp Immunol* 126: 101-110.
23. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
24. Morales O, Depil S, Mrizak D, Martin N, Ndour PA, et al. EBV Latency II-derived peptides induce a specific CD4+ cytotoxic T-cell activity and not a CD4+ regulatory T-cell response. *J Immunother* 35: 254-266.
25. Slivnick DJ, Ellis TM, Nawrocki JF, Fisher RI (1990) The impact of Hodgkin's disease on the immune system. *Semin Oncol* 17: 673-682.
26. Baecher-Allan CM, Hafler DA (2005) Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4+CD25+ T cells. *Clin Immunol* 117: 192; discussion 193.
27. Campbell DJ, Koch MA Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 11: 119-130.
28. Wan YY, Flavell RA (2005) Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5126-5131.
29. Ephrem A, Epstein AL, Stephens GL, Thornton AM, Glass D, et al. Modulation of Treg cells/T effector function by GITR signaling is context-dependent. *Eur J Immunol* 43: 2421-2429.
30. Birebent B, Lorho R, Lechartier H, de Guibert S, Alizadeh M, et al. (2004) Suppressive properties of human CD4+CD25+ regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression. *Eur J Immunol* 34: 3485-3496.
31. Flores-Borja F, Jury EC, Mauri C, Ehrenstein MR (2008) Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19396-19401.
32. Deane JA, Abeynaike LD, Norman MU, Wee JL, Kitching AR, et al. Endogenous regulatory T cells adhere in inflamed dermal vessels via ICAM-1: association with regulation of effector leukocyte adhesion. *J Immunol* 188: 2179-2188.
33. Maganto-Garcia E, Tarrio ML, Grabie N, Bu DX, Lichtman AH Dynamic changes in regulatory T cells are linked to levels of diet-induced hypercholesterolemia. *Circulation* 124: 185-195.
34. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, et al. (2004) Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 21: 503-513.
35. Kim JM, Rudensky A (2006) The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunol Rev* 212: 86-98.
36. Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med* 19: 739-746.
37. McGuirk P, Mills KH (2002) Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol* 23: 450-455.
38. Chen B, Zhang D, Zhou J, Li Q, Zhou L, et al. High CCR6/CCR7 expression and Foxp3+ Treg cell number are positively related to the progression of laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*.
39. Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, et al. (2001) Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 194: 847-853.

40. Liu W, Ren HY, Dong YJ, Wang LH, Yin Y, et al. Bortezomib regulates the chemotactic characteristics of T cells through downregulation of CXCR3/CXCL9 expression and induction of apoptosis. *Int J Hematol* 96: 764-772.
41. Menetrier-Caux C, Faget J, Biota C, Gobert M, Blay JY, et al. Innate immune recognition of breast tumor cells mediates CCL22 secretion favoring Treg recruitment within tumor environment. *Oncoimmunology* 1: 759-761.
42. Svensson H, Olofsson V, Lundin S, Yakkala C, Bjorck S, et al. Accumulation of CCR4(+)CTLA-4 FOXP3(+)CD25(hi) regulatory T cells in colon adenocarcinomas correlate to reduced activation of conventional T cells. *PLoS One* 7: e30695.
43. Zitvogel L, Tanchot C, Granier C, Tartour E Following up tumor-specific regulatory T cells in cancer patients. *Oncoimmunology* 2: e25444.
44. Mandapathil M, Szczepanski M, Harasymczuk M, Ren J, Cheng D, et al. CD26 expression and adenosine deaminase activity in regulatory T cells (Treg) and CD4(+) T effector cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* 1: 659-669.
45. Pere H, Montier Y, Bayry J, Quintin-Colonna F, Merillon N, et al. A CCR4 antagonist combined with vaccines induces antigen-specific CD8+ T cells and tumor immunity against self antigens. *Blood* 118: 4853-4862.
46. Herling M, Rassidakis GZ, Vassilakopoulos TP, Medeiros LJ, Sarris AH (2006) Impact of LMP-1 expression on clinical outcome in age-defined subgroups of patients with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 107: 1240; author reply 1241.
47. Keegan TH, Glaser SL, Clarke CA, Gulley ML, Craig FE, et al. (2005) Epstein-Barr virus as a marker of survival after Hodgkin's lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncol* 23: 7604-7613.
48. Kwon JM, Park YH, Kang JH, Kim K, Ko YH, et al. (2006) The effect of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in Hodgkin's lymphoma. *Ann Hematol* 85: 463-468.
49. Jarrett RF, Stark GL, White J, Angus B, Alexander FE, et al. (2005) Impact of tumor Epstein-Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma: a population-based study. *Blood* 106: 2444-2451.
50. Marshall NA, Vickers MA, Barker RN (2003) Regulatory T cells secreting IL-10 dominate the immune response to EBV latent membrane protein 1. *J Immunol* 170: 6183-6189.
51. Voo KS, Peng G, Guo Z, Fu T, Li Y, et al. (2005) Functional characterization of EBV-encoded nuclear antigen 1-specific CD4+ helper and regulatory T cells elicited by in vitro peptide stimulation. *Cancer Res* 65: 1577-1586.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Qualitative validation of RNA extracted from node biopsies.

Extraction of total RNA from nodes biopsy samples was performed using TRIzolTM reagent.

A. Electrophoresis gel analysis was performed with RNA extracted from nodes biopsies of five patients from each group (non-tumoral control, EBV-negative and EBV-positive patients), showing the 18S and 28S rRNA bands of non-degraded RNA. **B.** RT-QPCR expression of four housekeeping genes (β -actin, GAPDH, HPRT and ubiquitin) performed with RNA extracted from nodes biopsies of these three groups of patients, showing a similar expression in each samples.

Figure 2: Modification of Tregs-related gene expression in primary EBV-positive HL

RT-QPCR was used to quantify gene expression of related natural Tregs and Tr1 cell markers. The study cohort was divided into three groups: (i) a group considered as control patients with follicular hyperplasia or chronic lymphadenitis (n=31); (ii) a group of EBV-negative HL patients (n=38) and (iii) a group of EBV-positive HL patients (n=22). **A.** Gene expression analyses of 17 markers associated with Tregs immunosuppressive phenotype and function. Results are expressed as relative gene expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) to the non-tumoral control. $p < 0.05$ (* or #) and $p < 0.01$ (** or ##) being respectively considered statistically significant and highly significant. **B.** Electrophoresis gel migration of amplicons obtained after RT-QPCR using Light Cycler technology. Electrophoresis gel analysis for 5 patients representative of each group.

Figure 3: Modification of cytokines and chemokines gene expression in primary EBV-positive HL

RT-QPCR was used to quantify gene expression of cytokines, chemokines and associated-receptors. **A.** Gene expression analyses of cytokines and related-receptor associated with Tregs and Tr1 immunosuppressive function and pro-inflammatory cytokines. Results are expressed as relative gene expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) to the non-tumoral control. **B.** Gene expression analyses of chemokines and related-receptor associated with Th1 cells and Treg migration. Results are expressed as relative gene expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) to the non-tumoral control. $p < 0.05$ (*or #) and $p < 0.01$ (** or ##) being respectively considered statistically significant and highly significant.

Figure 4: Intra-nodal expression of Tr1 cell markers determined by immunohistochemical assay

A. CD4 (A-C), CD49b (D-F) and CD18 (G-I) protein expression was assessed by immunohistochemistry on frozen sections of node biopsies from non-tumoral recipients and from EBV-negative and EBV-positive HL patients. The mean CD49b-positive cell count was higher in EBV-positive HL (Fig 4F), than in EBV-negative HL patients (Fig 4E) and in non-tumoral biopsies (Fig 4D). The CD18-positive cell count was also higher in EBV-positive HL (Fig 4I) than in EBV-negative forms (Fig 4H) or in non-tumoral patients (Fig 4G). All pictures have been taken with microscopic magnification X20, except for pictures B and C (magnification X40) to better visualize the infiltration of CD4 T cells in HL biopsies. **B.** Representative triparametric FACS analysis of $CD4^+CD49b^+CD18^+$ cells among PBMC. The number in the upper-right quadrant indicates the percentage of Tr1 cells within PBMC.

Figure 5: Interleukin-10 expression in EBV-negative and EBV-positive HL patients.

A. IL-10 mRNA expression was assessed in serum of healthy donors, EBV+ and EBV- HL patients. IL-10 Expression was significantly higher in EBV+ HL serum than in EBV- HL serum and in healthy serum. **B.** Electrophoresis gel migration of IL-10 amplicon obtained after Q-PCR on biopsies RNA, using Light Cycler technology. The amplicons migration from fives patients from each group was illustrated here and the results were normalized by the GAPDH housekeeping gene expression. **C.** intra-nodal IL-10 expression was assessed by immunohistochemistry on frozen sections of node biopsies from non-tumoral recipients and from EBV-negative and EBV-positive HL patients. The mean IL-10-positive cell count was higher in EBV-positive HL (Fig 5A), than in EBV-negative HL patients (Fig 5B) and in non-tumoral biopsies (Fig 5C). All pictures have been taken with microscopic magnification X20. **D.** The peripheral cytokine secretion of IL-10 was measured by ELISA in sera from healthy donors and EBV+ and EBV- HL patients. **E.** Representative biparametric FACS analysis of IL-10 producing CD4⁺ T cells among PBMC. The number in the upper-right quadrant indicates the percentage of CD4⁺IL-10⁺ cells within PBMC. Microsoft Excel and SigmaStat softwares were used for data treatment and statistical analysis: $p < 0.05$ (*or #) and $p < 0.01$ (** or ##) being respectively considered statistically significant and highly significant.

Tables

Table I: Control patient characteristics

Patient	Sex	Age (years)	EBV status	Observations
FH1	F	30	EBV positive	Non specific chronic lymphadenitis
FH2	M	57	Udt	Non specific chronic lymphadenitis
FH3	M	31	Udt	Follicular Hyperplasia
FH4	F	73	Udt	Non specific chronic lymphadenitis associated to granulomatous infiltrate
FH5	F	18	EBV negative	Non specific follicular lymphadenitis
FH6	M	11	EBV negative	Follicular Hyperplasia
FH7	M	46	Udt	Non specific follicular lymphadenitis
FH8	M	77	Udt	Dermatosis associated lymphadenitis
FH9	M	71	Udt	Chronic Lymphadenitis
FH10	M	24	EBV negative	Chronic Lymphadenitis with Follicular Hyperplasia
FH11	M	53	Udt	Chronic Lymphadenitis
FH12	M	15	EBV negative	Dermatosis associated chronic lymphadenitis
FH13	F	24	Udt	Dermatosis associated lymphadenitis
FH14	M	33	Udt	Follicular Hyperplasia
FH15	F	42	Udt	Chronic Lymphadenitis
FH16	F	8	EBV negative	Follicular Hyperplasia
FH17	F	43	EBV negative	Chronic Lymphadenitis with Immunoblastic Hyperplasia
FH18	F	22	Udt	Chronic Lymphadenitis
FH19	M	71	Udt	
FH20	H	31	EBV negative	Chronic Lymphadenitis
FH21	M	8	Udt	Follicular Hyperplasia
FH22	M	51	Udt	Chronic Lymphadenitis
FH23	F	51	EBV negative	Non specific chronic lymphadenitis with moderate Polyclonal Plasmacytosis
FH24	F	17	EBV negative	Follicular Hyperplasia
FH25	M	49	Udt	Non specific follicular lymphadenitis
FH26	M	49	Udt	Non specific follicular lymphadenitis
FH27	M	3	EBV negative	Non specific follicular lymphadenitis
FH28	M	49	Udt	Follicular Hyperplasia
FH29	M	56	Udt	Chronic Lymphadenitis
FH30	M	5	EBV negative	Follicular Hyperplasia
FH31	M	68	Udt	Follicular Lymphadenitis with Polytypical Plasmacytosis

Table II: Characteristics of EBV-negative HL patients

Patient	Sex	Age (years)	EBV status	Observations
HLEBV- 1	M	16	EBV negative (LMP1-)	Grade II Scleronudular HL (Bennett)
HLEBV- 2	F	56	EBV negative (LMP1-)	HL
HLEBV- 3	M	29	EBV negative (LMP1-)	Grade II Scleronudular HL (Bennett)
HLEBV- 4	M	22	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 5	M	42	EBV negative (LMP1-)	Grade II Scleronudular HL (Bennett)
HLEBV- 6	F	17	EBV negative (LMP1-)	Grade I Mixte Cellularity Scleronudular HL
HLEBV- 7	M	49	EBV negative (LMP1-, EBER-)	Grade II Cell Rich Scleronudular HL
HLEBV- 8	F	21	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 9	M	25	EBV negative (LMP1-)	Grade II Scleronudular HL (Bennett)
HLEBV- 10	F	46	EBV negative (LMP1-)	Grade II Scleronudular HL (Bennett)
HLEBV- 11	F	35	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 12	F	43	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 13	F	22	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 14	F	22	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 15	M	31	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 16	M	22	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 17	F	28	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 18	F	29	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 19	F	31	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 20	F	32	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 21	F	17	EBV negative (LMP1-)	Grade II Scleronudular HL (Bennett)
HLEBV- 22	M	8	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 23	M	21	EBV negative (LMP1-)	Grade II Scleronudular HL (Bennett)
HLEBV- 24	F	17	EBV negative (LMP1-)	Grade II Scleronudular HL (Bennett)
HLEBV- 25	M	71	EBV negative (LMP1-)	Grade II Scleronudular HL (Bennett)
HLEBV- 26	M	46	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 27	F	21	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 28	M	39	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 29	F	49	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 30	M	14	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 31	F	12	EBV negative (LMP1-)	Grade II Scleronudular HL (Bennett)
HLEBV- 32	F	43	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 33	M	42	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 34	M	30	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 35	M	34	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 36	F	17	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 37	F	28	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 38	M	21	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL

Table III: Characteristics of EBV-positive HL patients

Patient	Sex	Age (years)	EBV status	Observations
EBV+ HL 1	F	63	EBV positive (LMP1+)	Mixte Cellularity Type III HL (Lukes Rye)
EBV+ HL 2	M	32	EBV positive (LMP1+)	Grade II Scleronodular HL(Benett), Type II (Lukes Rye)
EBV+ HL 3	M	60	EBV positive (LMP1+)	Lymphocyte Rich HL
EBV+ HL 4	M	46	EBV positive (LMP1+)	HL
EBV+ HL 5	M	25	EBV positive (LMP1+)	Grade I Scleronodular HL (Bennett), Type II (Lukes Rye)
EBV+ HL 6	F	35	EBV positive (LMP1+)	Reccurent HL
EBV+ HL 7	M	36	EBV positive (LMP1+)	Rich Cellularity HL
EBV+ HL 8	M	45	EBV positive (LMP1+)	Grade I Scleronodular HL (Bennett), Type II (Lukes Rye)
EBV+ HL 9	M	25	EBV positive (LMP1+)	Grade I Scleronodular HL (Bennett)
EBV+ HL 10	F	15	EBV positive (LMP1+)	Grade I Scleronodular HL (Bennett), Type II (Lukes Rye)
EBV+ HL 11	F	35	EBV positive (LMP1+)	Grade I Scleronodular HL
EBV+ HL 12	F	21	EBV positive (LMP1+)	Grade I Scleronodular HL (Bennett), Type II (Lukes Rye)
EBV+ HL 13	M	78	EBV positive (LMP1+)	Grade I Scleronodular HL
EBV+ HL 14	M	28	EBV positive (LMP1+, EBER+)	Grade I Scleronodular HL
EBV+ HL 15	F	32	EBV positive (LMP1+)	Lymphocytes Rich Classical HL
EBV+ HL 16	F	22	EBV positive (LMP1+)	Scleronodular HL
EBV+ HL 17	M	42	EBV positive (LMP1+)	Grade I Scleronodular HL
EBV+ HL 18	M	31	EBV positive (LMP1+)	Grade I Scleronodular HL
EBV+ HL 19	F	26	EBV positive (LMP1+)	Grade I Scleronodular HL
EBV+ HL 20	F	80	EBV positive (LMP1+)	Mixte Cellularity Classical HL
EBV+ HL 21	M	35	EBV positive (LMP1+)	Reccurent Classical HL
EBV+ HL 22	M	25	EBV positive (LMP1+)	Grade I Scleronodular HL

Table IV: Primer sequences

Gene Name	Primer Sequences	Hybridation T° (C)
CD4	5'-GGGAAATCAGGGCTCCTTCTTA	59
	5'-TGGTCCCAAGGCTTCTTCTT	
CD25	5'-GGGACTGCTCACGTTTCATCA	59
	5'-TTCAACATGGTTCTCTTCTGTAG	
GITR	5'-TGTGTCCAGCCTGAATTCCA	59
	5'-CCGAGGCACAGTCGATACACT	
CTLA4	5'-TTCTTCTCTTCATCCCTGTCTCT	61
	5'-GAGATGCATACTCACACACAAAGCT	
FoxP3	5'-TCACCTACGCCACGGTCA	59
	5'-CACAAAGCACTTGTGCAG	
P selectin	5'-CTGGAACCCCTGAGTCTACCAC	63
	5'-GTCTGTATCTCCATAGTGTCTGAATC	
ICAM1	5'-CCCTGATGGGCAGTCAACA	60
	5'-GCAGCGTAGGGTAAGTTCTTG	
LAG3	5'-TGGCTTCAACGCTCCATCA	59
	5'-CCCACCCTGGAACCTGCT	
T1/ST2	5'-GTGTTTGCCTCAGGCCAACT	59
	5'-TGACATTGCATATCCAGTCCTA	
IL-10	5'-GCCTAATCATGCTTCGAGATC	59
	5'-TGATGTCTGGGCTTCGTTC	
IL-10 R α	5'-CCGAGAGTATGAGATTGCCATT	60
	5'-CAGATGGTTTACCTGGACACA	
IL-10 R β	5'-TGGGAGTCACCTGCTTTTGC	59
	5'-TCCGTCAAGGTAGTATTCATGCA	
TGF- β	5'-CGAGCCTGAGGCCACTAC	62
	5'-CGGAGCTCTGATGTGTGAAGA	
TGF β -R2	5'-GCTGCTTCTCCAAAGTCATT	58
	5'-AACAAGTCAGGATTGCTGGTGTT	
IL-5	5'-CCACAAGTGCATTGGTAAAGA	58
	5'-TGTACAGGAACAGGAATCCTCAGA	

Gene Name	Primer Sequences	Hybridation T° (C)
IFN γ	5'-ATGTAGCGGATAATGGAAGTC	54
	5'-GACATTCAAGTCAGTTACC	
IL-4	5'- CACAAGCAGTGATCCGATT	59
	5'-TTCCAAGAAGTTTCCAACGTACTC	
IL-2	5'-ACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTAC	61
	5'-TCCAGAGGTTTGAGTTCTTCTCTAGA	
CCL-17	5'-GGGCTTCTCTGCAGCACATC	62
	5'-GGTACCACGTCTTCAGCTTTCTAAG	
CCL-22	5'-TTGCTGTGGCGCTTCAAG	59
	5'-CAGACGGTAACGGACGTAATCAC	
CCR-4	5'-CCACCCTCGATGAAAGCATATAC	59
	5'-TGCCTTGATGCCTTCTTTGG	
CCL-3	5'-ATGGCTCTCTGCAACCACTTCT	61
	5'-CGTCTCAAAGTAGTCAGTATGAAATTC	
CCL-4	5'-GACTGTCTCTGCTCCCTCATGCTA	62
	5'-AAGCTTCTCGCCGTGAAGA	
CCL-5	5'-CTCTGCGCTCTGCATCTG	59
	5'-CAGTGGCGGGCAATG	
CCR-5	5'-GTCAAGTCCAATCTATGACATCAATTATT	57
	5'-CGGGCTGCGATTGCTT	
CCR-7	5'-GAGACAACACCACAGTGACTACAC	62
	5'-GTCAACACGACCAGCCCAT	
β -Actin	5'-TGCTATCCAGGCTGTGCTA	58
	5'-ATGGAGTTGAAGGTAGTTT	
GAPDH	5'-GCCAAGTCAATGACAACTTTGG	58
	5'-GCCTGCTTCACCACCTTCTTGATGTC	
HPRT	5'-CCCTGGCGTCTGTGATTAG	57
	5'-ATGGCCTCCCATCTCCTT	
Ubiquitin	5'-CCGACCACAGTGGCTATG	60
	5'-CCTCTTTAATATCTCCAGGCTTGA	

Table V: Main cell populations fractions within PBMC of non-tumoral and HL patients

	Healthy Donors (n = 9)	EBV- HL (n = 6)	EBV+ HL (n = 4)
IL-10+	0.82% (+/- 0.64)	1.69% (+/- 0.29)	3.76% (+/- 1.25)
CD4+/IL-10+	0.9% (+/- 0.6)	1.53% (+/- 1.23)	4.31 % (+/- 0.85)
CD4+/CD49b+/CD18+	0.69% (+/- 0.85)	2.21 % (+/- 0.31)	4.34% (+/- 0.2)

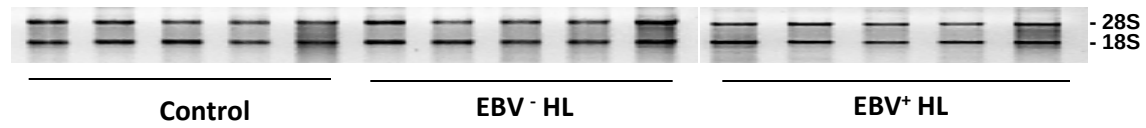
Table VI: Intranodal expression of IL-10 marker (immunohistochemical evaluation)

	Non-Tumoral patients	EBV-negative HL patients	EBV-positive HL patients
IL-10 ^a	0	48 ± 0.2	108.6 ± 3.5

^a Mean of positive cell counts in nodes of the three group of patients studied

CONFIDENTIEL

A



B

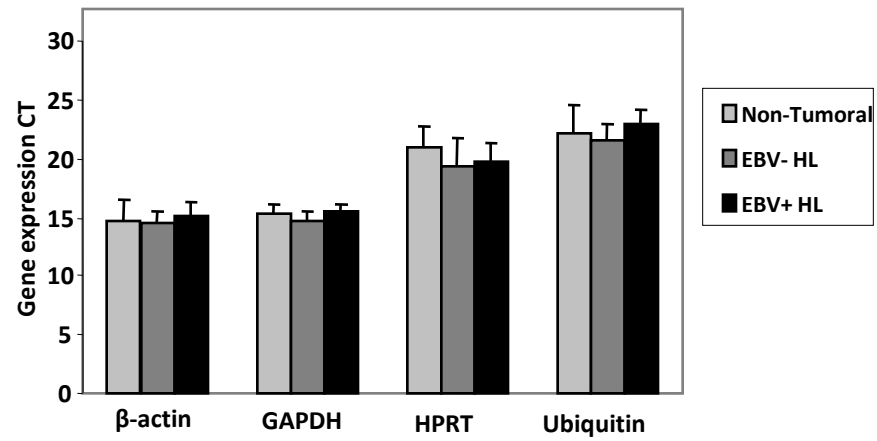
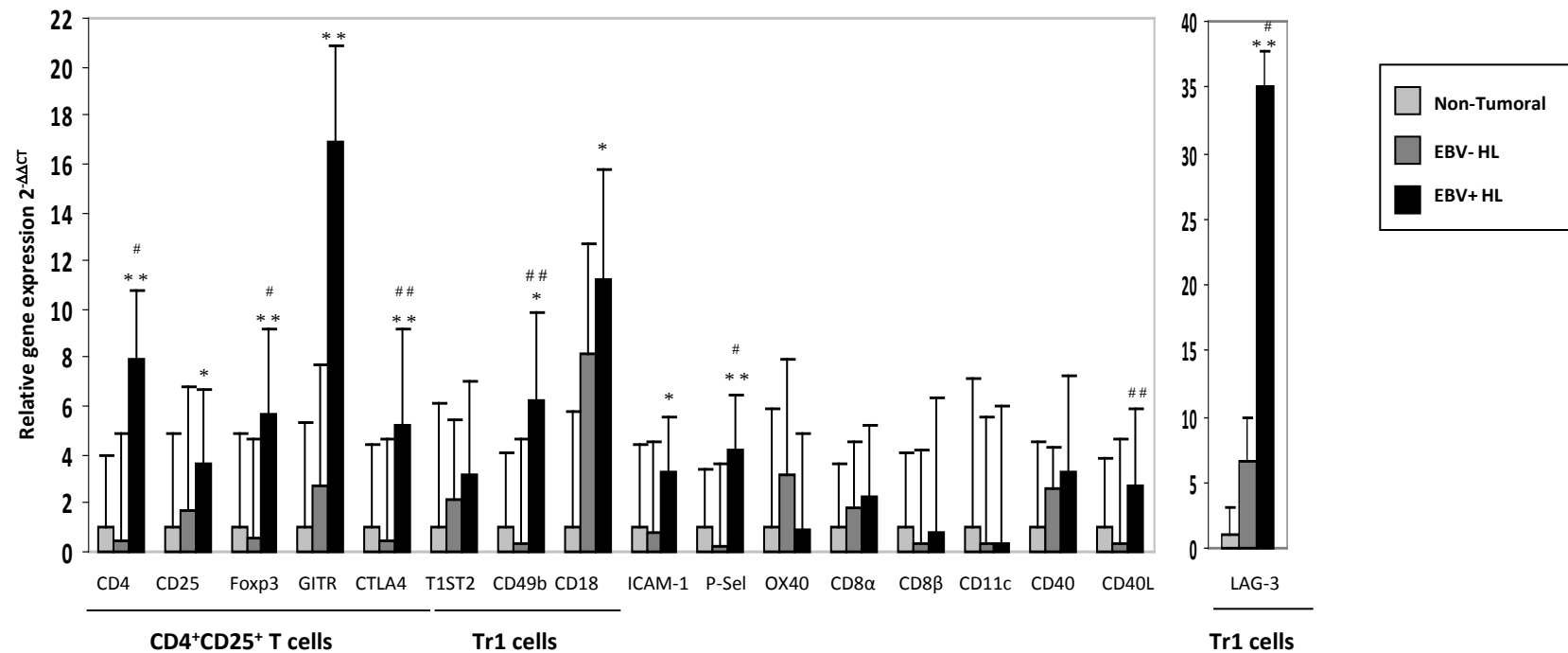
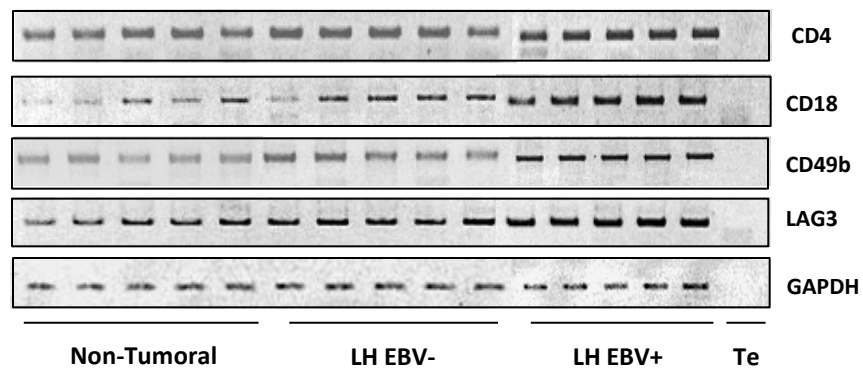
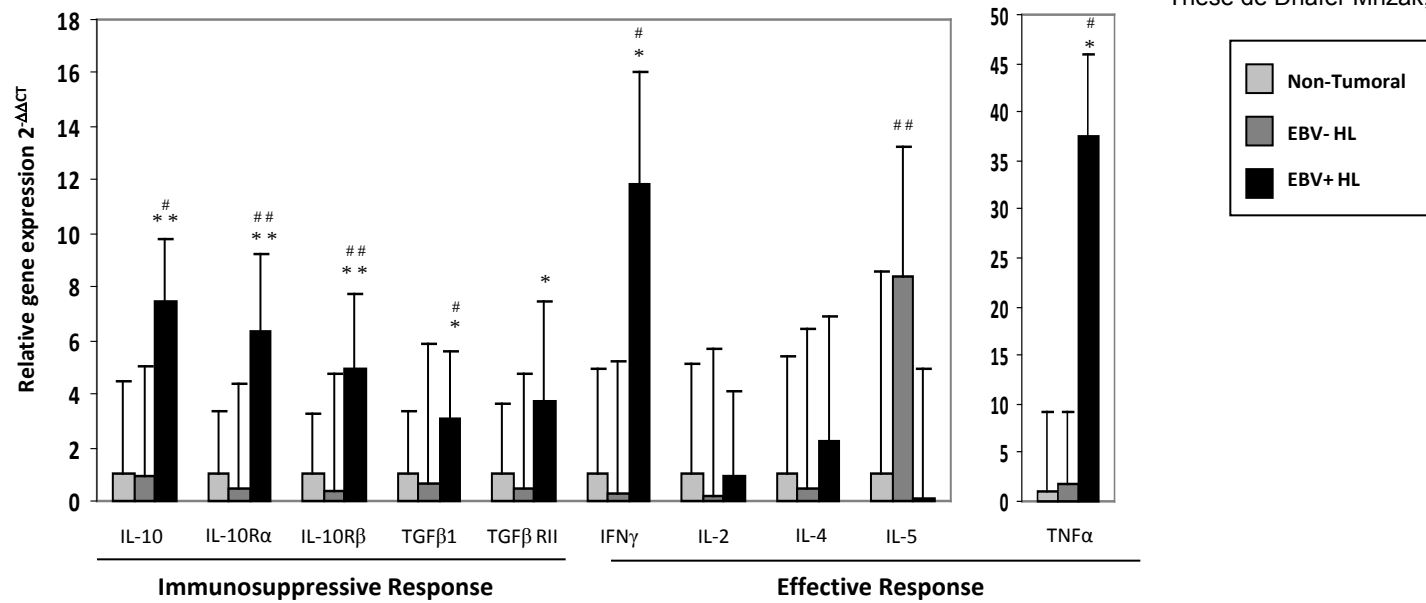


Figure 1

A**B****Figure 2**

A



B

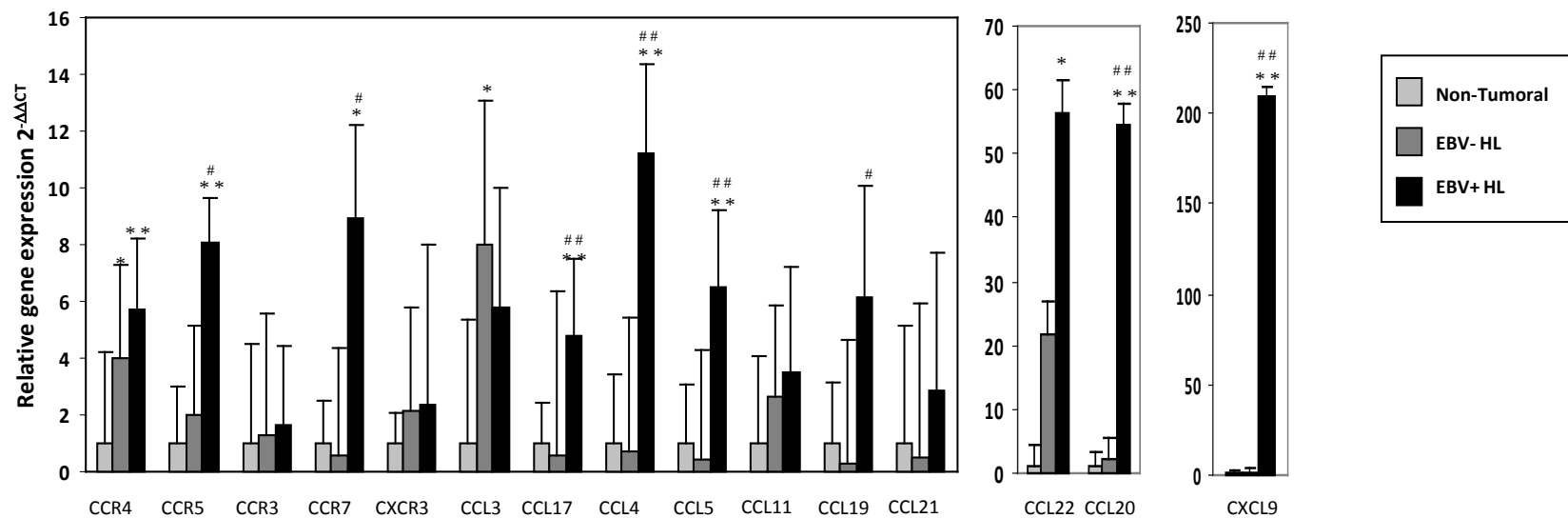
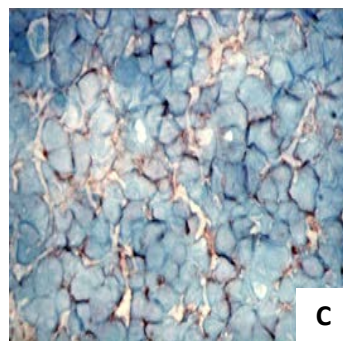
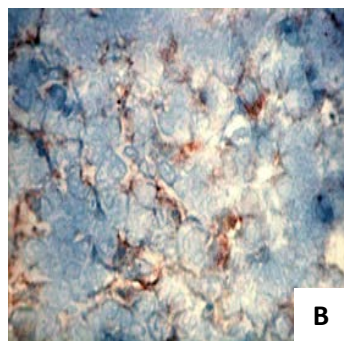
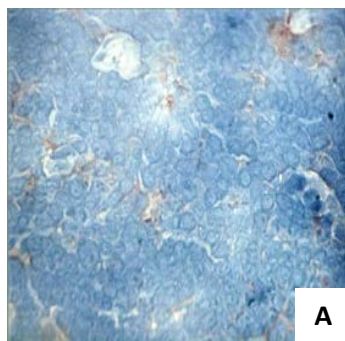
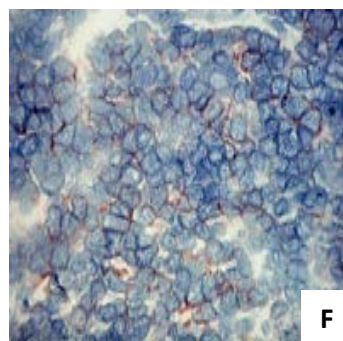
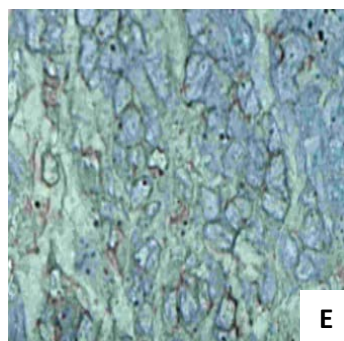
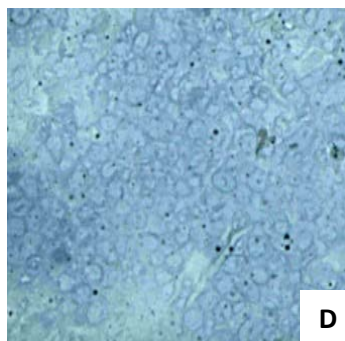
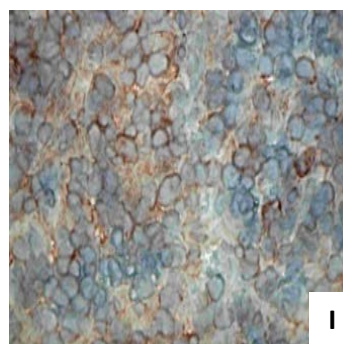
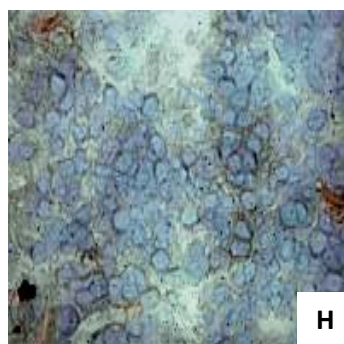
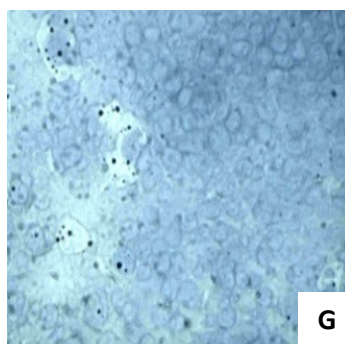
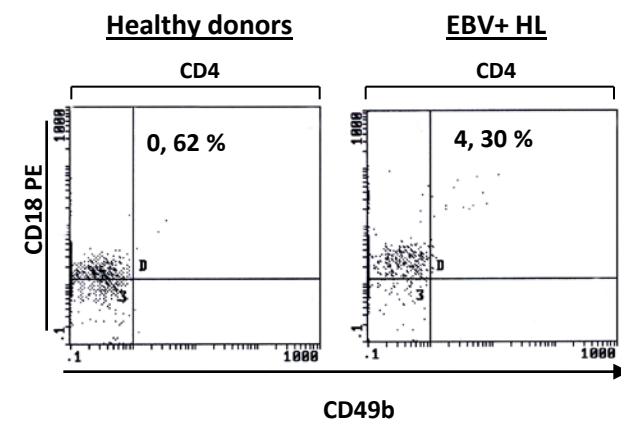


Figure 3

A**Non-Tumoral****EBV- HL****EBV+ HL****CD4****CD49b****CD18****B****Figure 4**

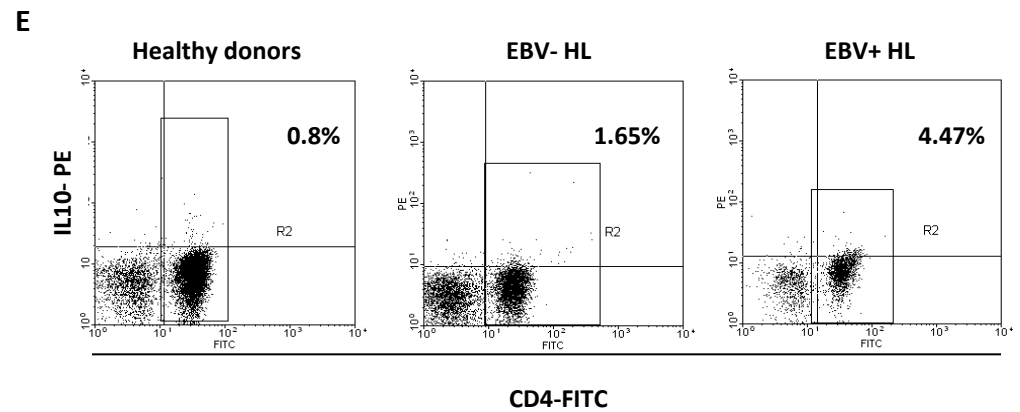
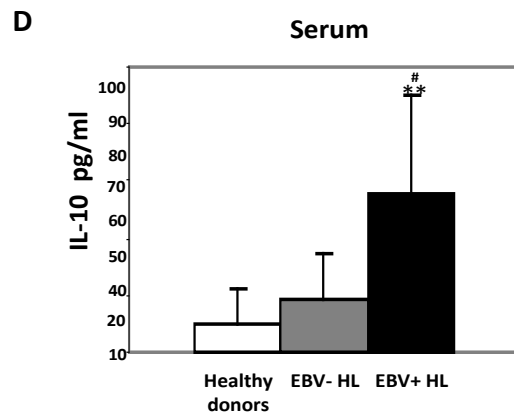
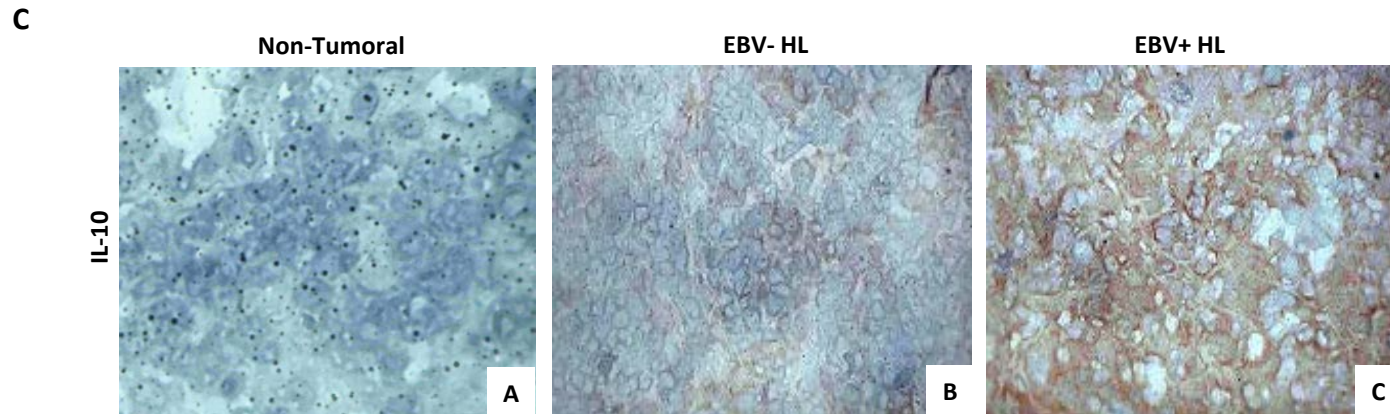
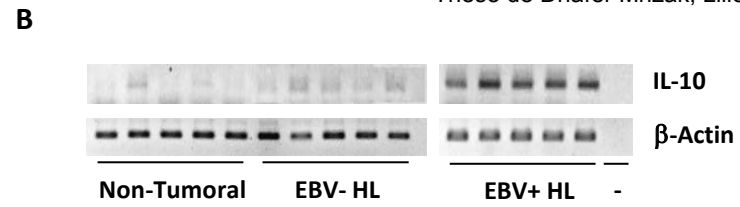
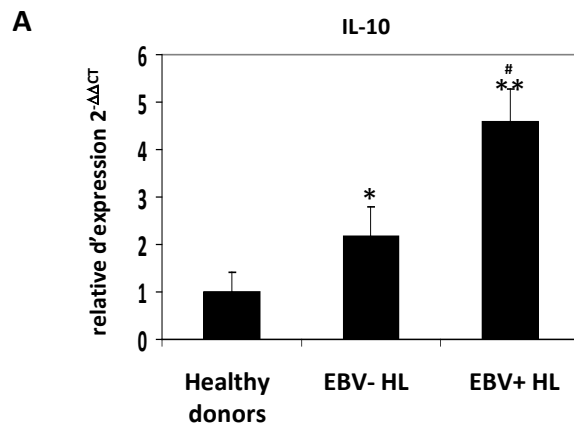
**Figure 5**

Table I: Control patient characteristics

Patient	Sex	Age (years)	EBV status	Observations
FH1	F	30	EBV positive	Non specific chronic lymphadenitis
FH2	M	57	Udt	Non specific chronic lymphadenitis
FH3	M	31	Udt	Follicular Hyperplasia
FH4	F	73	Udt	Non specific chronic lymphadenitis associated to granulomatous infiltrate
FH5	F	18	EBV negative	Non specific follicular lymphadenitis
FH6	M	11	EBV negative	Follicular Hyperplasia
FH7	M	46	Udt	Non specific follicular lymphadenitis
FH8	M	77	Udt	Dermatosis associated lymphadenitis
FH9	M	71	Udt	Chronic Lymphadenitis
FH10	M	24	EBV negative	Chronic Lymphadenitis with Follicular Hyperplasia
FH11	M	53	Udt	Chronic Lymphadenitis
FH12	M	15	EBV negative	Dermatosis associated chronic lymphadenitis
FH13	F	24	Udt	Dermatosis associated lymphadenitis
FH14	M	33	Udt	Follicular Hyperplasia
FH15	F	42	Udt	Chronic Lymphadenitis
FH16	F	8	EBV negative	Follicular Hyperplasia
FH17	F	43	EBV negative	Chronic Lymphadenitis with Immunoblastic Hyperplasia
FH18	F	22	Udt	Chronic Lymphadenitis
FH19	M	71	Udt	
FH20	H	31	EBV negative	Chronic Lymphadenitis
FH21	M	8	Udt	Follicular Hyperplasia
FH22	M	51	Udt	Chronic Lymphadenitis
FH23	F	51	EBV negative	Non specific chronic lymphadenitis with moderate Polyclonal Plasmacytosis
FH24	F	17	EBV negative	Follicular Hyperplasia
FH25	M	49	Udt	Non specific follicular lymphadenitis
FH26	M	49	Udt	Non specific follicular lymphadenitis
FH27	M	3	EBV negative	Non specific follicular lymphadenitis
FH28	M	49	Udt	Follicular Hyperplasia
FH29	M	56	Udt	Chronic Lymphadenitis
FH30	M	5	EBV negative	Follicular Hyperplasia
FH31	M	68	Udt	Follicular Lymphadenitis with Polytypical Plasmacytosis

Table II: Characteristics of EBV-negative HL patients

Thèse de Dhafer Mrizak, Lille 1, 2013

Patient	Sex	Age (years)	EBV status	Observations
HLEBV- 1	M	16	EBV negative (LMP1-)	Grade II Scleronudular HL (Bennett)
HLEBV- 2	F	56	EBV negative (LMP1-)	HL
HLEBV- 3	M	29	EBV negative (LMP1-)	Grade II Scleronudular HL (Bennett)
HLEBV- 4	M	22	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 5	M	42	EBV negative (LMP1-)	Grade II Scleronudular HL (Bennett)
HLEBV- 6	F	17	EBV negative (LMP1-)	Grade I Mixte Cellularity Scleronudular HL
HLEBV- 7	M	49	EBV negative (LMP1-, EBER-)	Grade II Cell Rich Scleronudular HL
HLEBV- 8	F	21	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 9	M	25	EBV negative (LMP1-)	Grade II Scleronudular HL (Bennett)
HLEBV- 10	F	46	EBV negative (LMP1-)	Grade II Scleronudular HL (Bennett)
HLEBV- 11	F	35	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 12	F	43	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 13	F	22	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 14	F	22	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 15	M	31	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 16	M	22	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 17	F	28	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 18	F	29	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 19	F	31	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 20	F	32	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 21	F	17	EBV negative (LMP1-)	Grade II Scleronudular HL (Bennett)
HLEBV- 22	M	8	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 23	M	21	EBV negative (LMP1-)	Grade II Scleronudular HL (Bennett)
HLEBV- 24	F	17	EBV negative (LMP1-)	Grade II Scleronudular HL (Bennett)
HLEBV- 25	M	71	EBV negative (LMP1-)	Grade II Scleronudular HL (Bennett)
HLEBV- 26	M	46	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 27	F	21	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 28	M	39	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 29	F	49	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 30	M	14	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 31	F	12	EBV negative (LMP1-)	Grade II Scleronudular HL (Bennett)
HLEBV- 32	F	43	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 33	M	42	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 34	M	30	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 35	M	34	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 36	F	17	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 37	F	28	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL
HLEBV- 38	M	21	EBV negative (LMP1-)	Grade I Scleronudular HL

Table III: Characteristics of EBV-positive HL patients

Patient	Sex	Age (years)	EBV status	Observations
EBV+ HL 1	F	63	EBV positive (LMP1+)	Mixte Cellularity Type III HL (Lukes Rye)
EBV+ HL 2	M	32	EBV positive (LMP1+)	Grade II Scleronodular HL(Benett), Type II (Lukes Rye)
EBV+ HL 3	M	60	EBV positive (LMP1+)	Lymphocyte Rich HL
EBV+ HL 4	M	46	EBV positive (LMP1+)	HL
EBV+ HL 5	M	25	EBV positive (LMP1+)	Grade I Scleronudular HL (Bennett), Type II (Lukes Rye)
EBV+ HL 6	F	35	EBV positive (LMP1+)	Reccurent HL
EBV+ HL 7	M	36	EBV positive (LMP1+)	Rich Cellularity HL
EBV+ HL 8	M	45	EBV positive (LMP1+)	Grade I Scleronudular HL (Bennett), Type II (Lukes Rye)
EBV+ HL 9	M	25	EBV positive (LMP1+)	Grade I Scleronudular HL (Bennett)
EBV+ HL 10	F	15	EBV positive (LMP1+)	Grade I Scleronudular HL (Bennett), Type II (Lukes Rye)
EBV+ HL 11	F	35	EBV positive (LMP1+)	Grade I Scleronudular HL
EBV+ HL 12	F	21	EBV positive (LMP1+)	Grade I Scleronudular HL (Bennett), Type II (Lukes Rye)
EBV+ HL 13	M	78	EBV positive (LMP1+)	Grade I Scleronudular HL
EBV+ HL 14	M	28	EBV positive (LMP1+, EBER+)	Grade I Scleronudular HL
EBV+ HL 15	F	32	EBV positive (LMP1+)	Lymphocytes Rich Classical HL
EBV+ HL 16	F	22	EBV positive (LMP1+)	Scleronodular HL
EBV+ HL 17	M	42	EBV positive (LMP1+)	Grade I Scleronudular HL
EBV+ HL 18	M	31	EBV positive (LMP1+)	Grade I Scleronudular HL
EBV+ HL 19	F	26	EBV positive (LMP1+)	Grade I Scleronudular HL
EBV+ HL 20	F	80	EBV positive (LMP1+)	Mixte Cellularity Classical HL
EBV+ HL 21	M	35	EBV positive (LMP1+)	Reccurent Classical HL
EBV+ HL 22	M	25	EBV positive (LMP1+)	Grade I Scleronodular HL

Table IV: Primer sequences

Gene Name	Primer Sequences	Hybridation T° (C)
CD4	5'-GGGAAATCAGGGCTCCTTCTTA	59
	5'-TGGTCCCAAAGGCTTCTTCTT	
CD25	5'-GGGACTGCTCACGTTTCATCA	59
	5'-TTCAACATGGTTCTTCCTTGTA	
GITR	5'-TGTGTCCAGCCTGAATTCCA	59
	5'-CCGAGGCACAGTCGATACACT	
CTLA4	5'-TTCTTCTCTTCATCCCTGTCTTCT	61
	5'-GAGATGCATACTCACACAAAAGCT	
FoxP3	5'-TCACCTACGCCACGGTCA	59
	5'-CACAAAGCACTTGTGCAG	
P selectin	5'-CTGGAACCCCTGAGTCTACCAC	63
	5'-GTCTGTATCTCCATAGCTGCTGAATC	
ICAM1	5'CCCTGATGGGCAGTCAACA	60
	5'-GCAGCGTAGGGTAAGGTTCTTG	
LAG3	5'-TGGCTTCAACGTCTCCATCA	59
	5'-CCCACCCTGGAACCTGCT	
T1/ST2	5'-GTGTTTGCCTCAGGCCAACT	59
	5'-TGACATTGCGATATCCAGTCCTA	
IL-10	5'-GCCTAACATGCTTCGAGATC	59
	5'-TGATGTCTGGGTCTTCGTTT	
IL-10 Rα	5'-CCGAGAGTATGAGATTGCCATT	60
	5'-CAGATGGTTTCACCTGGACACA	
IL-10 Rβ	5'-TGGGAGTCACCTGCTTTTGC	59
	5'-TCCGTCAAGGTAGTATTCATGCA	
TGF-β	5'-CGAGCCTGAGGCCGACTAC	62
	5'-CGGAGCTCTGATGTGTTGAAGA	
TGFβ-R2	5'-GCTGCTTCTCCAAAGTCATT	58
	5'-AACAAGTCAGGATTGCTGGTGTT	
IL-5	5'-CCACAAGTGCATTGGTGAAAGA	58
	5'-TGTACAGGAACAGGAATCCTCAGA	

Gene Name	Primer Sequences	Hybridation T° (C)
IFNγ	5'-ATGTAGCGGATAATGGAAGTC	54
	5'-GACATTCAAGTCAGTTACC	
IL-4	5'- CACAAGCAGCTGATCCGATTTC	59
	5'-TTCCAAGAAGTTTTCCAACGTACTC	
IL-2	5'-ACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTTAC	61
	5'-TCCAGAGGTTTGAGTTCTTCTCTAGA	
CCL-17	5'-GGGCTTCTCTGCAGCACATC	62
	5'-GGTACCACGTCTTCAGCTTTCTAAG	
CCL-22	5'-TTGCTGTGGCGCTTCAAG	59
	5'-CAGACGGTAACGGACGTAATCAC	
CCR-4	5'-CCACCCTCGATGAAAGCATATAC	59
	5'-TGCCCTTGATGCCTTCTTTGG	
CCL-3	5'-ATGGCTCTCTGCAACCAGTTCT	61
	5'-CGTCTCAAAGTAGTCAGTATGAAATTC	
CCL-4	5'-GACTGTCCTGTCCTCCCTCATGCTA	62
	5'-AAGCTTCCTCGCGGTGAAGA	
CCL-5	5'-CTCTGCGCTCCTGCATCTG	59
	5'-CAGTGGGCGGGCAATG	
CCR-5	5'-GTCAAGTCCAATCTATGACATCAATTATT	57
	5'-CGGGCTGCGATTGCTT	
CCR-7	5'-GAGACAACACCACAGTGGACTACAC	62
	5'-GTCAACACGACCAGCCCATT	
β-Actin	5'-TGCTATCCAGGCTGTGCTA	58
	5'-ATGGAGTTGAAGGTAGTTT	
GAPDH	5'-GCCAAGTCATCCATGACAACTTTGG	58
	5'-GCCTGCTTCACCACCTTCTTGATGTC	
HPRT	5'-CCCTGGCGTCGTGATTAG	57
	5'-ATGGCCTCCCATCTCCTT	
Ubiquitin	5'-CCGACCACAGTGGCTATG	60
	5'-CCTCTTTTAAATATCTCAGGCTTGA	

Table V: Main cell populations fractions within PBMC of non-tumoral and HL patients

	Healthy Donors (n = 9)	EBV- HL (n = 6)	EBV+ HL (n = 4)
IL-10+	0.82% (+/- 0.64)	1.69% (+/- 0.29)	3.76% (+/- 1.25)
CD4+/IL-10+	0.9% (+/- 0.6)	1.53% (+/- 1.23)	4.31 % (+/- 0.85)
CD4+/CD49b+/CD18+	0.69% (+/- 0.85)	2.21 %(+/- 0.31)	4.34% (+/- 0.2)

Table VI: Intranodal expression of IL-10 marker (immunohistochemical evaluation)

	Non-Tumoral patients	EBV-negative HL patients	EBV-positive HL patients
IL-10 ^a	0	48 ± 0.2	108.6 ± 3.5

^a Mean of positive cell counts in nodes of the three group of patients studied

Article 5

ARTICLE 5

Effets des changements dans les habitudes du tabagisme sur l'incidence du cancer de la vessie en Tunisie

Effects of change in smoking habits on bladder cancer incidence in Tunisia
Health, Vol.3, No.10, 613-619 (2011) doi:10.4236/health.2011.310103

Dhafer Mrizak, Fatma B'chir, Mehdi Jaidane, Maurice Jean Arnaud, Saâd Saguem.

Contexte et objectif de l'étude :

Le cancer de la vessie est parmi les cancers les plus fréquemment diagnostiqués dans les cas de tabagisme prolongé. L'exposition à la fumée du tabac, impliquant une exposition aux nitrosamines et aux amines aromatiques, est la cause majeure du cancer de la vessie. Bien que la consommation de cigarettes ait progressivement diminué au cours des deux dernières décennies, une augmentation de l'incidence du cancer de la vessie était enregistrée chez les hommes Tunisiens. Une augmentation similaire dans l'incidence de l'adénocarcinome pulmonaire et du cancer de la vessie était enregistrée chez les hommes Tunisiens.

Dans cette étude, nous avons exploré la relation la relation entre l'activité de l'enzyme CYP1A2, enzyme majeure pour l'activation des cancérigènes de la vessie, et le risque du cancer de la vessie.

Méthodes :

Les données épidémiologiques ont été obtenues en s'appuyant sur les registres hospitaliers du CHU central de Sousse (Tunisie) sur une période s'étalant entre 1987 et 2005. L'activité de la CYP1A2 a été évaluée par un test d'ingestion de la caféine chez 28 sujets au total. Cette activité a été estimée *in vivo* en utilisant la caféine comme sonde et la méthode HPLC en phase inverse a été développée pour mesurer les concentrations plasmatiques de caféine et de paraxanthine afin de déterminer l'activité du CYP1A2 à partir du rapport paraxanthine/caféine. 14 patients atteints de cancer de la vessie et 14 sujets sains ont été recrutés pour cette étude. Tous les participants à l'étude sont des fumeurs. Afin de réaliser cette étude, tous les sujets se sont abstenus de boire des boissons contenant de la caféine pendant plus de 24 heures avant l'étude.

Principaux résultats:

Les résultats épidémiologiques suggèrent que des changements dans les habitudes tabagiques et l'introduction de la cigarette à filtre pourraient être la cause de l'augmentation de l'incidence du cancer de la vessie. Les variations dans l'activité de CYP1A2 mesurées chez des patients fumeurs ayant un cancer de la vessie et des fumeurs sains ont montré une activité métabolique de CYP1A2 significativement plus élevée chez le groupe de patients avec cancer.

Conclusion :

Il semble que la cigarette avec filtre n'est pas moins dangereuse que la cigarette ordinaire. Le nouveau comportement de tabagisme est impliqué dans l'augmentation de l'incidence de nombreuses formes de cancers agressifs tels que l'adénome pulmonaire et le cancer de la vessie. Le changement dans les manières de fumer les cigarettes associé à la variation de l'activité de CYP1A2 pourrait expliquer en partie l'incidence en augmentation observée chez la population masculine Tunisienne.

Effects of change in smoking habits on bladder cancer incidence in Tunisia

Dhafer Mrizak¹, Fatma B'chir^{1,2}, Mehdi Jaidane³, Maurice Jean Arnaud⁴, Saâd Saguem^{1*}

¹Metabolic Biophysics and Applied Pharmacology Laboratory, Department of Biophysics, Medicine Faculty of Sousse, Sousse, Tunisia; *Corresponding Author: bchirfatma@hotmail.fr

²Laboratory of Natural Substances, National Institute of Research and Physical Chemical Analysis, Technopole Sidi Thabet, Tunisia;

³Urology Department of Central Hospital University (CHU), Sahloul-Sousse, Tunisia;

⁴Nutrition & Biochemistry, Bourg Dessous 2A, La Tour de Peilz, Switzerland.

Received 22 January 2011; revised 19 February 2011; accepted 28, February 2011.

ABSTRACT

Bladder cancer is among the most frequently diagnosed cancer. Tobacco smoking exposures involving nitrosamines and aromatic amines are the main cause of bladder cancer. Although cigarette consumption has gradually decreased, an increased incidence of bladder cancer was registered among males Tunisian for the last two decades. A similar increased incidence of lung adenocarcinoma and bladder cancer was registered among Tunisian males. Epidemiological results suggest that changes in cigarette smoking may be the cause of the increased incidence of bladder cancer. The relationship between CYP1A2 enzyme activities, a key enzyme for activation of bladder carcinogens, and bladder cancer risk was investigated. Variations in CYP1A2 activities measured in patients with bladder cancer and healthy smokers showed a significantly higher CYP1A2 metabolic activity in patient group. Changing in cigarette smoking habits associated to the variation in CYP1A2 activity seem to explain partly the increase incidence of bladder cancer observed in Tunisian male population.

Keywords: Cigarette Filter; Smoking; Bladder Cancer; CYP1A2 Activity

1. INTRODUCTION

Bladder cancer is the most frequent urogenital cancer in Tunisia and rank at the second position in the world [1], among male populations.

Epidemiologic and biological studies have clearly established that cigarette smoking is the main cause of bladder cancer [2,3] and it was suggested that more than 60% of all bladder cancer cases may be attributed to

tobacco smoking [4,5].

Although stabilization and even decrease frequencies of major cancers types which are associated to smoking such as lung cancer and oral cavity cancer, a dramatic increase in the incidence of bladder cancer was registered in Tunisian Cancer Centers for the last two decades. This increasing prevalence has been also reported worldwide [6,7] and may be the result of changes in smoking behavior in particular when the cigarette with filter had replaced those with no filter.

The concentrations of specific carcinogens such as tobacco-specific nitrosamines (TSNs) and Aromatic Amines (AA) have been increased in filtered cigarette smoke [8].

It has been suggested that the consumption of those cigarettes with filters may contribute to increase bladder exposure to tobacco carcinogens thus leading to a higher risk of cancer development [8-10].

The aim of this study was to evaluate from epidemiological and biological data whether the introduction of cigarette with filter could explain the remarkable increase of bladder cancer incidence observed in Tunisian population.

2. MATERIALS & METHODS

2.1. Epidemiological Study

Data of epidemiological study were obtained from CHU Central Tunisian hospital registers (Department of Anatomy Pathology of CHU Farhat Hached of Sousse, Tunisia) for the 1987-2005 time period and the evolution of bladder cancer incidence in Tunisian males was evaluated.

2.2. Biological Study

This study was carried out at the Faculty of Medicine of Sousse by the Biophysics laboratory where the assessment of CYP1A2 enzyme activity was measured by

caffeine test among bladder cancer and healthy smoker's subjects.

CYP1A2 activity was estimated *in vivo* using caffeine as a probe drug and reversed-phase HPLC method was developed to measure plasma caffeine and paraxanthine concentrations to determine the CYP1A2 activity from the ratio paraxanthine/caffeine.

2.3. Subjects

14 patients with bladder cancer and 14 healthy subjects were recruited for this study.

All subjects are current smokers. They gave their informed consent and the study protocol was approved by the local Ethical Committee.

All subject abstained to drink any beverages containing caffeine for more than 24 hours before and during the study.

2.4. Methods

The subjects were asked to fill a questionnaire where the total consumption of coffee and other caffeine-containing beverages as well as the number daily cigarettes smoked and the period of smoking were recorded (**Table 1**).

The subjects were coming at the hospital in the morning at 8 am and ingested 140 mg of caffeine dissolved in 150 ml warm water. A single 5 ml blood sample was collected directly in EDTA tube four hours after caffeine ingestion.

Blood samples were immediately centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes and plasma samples collected were stored at -20°C until analyzed.

2.5. HPLC Plasma Analysis and Caffeine Concentrations

To 0.5 ml defrost plasma was added 300 mg of ammonium sulfate and after 1 minute vigorous shaking (Vortex), 3 ml of ethyl acetate and isopropyl alcohol (8/2, v/v) were added. After shaking for 2 minutes, the samples were centrifuged at 4000 rpm for 25 minutes and 2.5 ml of the organic phases were collected, dried at 56°C under a flow of nitrogen gas and the residue obtained was dissolved in 100 μl KH_2PO_4 buffer solution.

Table 1. Averages daily cigarettes smoked and smoking period in bladder cancer patients and healthy controls.

Groups	Bladder cancer patients	Healthy control
Daily cigarettes smoked	25	20
Smoking period (years)	43.5*	26.78

*P < 0.05

HPLC (Agilent 1200) separation was performed using two reversed phase columns in series (Hypersil ODS 4×250 mm, $5 \mu\text{m}$) and (Eclipse XDB-C18 4.6×150 mm, $5 \mu\text{m}$) maintained at 33°C with a direct injection of 5 μl of the extract. An U.V diode array was used for the analytic detection. Elution was performed by gradient mode using two mobiles phases A and B. Phase A solution was composed of water, tetrahydrofurane (THF), acetic acid and acetonitrile (986/3/1/10 v/v respectively). The phase B solution was acetonitrile. The gradient program was chosen as follows: B was set at 0% for the 20 first minutes, increased linearly to 4% at 35minutes, reached to 8% from 45 to 50 minutes and return to 0% at 55 minutes.

Plasma caffeine and the concentrations of its metabolites were calculated by CHEMSTATION software using calibrations curves already established.

2.6. Measurement of Caffeine Metabolic Ratio

Caffeine is mainly metabolized by the hepatic CYP1A2 enzyme and is currently used as a probe for the measurement of CYP1A2 activity. In the metabolism of caffeine, the first demethylation steps gave paraxanthine (PX, 17X), theobromine (TB, 37X) and theophylline (TP, 13X). About 80% of the metabolism of caffeine is going through the paraxanthine pathway mediated by CYP1A2 [11].

The measurement of the concentration ratio PX to caffeine (PX/CA) was used as a metabolic marker to evaluate the CYP1A2 activity.

2.7. Statistical Analysis

Mann-Whitney U test was used to examine differences in distributions of smoking period and caffeine metabolic ratio between cases and controls.

3. RESULTS

3.1. Epidemiological Study

3.1.1. Evolution of the Incidence of Tobacco Related Cancers in Tunisia

This study recorded the most frequent cancer associated to tobacco use in the Tunisian male population: larynx, oral cavity, bladder and lung.

The frequencies of these four cancers obtained from CHU Cancer register of Sousse are calculated for two periods 1987-1990 (PI) and 2002-2005 (PII). In **Figure 1** is shown the evolution of the incidence curves of lung, bladder, oral cavity and larynx cancers for the time period 1987-2005.

Although stabilization and even a small decline in the

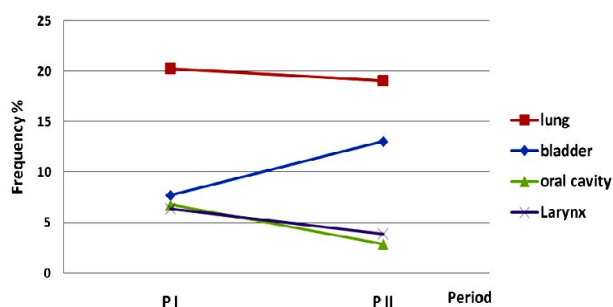


Figure 1. Incidence evolution of four tobacco-related cancers in Tunisia between the time periods PI (1987-1990) and PII (2002-2005).

incidence was observed for lung, larynx and oral cavity cancers, an increase of the incidence of bladder cancer was observed for the 2002-2005 period when compared to the 1987-1990 period. Bladder cancer frequencies exhibited increase from 7.69% in 1990 to 13.03% in 2005 and thus double in 15 years.

3.1.2. Evolution of Lung Cancer and Its Histological Forms Incidence in Tunisian Population

According to our previous study [12], the distribution of lung cancer incidence compared to its major histological types the adenocarcinoma (AD) and the squamous cell carcinoma (SCC) was not similar for the last two decades in Tunisian population.

As shown in **Figure 2** a slow decline in the incidence for both total lung cancer and SCC was observed from 1990 up to 2005 period, while a continuous increase was registered for AD incidence.

3.1.3. Comparative Analysis of the Bladder Cancer and AD Frequencies Evolution

In **Figure 3** is shown the evolution of the incidence of AD and bladder cancer for the 1987-2005 period. The evolution of both frequencies of bladder cancer and AD were similar during the same period of time. Bladder cancer and AD have gradually and simultaneous increased for these last two decades in Tunisian males.

3.2. Biological Study

3.2.1. Separation of Caffeine and Its Metabolites

The **Figure 4** illustrates the chromatographic profiles of caffeine and its metabolites measured at 280nm in plasmatic sample of one patient and one healthy subject. The chromatogram shows a complete separation of caffeine and its metabolites, in particular for TP, TB and PX. This good separation allows an accurate quantification of caffeine metabolites concentrations and consequently

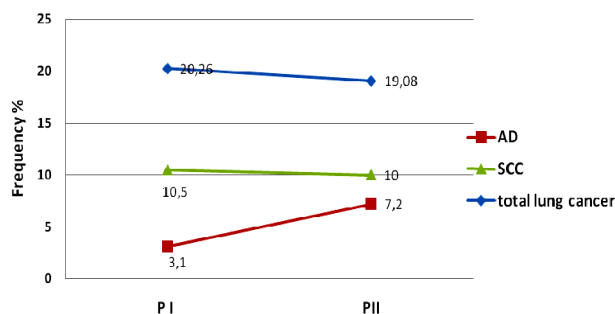


Figure 2. Incidence evolution of AD, SCC and lung cancer in Tunisia between the time periods PI (1987-1990) and PII (2002-2005).

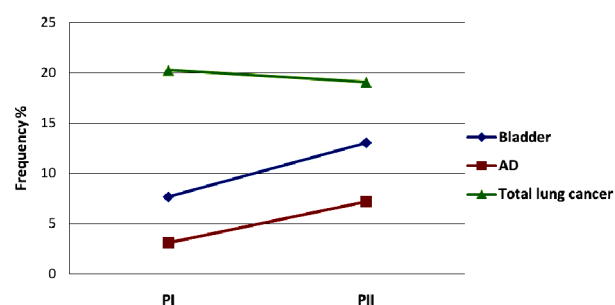
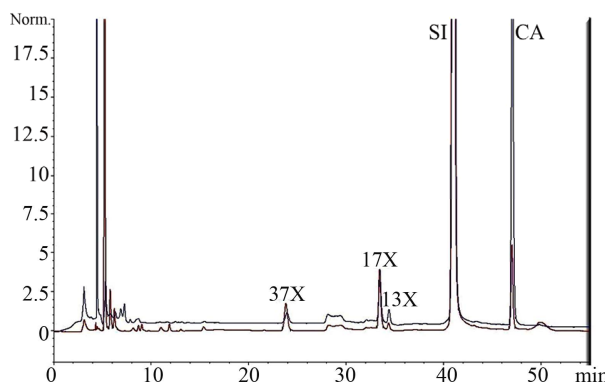


Figure 3. Evolution profile of AD and bladder cancer for the 1987-2005 period.



37X: 3,7 dimethylxanthine (**theobromine**); 17X: 1,7-dimethylxanthine (**paraxanthine**); 13X: 1,3-dimethylxanthine (**theophylline**), SI: Internal Standard; CA: 1,3,7-trimethylxanthine (**caffeine**).

Figure 4. Chromatograms of plasma samples of caffeine and its metabolites among one patient (blue) and one control subject (red).

the determination of the PX/CA metabolic ratios. The chromatographic profiles of plasma show that there was no interference with endogenous compounds.

3.2.2. CYP1A2 Activity Evaluation

Variations in PX/CA ratio were observed in **Figure 5** between patients and healthy subjects. These variations suggest wide interindividual differences in CYP1A2 activities. The average PX/CA ratio was 0.42 for the bladder

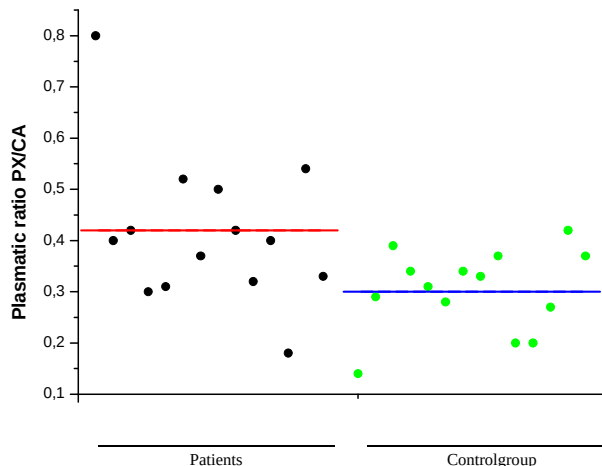


Figure 5. Distribution of PX/CA plasmatic ratio values among patients and control group.

cancer group and 0.3 for healthy group of subjects. The CYP1A2 activity was thus significant higher in the bladder cancer patient group compared to healthy group ($P < 0.05$).

4. DISCUSSION

In the present study, biological and epidemiological investigations show that the rapid increase in the incidence of bladder cancer observed for the last two decades in Tunisian population may be related to the change in smoking behavior when the cigarettes with filter had substituted progressively those with no filter.

More than 50 years ago, tobacco use was suggested as a major etiologic risk factor for bladder cancer [8,13] and 60% was attributed to cigarette smoking [4]. Many case-control studies reported that smokers have at least a two-fold higher risk of developing bladder cancer compared to non smokers [8,14]. Bladder cancer is estimated as the second cancer localization attributed to smoking after the lung [15].

The epidemiological results of this study show an opposite evolution of bladder and total lung cancer frequencies for the time period 1987-2005. Despite the stability of lung cancer incidence in Tunisian males for the 1987-2005 period (**Figure 3**), a two-fold increased bladder cancer frequency was registered from 7.69% in 1990 to 13.06% in 2005. This dramatic increase of bladder cancer incidence registered in Tunisia was also reported all over the world during the same time period. Cancer registers show a larger increase in Denmark, in USA and in France among men and a somewhat smaller increase among women [16,17]. This incidence is still increasing overtime. It has been suggested that heavy cigarette smoking plays a major role in increasing bladder cancer incidence [18]. This conclusion was also con-

firmed in our work. Patients with bladder cancer are heavier smokers than subjects in the control group (**Table 1**).

How can be explained the apparent disagreement between the increase incidence of bladder cancer and the decline of the lung cancer frequency with a change in smoking behavior. We suggested that the changes in smoking behavior associated to the increased use of cigarettes with filter may explain the changes observed [12]. In this study was reported a stabilization of the total incidence of lung cancer while a continuous and significant increase of AD over SCC forms was observed among Tunisian population for the time-period 1987-2005.

Figure 6 shows that the 10.5% incidence of SCC is unchanged while that of AD exhibits an increase from 3.1% in 1990 to 7.2% in 2005. This increase of AD was related to the introduction of cigarette with filter [12]. This new smoking habit appeared to be more carcinogenic through the increasing incidence of AD, the most aggressive and metastasis cell types of lung carcinoma [19]. The smoker of cigarette with filter is more exposed to tobacco nitrosamines (TSNs) in particular the 4-methylnitrosamino-1-3-pyridyl-1-butanone (NNK); a potent carcinogen which induce lung tumors in the peripheral lung regions, the areas where the AD occurs [12,20].

The significant increase of bladder cancer observed during the 1987-2005 time-period parallels the evolution of AD incidence in Tunisian population suggesting that both pathologies may have the same origin. The most prominent change in smoking habit reported during this period was the increased use of cigarettes with filter. Filter cigarette deliver at least 60% less nicotine and tar than plain cigarette [5,8]. While this change leads to a lower exposure of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), the concentrations of aromatic amine increased by 59% from 1968 to 1985 [8] and between 1978 and 1995, the concentrations of tobacco-specific nitrosamines in filtered cigarettes increased 17% for N'-nitroso-nornicotine and 44% for 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone [8,21]. Some N-nitroso-compounds such NNK have been suggested to be involved as causative agents in human lung carcinogenesis leading to the AD type [20,22].

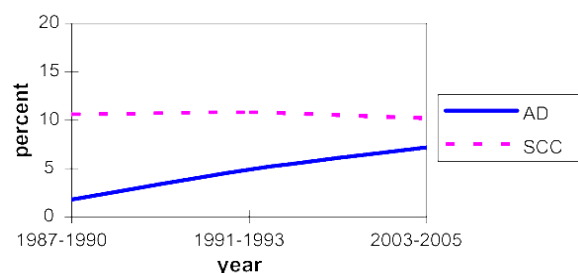


Figure 6. Trends of the evolution of AD and SCC in Tunisia.

Moreover, the smoker's dependence on nicotine may lead to smoking more cigarettes with filter because they contain lower amounts of nicotine. To achieve the desired physiological response to nicotine, smokers of low-tar filter cigarettes tend to adapt their smoking patterns by taking larger puffs, increasing puff frequency and inhaling more deeply. Such changing smoking patterns showed that although the smoker-weighted carbon monoxide-yield of ventilated filter cigarettes was 21% less than that of plain cigarettes, blood carboxyhemoglobin level in ventilated filter cigarettes was 7% higher than those found in men who smoked plain cigarettes [23]. These data are consistent with the conclusion that smokers who are addicted to low-nicotine cigarettes may take more intense smoking and deeper inhalation of the smoke leading to a higher amount of carcinogenic tar particles, in the bronchi and bladder of the smoker [24].

Although the increasing incidences of AD and bladder cancer may have the same origin with the use of cigarette filter, they have different carcinogenic inducers. PAHs such as benzo(a) pyrene (BaP) and TSNs like NNK are the most known tobacco smoke potent carcinogens as shown on animal model [25,26]. PAHs and NNK cause mainly lung cancers, PAHs induce the SCC tumours occurring in bronchi and bronchioles of the lungs and NNK induce AD predominately in the deeper region of the lung. In animals exposed to the mainstream cigarettes smoke develop bladder cancer while animals treated with BaP or NNK develop cancers on other localizations than the bladder [27]. Thus, the induction of bladder tumours by tobacco substances inhaled is not dependent upon PAHs and TSNs, but may dependent on other tobacco chemicals [18,28]. It was reported that aromatic amines are potent bladder carcinogens [29]. Bladder tumours induced in animals with tobacco aromatic amines carcinogens [30] showed that these compounds do not elicit directly bladder tumours but the effects were due to some of their metabolites. Among these tobacco amines carcinogens, 2-naphthylamine and 4-aminobiphenyl were found to be the most potent bladder carcinogens in man [31]. The most direct-acting carcinogens that are reactive electrophilic agents are produced through *in vivo* activation involving an initial oxidation catalyzed primarily by hepatic cytochromes P450 [31], the first critical step in this bio activation [32, 33]. 2-Naphthylamine and the 4-aminobiphenyl are metabolized mainly in liver to N-hydroxy-4-naphthylamine (N-OH-naphthylamine) and N-OH-aminobiphenyl respectively. These reactive metabolites produce human epithelium DNA adducts in liver and bladder. The enzyme primarily responsible for the N-hydroxylation of 2-naphthylamine and the 4-aminobiphenyl, the initial step for carcinogenic process, is the CYP1A2 [31]. This key

enzyme in the activation of bladder cancer carcinogens exhibits wide variations in activity explaining individual susceptibility to chemical carcinogenesis and thus to bladder cancer development.

In smokers, the results of this study show a significant higher CYP1A2 activity in patients with bladder cancer when compared with healthy subjects. High CYP1A2 activity is therefore suggested as a susceptibility factor of bladder cancer. The polymorphic CYP1A2 activity may be related to environment and genetic factors. Exposure to tobacco smoke is known as a potent inducer of CYP1A2 activity [34,35] but there are other occupational and dietary inducers. Variation in CYP1A2 activity was also related to polymorphisms in the CYP1A2 genes and consequently the effect of cigarette filter on the risk of bladder cancer development is dependent on this polymorphism. Further investigations on the role of CYP1A2 polymorphisms on the risk of bladder cancer performed on larger population of smokers are needed.

5. CONCLUSIONS

This epidemiological study suggests that the increased incidence of bladder cancer may be attributed to change in smoking habit associated to the substitution of plain cigarette to cigarette with filter while the effect of smoking duration cannot be excluded. As bladder carcinogens, such as aromatic amines, are mainly metabolised by CYP1A2 enzyme, a significantly higher CYP1A2 activity observed in bladder cancers patients when compared to control subjects suggests that high CYP1A2 activity could be a susceptible factor for bladder cancer in smokers. Changing in cigarette smoking habit associated to higher enzyme activity may be considered as a potential biomarker in the aetiology of bladder cancer and must be confirmed on a larger study.

Although filter is effective in reducing the amounts of PAHs and nicotine, it is less effective to retain volatile carcinogenic compounds such as TSNs and aromatic amines so that smokers are more exposed to these potent carcinogens. The users of cigarette with filter increase the smoking frequency and inhales more deeply, retaining smoke longer. This lead as a consequence to a higher deposition of carcinogens smokes in all vascular body regions. These carcinogens undergo biotransformation to give active carcinogens which are able to form ADN adducts initiating the first steps of cancer process. Increased use of cigarette with filter associated to the polymorphic CYP1A2 enzyme activity could therefore be a main cause in the bladder cancer increase.

It appears that cigarette with filter is not less dangerous than the plain cigarette as expected. The new smoking behaviour is involved in the increase incidence of

many aggressive cancer forms such as AD of the lung and bladder cancer. In addition, the introduction of cigarette with filter lead to an increase over time in the number of cancers localization attributed to smoking [15, 36].

Finally, cigarette with filter and more generally smoking is today a major public health problem and smoking cessation remains the primary preventive way for tobacco related-cancers and pathologies.

REFERENCES

- [1] Parkin, D.M., Pisani, P. and Ferlay, J. (1994) At least one of seven cases of cancer is caused by smoking. Global estimate for 1985. *International Journal of Cancer*, **59**, 494-504. [doi:10.1002/ijc.2910590411](https://doi.org/10.1002/ijc.2910590411)
- [2] Pelluchi, C., Bosetti, C., Negri, E., Malvezzi, M. and La Vecchia, C. (2006) Mechanisms of disease: The epidemiology of bladder cancer. *Nature Clinical Practice Urology*, **3**, 327-340. [doi:10.1038/ncpuro0510](https://doi.org/10.1038/ncpuro0510)
- [3] Baris, D. *et al.* (2009) A case-control study of smoking and bladder cancer risk: Emergent patterns over time. *Journal of the National Cancer Institute*, **101**, 1553-1561. [doi:10.1093/jnci/djp361](https://doi.org/10.1093/jnci/djp361)
- [4] Boffetta, P. (2008) Tobacco smoking and risk of bladder cancer. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, **42**, 45-54. [doi:10.1080/03008880802283664](https://doi.org/10.1080/03008880802283664)
- [5] Samanic, C., Kogevinas, M., Dosemeci, M., Malats, N., Real, F.X., Garcia-Closas, M., Serra, C., Carrato, A., Garcia-Closas, R., Sala, M., Lloreta, J., Tardon, A., Rothman, N. and Silverman, D.T. (2006) Smoking and Bladder Cancer in Spain: Effects of Tobacco Type, Timing, Environmental Tobacco Smoke, and Gender. *Cancer Epidemiology Markers*, **15**, 1345-1354.
- [6] Van Hemelrijck M. J. J., Michaud, D.S., Connolly, G.N. and Kabir, Z. (2009) Tobacco use and bladder cancer patterns in three western European countries. *Journal of Public Health*, **31**, 335-344. [doi:10.1093/pubmed/fdp062](https://doi.org/10.1093/pubmed/fdp062)
- [7] Raman, J.D., Messer, J., Sielatycki, J.A. and Hollenbeck, C.S. (2010) Incidence and survival of patients with carcinoma of the ureter and renal pelvis in the USA, *British Journal of Urology International*, **107**, 1059-1064.
- [8] Alberg, A.J. and Hebert, J.R. (2009) Cigarette Smoking and Bladder Cancer: A New Twist in an Old Saga? *Journal of the National Cancer Institute*, **101**, 1525-1526. [doi:10.1093/jnci/djp385](https://doi.org/10.1093/jnci/djp385)
- [9] López, A.G., González, C.A., Errezola, M., Escolar, A., Izarzugaza, I., Nebot, M. and Riboli, E. (1991) Tobacco smoke inhalation pattern, tobacco type, and bladder cancer in Spain. *American Journal of Epidemiology*, **134**, 830-839.
- [10] Hoffmann, D., Rivenson, A., Chung, F.L. and Wynder, E.L. (1993) Potential inhibitors of tobacco carcinogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **28**, 140-160. [doi:10.1111/j.1749-6632.1993.tb39169.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb39169.x)
- [11] Arnaud, M.J. (1993) Metabolism of caffeine and other components of coffee. In: Garattini, S. Ed., *Caffeine, Coffee and Health*, Raven Press, New York.
- [12] B'chir, F., Laouani, A., Ksibi, S., Arnaud, M.J. and Saguem, S. (2007) Cigarette filter and the incidence of lung adenocarcinoma among Tunisian population. *Lung cancer Amsterdam Netherlands*, **57**, 26-33. [doi:10.1016/j.lungcan.2007.01.034](https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2007.01.034)
- [13] Lilienfeld, A.M., Levin, M. and Moore, G.E. (1956) The association of smoking with cancer of the urinary bladder in humans. *Archives of Internal Medicine*, **98**, 129-135.
- [14] U. S. Department of Health and Human Services. (2004) The Health Consequences of Smoking, A Report of the Surgeon General, Atlanta.
- [15] Gandini, S. *et al.* (2008) Tobacco smoking and cancer: A meta-analysis. *International Journal of Cancer*, **122**, 5-64. [doi:10.1002/ijc.23033](https://doi.org/10.1002/ijc.23033)
- [16] Gough, K.R., Read, A.E., McCarthy, C.F. and Waters, A.H. (1963) Megaloblastic anaemia due to nutritional deficiency of folic acid. *QJM*, **32**, 243-256.
- [17] Chanarin, I., MacGibbon, B.M., O'Sullivan, W.J. and Mollin, D.L. (1959) Folic-acid deficiency in pregnancy. The pathogenesis of megaloblastic anaemia of pregnancy. *Lancet*, **2**, 634-639. [doi:10.1016/S0140-6736\(59\)91409-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(59)91409-6)
- [18] Pavanello, S., Mastrangelo, G., Placidi, D., Campagna, M., Pulliero, A., Carta, A., Arici, A. and Porru, S. (2010) CYP1A2 polymorphisms, occupational and environmental exposures and risk of bladder cancer. *European Journal of Epidemiology*, **25**, 491-500. [doi:10.1007/s10654-010-9479-8](https://doi.org/10.1007/s10654-010-9479-8)
- [19] Van der Boon J. (2001) Low-tar filter cigarettes and an aggressive type of lung cancer. *Lancet Oncology*, **2**, 255. [doi:10.1016/S1470-2045\(00\)00310-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(00)00310-7)
- [20] Hoffmann, D., Rivenson, A., Murphy, S.E., Chung, F.L., Amin, S. and Hecht, S.S. (1993) Cigarette smoking and adenocarcinoma of the lung: The relevance of nicotine-derived N-nitrosamines. *Journal of Smoking Related Disorder*, **4**, 165-189.
- [21] Wogan, G.N., Hecht, S.S., Felton, J.S., Conney, A.H. and Loeb, L.A. (2004) Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, **14**, 473-486. [doi:10.1016/j.semcancer.2004.06.010](https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2004.06.010)
- [22] Morabia, A. and Wynder, E.L. (1991) Cigarette smoking and lung cancer cell types. *Cancer*, **68**, 2074-2048. [doi:10.1002/1097-0142\(19911101\)68:9<2074::AID-CNCR2820680939>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19911101)68:9<2074::AID-CNCR2820680939>3.0.CO;2-X)
- [23] Wald, N., Idle, M. and Smith, P.G. (1977) Carboxyhaemoglobin levels in smokers of filter and plain cigarettes. *The Lancet*, **1**, 110-112. [doi:10.1016/S0140-6736\(77\)91702-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(77)91702-0)
- [24] Lubin, J.H., Alavanja, M.C.R., Caporaso, N., Brown, L.M., Brownson, R.C., Field, R.W., Garcia-Closas, M., Hartge, P., Hauptmann, M., Hayes, R.B., Kleinerman, R., Kogevinas, M., Krewski, D., Langholz, B., Le tourneau, E. G., Lynch, C.F., Malats, N., Sandler, N.P., Schaffrath-Rosario, A., Schoenberg, J.B., Silverman, D.T., Wang, Z., Wichmann, H.E., Wilcox, H.B. and Zielinski, J.M. (2007) Cigarette smoking and cancer risk: Modeling total exposure and intensity. *American Journal of Epidemiology*, **166**, 479-489. [doi:10.1093/aje/kwm089](https://doi.org/10.1093/aje/kwm089)
- [25] Hoffmann, D., Brunnemann, K.D., Prokopczyk, B. and Djordjevic, M.V. (1994) Tobacco-specific N-nitrosamines and Areca-derived N-nitrosamines: Chemistry, biochemistry, carcinogenicity and relevance to humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **41**, 1-52. [doi:10.1080/15287399409531825](https://doi.org/10.1080/15287399409531825)
- [26] Hecht, S.S., Isaacs, S. and Trushin, N. (1994) Lung tumor induction in A/J mice by the tobacco smoke carcin-

- gens4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and benzo (a) pyrene: A potentially useful model for evaluation of chemopreventive agents. *Carcinogenesis*, **15**, 2721-2725. [doi:10.1093/carcin/15.12.2721](https://doi.org/10.1093/carcin/15.12.2721)
- [27] Balansky, R., Ganchev, G., Itcheva, M., Steele, V.E., D'Agostini, F. and De Flora S. (2007) Potent carcinogenicity of cigarette smoke in mice exposed early in life. *Carcinogenesis*, **28**, 2236-2243. [doi:10.1093/carcin/bgm122](https://doi.org/10.1093/carcin/bgm122)
- [28] Landi, M.T., Sinha, R., Lang, N.P. and Kadlubar, F.F. (1999) Human cytochrome P4501A2. In: Vineis, P., Malats, N., Lang, M., d'Errico, A., Caporaso, N., Cuzick, J. and Moffetta, P., Eds., *Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer*. IARC Scientific Publications, Lyon, 173-195.
- [29] Vineis, P., Talaska, G., Malaveille, C., Bartsch, H., Martone, T., Sithisarakul, P. and Strickland, P. (1996) DNA adducts in urothelial cells: Relationship with biomarkers of exposure to arylamines and polycyclic aromatic hydrocarbons from tobacco smoke. *International Journal of Cancer*, **65**, 314-316. [doi:10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19960126\)65:3<314::AID-IJC6>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19960126)65:3<314::AID-IJC6>3.0.CO;2-2)
- [30] Bonser, G.M., Bradshaw, L., Clayson, D.B. and Jull, J.W. (1956) A further study of the carcinogenic properties of ortho hydroxy-amines and related compounds by bladder implantation in the mouse. *British Journal of Cancer*, **10**, 539-546. [doi:10.1038/bjc.1956.63](https://doi.org/10.1038/bjc.1956.63)
- [31] Lee, S.W., Jang, I.J., Shin, S.G., Lee, K.H., Yim, D.S., Kim, S.W., Oh, S.J. and Lee, S.H. (1994) CYP1A2 activity as a risk factor for bladder cancer. *Journal of Korean Medical Science*, **9**, 482-489.
- [32] Guengerich, F.P. and Shimada, T. (1991) Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chemical Research in Toxicology*, **4**, 391-407. [doi:10.1021/tx00022a001](https://doi.org/10.1021/tx00022a001)
- [33] Kamataki, T., Fujita, K., Nakayama, K., Yamazaki, Y., Miyamoto, M. and Ariyoshi, N. (2002) Role of human cytochrome P450 (CYP) in the metabolic activation of nitrosamine derivatives: Application of genetically engineered Salmonella expressing human CYP. *Drug Metabolism Reviews*, **34**, 667-676. [doi:10.1081/DMR-120005668](https://doi.org/10.1081/DMR-120005668)
- [34] Landi, M.T., Zocchetti, C., Bernucci, M., Kadlubar, F.F., Tannenbaum, S., Skipper, P., Bartsch, H., Malaveille, C., shields, P., Caporaso, N. and Vinei, P. (1996) Cytochrome P4501A2: Enzyme Induction and Genetic Control, Determining 4-aminobiphenyl-hemoglobin Adduct Levels. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **5**, 693-698.
- [35] Le Marchand, L., Hankin, J.H., Wilkens, L.R., Pierce, L.M., Franke, A., Kolonel, L.N., Seifried, A., Custer, L.J., Chang, W., Lum, J.A. and Donlon, T. (2001) Combined Effects of Well-done Red Meat, Smoking, and Rapid N-Acetyltransferase 2 and CYP1A2 Phenotypes in Increasing Colorectal Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **10**, 1259-1266.
- [36] Working group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2004) Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, 1-1438.

Article 6

ARTICLE 6

Activation par le Parvovirus Oncolytique H-1 (PVH-1) d'une réponse Helper et non Régulatrice des T CD4+ humains

Activation of a Helper and Not Regulatory Human CD4+ T Cell Response by Oncolytic H-1 Parvovirus

PLoS ONE 1 February 2012, Volume 7, Issue 2. e32197

Olivier Morales*, Audrey Richard*, Nathalie Martin, Dhafer Mrizak, Magalie Sénéchal, Céline Miroux, Véronique Pancré, Jean Rommelaere, Perrine Caillet-Fauquet, Yvan de Launoit, Nadira Delhem.

* Co-premier auteur

Contexte et objectifs de l'étude :

Des études récentes montrent qu'il devient possible d'envisager une application thérapeutique du PVH-1 comme "médicament" anticancéreux à large spectre. Cette thérapie virale anticancéreuse pourrait être efficace pour différents types de cancers et en particulier ceux qui sont encore très mal soignés, tels que les gliomes, les mélanomes, les cancers du poumon, les tumeurs cérébrales et les hépatocarcinomes. Néanmoins, avant d'envisager une utilisation en clinique des propriétés oncotropiques et oncolytiques du PVH-1 comme alternative aux agents anti-tumoraux, il convient au préalable d'avoir une parfaite connaissance des interactions existant entre le système immunitaire humain et PVH-1.

Les objectifs principaux de cette étude ont été de répondre à deux questions fondamentales qui ont été, très peu, voire pas, abordées au cours de ces dernières années, (i) Existe-t-il une sensibilité des cellules immunitaires humaines au PVH-1 ? (ii) Existe-il un dialogue entre le système immunitaire effecteur et/ou suppresseur humain et le PVH-1 ?

Etat des connaissances dans le contexte international.

Très peu de choses ont été décrites dans la littérature, concernant l'effet du PVH-1 sur les cellules du système immunitaire humain. En effet, une seule étude (4) a décrit *in vitro* une activation indirecte de certaines cellules de l'immunité, en mettant en évidence que des cellules tumorales de mélanome lysées par PVH-1 étaient capables de stimuler les cellules présentatrices d'antigènes humains (APC). Cependant, à ce jour, aucune étude n'a décrit un effet direct ou indirect de PVH-1 sur les autres cellules de l'immunité. Par ailleurs, Il a été décrit que PVH-1 avait un effet oncolytique préférentiel sur des cellules B transformées par EBV (5), cependant les mécanismes moléculaires associés à la cytotoxicité induite par PV-H1

sur ces cellules B transformées n'ont pas été analysés. En outre, il n'a jamais été décrit de modèle *in vivo* étudiant l'effet direct ou indirect de PVH-1 sur les cellules de l'immunité.

Méthodologie et Principaux résultats

Dans un premier temps, nous avons analysé, l'effet direct du PVH-1 sur le phénotype des cellules mononuclées périphériques humaines (PBMC), isolées d'une poche de sang d'un premier donneur sain, et activées ou non par de la Phyto-hémagglutinine (PHA). Il semblerait que les PBMC non activées ne soient pas sensibles à la lyse par PVH-1 à des doses d'infectivité faible (MOI 1), cependant à des doses d'infectivité élevée (MOI 10 et 100) les cellules semblent devenir sensibles au parvovirus. Par ailleurs, nous avons montré que le virus était capable d'affecter préférentiellement les PBMC activées, en altérant notamment leur prolifération et en induisant une diminution sensible de leur viabilité. Cet effet sur les PBMC activées, est bien corrélé à l'infection parvovirale, comme en témoignent, à la fois l'expression de la protéine virale NS1 et la néo-production de virus infectieux.

L'analyse par cytométrie de flux des compartiments cellulaires au sein des PBMC infectées par PVH-1 semble suggérer que PVH-1 cible préférentiellement les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes B et les cellules NK. Cependant, malgré un effet lytique du PVH-1, il ne semble pas affecter la sous-population majeure de l'immunité effectrice: les lymphocytes T CD4+. De plus, PVH-1 induit une augmentation des marqueurs d'activation précoce et tardif (CD30 et CD69), ainsi qu'une augmentation significative de la production de cytokines de type Th1 (IL-2 et IFN- γ) et Th2 (IL-4). Et, de façon très intéressante, nous avons montré qu'en présence de PVH-1, les PBMC sécrétaient massivement de l'IL-10, de façon dose virale dépendante. Ce résultat nous interpelle particulièrement, puisqu'il s'agit d'une cytokine majeure de l'immunosuppression qui est principalement sécrétée par les Treg. Ce résultat préliminaire entrouvre donc des perspectives intéressantes en termes d'immunosurveillance.

En conclusion, nos résultats bien que préliminaires, montrent pour la première fois que PVH-1 est capable d'induire la lyse de cellules immunitaires humaines normales et d'induire la production de cytokine immunosuppressive. Mais, bien qu'affectant certaines cellules de l'immunité, il semble que PVH-1 soit également capable de préserver certaines sous-populations immunitaires, et d'induire une activation du système immunitaire.

Notons, que ces résultats préliminaires auront besoin d'être confirmés, notamment en utilisant un virus purifié et produit aux normes GLP (Good Laboratory Practices).

Conclusion et retombées attendues

Une « parvo-thérapie » efficace et ciblée permettrait de traiter efficacement des cancers. Cette approche novatrice est séduisante, mais avant d'envisager des protocoles thérapeutiques basés sur l'utilisation de PV-H1. Il est en effet important d'exclure tout risque d'effet secondaire indésirable de PV-H1 sur le système immunitaire humain. Il s'agit en effet, d'un pré-requis fondamental dans la mise en place d'un essai clinique de phase 1. Une parvo-thérapie pourrait notamment s'adresser aux cancers qui ne répondent plus aux thérapies classiques ou pour lesquels il n'existe pas de chimiothérapies efficaces, ce qui est le cas de nombreux cancers tels que les gliomes, les mélanomes, les cancers du pancréas, les cancers du poumon, les tumeurs cérébrales et le carcinome hépatocellulaire. Il serait probable que le traitement par le PV-H1 puisse être administré en alternance avec l'utilisation d'autres traitements classiques des cancers (chimiothérapies, radiothérapies). De plus le parvovirus est susceptible d'atteindre des métastases disséminées cryptiques en raison de sa diffusion systémique dans l'organisme, probablement par le circuit lymphatique.

En conclusion, en excluant tout risque d'effet secondaire indésirable et irrémédiable de PV-H1 sur le système immunitaire humain et en montrant qu'il n'active pas une réponse immunosuppressive aggravante, ce projet devrait permettre d'entrouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour traiter les CHC résistants aux traitements anti-cancéreux.

Activation of a Helper and Not Regulatory Human CD4+ T Cell Response by Oncolytic H-1 Parvovirus

Olivier Moralès^{1*}, Audrey Richard^{1*}, Nathalie Martin¹, Dhafer Mrizak¹, Magalie Sénéchal¹, Céline Miroux¹, Véronique Pancré¹, Jean Rommelaere², Perrine Caillet-Fauquet¹, Yvan de Launoit^{1*}, Nadira Delhem^{1*}

1 Institut de Biologie de Lille, UMR 8161, CNRS, Institut Pasteur de Lille, Université Lille-Nord de France, Lille, France, **2** Tumor Virology, Research Program Infection and Cancer, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Germany

Abstract

Background: H-1 parvovirus (H-1 PV), a rodent autonomous oncolytic parvovirus, has emerged as a novel class of promising anticancer agents, because of its ability to selectively find and destroy malignant cells. However, to probe H-1 PV multimodal antitumor potential one of the major prerequisites is to decipher H-1 PV direct interplay with human immune system, and so prevent any risk of impairment.

Methodology/Principal findings: Non activated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are not sensitive to H-1 PV cytotoxic effect. However, the virus impairs both activated PBMC proliferation ability and viability. This effect is related to H-1 PV infection as evidenced by Western blotting detection of H-1 PV main protein NS1. However, TCID50 experiments did not allow newly generated virions to be detected. Moreover, flow cytometry has shown that H-1 PV preferentially targets B lymphocytes. Despite seeming harmful at first sight, H-1 PV seems to affect very few NK cells and CD8+ T lymphocytes and, above all, clearly does not affect human neutrophils and one of the major CD4+ T lymphocyte subpopulation. Very interestingly, flow cytometry analysis and ELISA assays proved that it even activates human CD4+ T cells by increasing activation marker expression (CD69 and CD30) and both effective Th1 and Th2 cytokine secretion (IL-2, IFN- γ and IL-4). In addition, H-1 PV action does not come with any sign of immunosuppressive side effect. Finally, we have shown the efficiency of H-1 PV on xenotransplanted human nasopharyngeal carcinoma, in a SCID mouse model reconstituted with human PBMC.

Conclusions/Significance: Our results show for the first time that a wild-type oncolytic virus impairs some immune cell subpopulations while directly activating a Helper CD4+ T cell response. Thus, our data open numerous gripping perspectives of investigation and strongly argue for the use of H-1 PV as an anticancer treatment.

Citation: Moralès O, Richard A, Martin N, Mrizak D, Sénéchal M, et al. (2012) Activation of a Helper and Not Regulatory Human CD4+ T Cell Response by Oncolytic H-1 Parvovirus. PLoS ONE 7(2): e32197. doi:10.1371/journal.pone.0032197

Editor: Maciej S. Lesniak, The University of Chicago, United States of America

Received: December 30, 2011; **Accepted:** January 24, 2012; **Published:** February 16, 2012

Copyright: © 2012 Moralès et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The authors have no support or funding to report.

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

* E-mail: nadira.delhem@ibl.fr

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Novel anticancer strategies aim at enhancing both tumor cell death and antitumor immune response through recognition of tumor antigens by the immune system [1,2]. As new approaches for tumor targeting, replication-competent oncolytic viruses have been drawing special attention for a while because they exert specific antitumor effects *in vivo* [1,3,4,5,6].

More particularly, some autonomous parvoviruses, especially H-1 parvovirus (H-1 PV), are able to replicate in and kill both cancer cell lines and human primary cells cultured from patient tumor samples [7] while remaining harmless for normal cells. This remarkable feature, known as oncolysis, ultimately results in the decrease of spontaneous, chemically induced and xenografted tumor incidence in laboratory animals [2]. However, H-1 PV oncosuppression seems to involve more than just tumor cell killing. Indeed, H-1 PV may also exert a vaccination effect by

enhancing effective immune response as several studies tend to suggest. For example, H-1 PV-mediated cell lysates stimulate antigen presentation by dendritic cells, leading to cytotoxic T lymphocyte activation and proinflammatory cytokine release [8]. Besides, H-1 PV *in vivo* antitumor effect has been reported to be related to both direct oncolysis and immune response triggering in a human hepatoma metastatic model [9]. More recently, immunocompetent rats carrying syngenic gliomas were shown to be more susceptible to H-1 PV oncosuppressive action than immunodeficient ones xenografted with human glioma cells. The former exhibited complete and stable cancer remission whereas the latter were only partially cured, confirming the existence of a major immunological component in H-1 PV therapeutic effect [10]. But none of these studies investigated the direct interplay between H-1 PV and immune system, particularly human immune cells.

With a view to using H-1 PV as an anticancer treatment, we propose to decipher H-1 PV effect on human immune cells to probe its multimodal antitumor potential as well as its harmlessness. As a first approach, we analyzed the effect of H-1 PV direct inoculation on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) under activation conditions or not. H-1 PV does not cause any major changes in non activated PBMCs. On the contrary, activated ones suffer both proliferation ability and viability impairment as well as significant lysis, while sustaining overactivation and both Th1 and Th2 type cytokine secretion. Very interestingly, further investigation indicated that H-1 PV does not only preserve CD4+ T cell subpopulation but also enhances its activation status as well as both IL-2 and IFN- γ secretion. Any effective immune response activation upon infection might get offset by the induction of a regulatory response which would result in effector T cell inhibition. So, CD4+CD25+ regulatory T cells were further analyzed because they are able to inhibit antitumor immune response and thus, are associated with the progression of cancer [11,12]. These cells show neither viability nor proliferation or phenotypical alteration. Surprisingly, their suppressive activity is even inhibited upon H-1 PV infection. Taken altogether, our results confirm H-1 PV relevance in therapy by demonstrating *ex vivo* its direct immunomodulating potential, possibly resulting in improved antitumor immunity, without inducing Treg cell activation.

Results

PHA-activated PBMCs are affected by H-1 PV infection

For all the experiments performed on human PBMCs, cells were isolated from healthy donors' blood, PHA-activated or not, and inoculated with increasing amounts of purified H-1 PV (MOI 1, 5 and 25) or mock-treated from 24 h to 120 h. The impact of such treatments was first analyzed by assessing the distribution of PBMC main cell populations using flow cytometry (Table 1). After

24, 48 and 72 h of infection, cells were collected and labelled for appropriate cell surface antigens. As reported in Table 1, H-1 PV exerts no significant effect on the different cell populations when they are not activated, except for Natural Killer (NK) cell fraction whose frequency sustains a slight, viral dose-dependent decrease. However, under PHA stimulation conditions, B cells, CD8 T cells and NK cells rates seem to undergo a decrease that may be more or less significant depending on the cell type. Meanwhile, CD4+ T cells do not seem to be impaired by H-1 PV inoculation since their frequency remains remarkably stable under any experimental conditions.

To validate the impact of H-1 PV infection on freshly isolated PBMCs, we have reproduced the 72 h p.i condition using PBMC from 4 different donors (Table 2 and Fig. 1A). Results obtained especially show that, within activated PBMCs, B lymphocyte rates are clearly decreased upon infection whereas NK cells and the CD8+ T lymphocytes are slightly decreased. However, concerning the CD4+ T lymphocytes, one can observe that the level is maintained throughout the infection.

Infected PBMCs were further analyzed with regard to their proliferation ability and viability. On one hand, cell proliferation was assessed using a test based on the metabolic incorporation of tritiated thymidine into cellular DNA. We clearly observed that PHA-activated PBMC proliferation ability is dramatically impaired in a viral dose-dependent manner (Fig. 1B). On the other hand cell viability was measured using a test based on a bioluminescent reaction measuring the amount of ATP present in living cells. The results perfectly correlate with proliferation assays since they show a major virus-dependent decrease in PHA-activated PBMC viability upon H-1 PV infection, unlike non activated cells whose viability is preserved (Fig. 1C). Cell proliferation impairment is statistically significant 72 hours post-infection at MOI 5 and 25 ($p < 0,05$) when compared to Mock condition and so is cell viability decrease whatever the MOI is ($p < 0,05$).

Table 1. Main cell populations fractions within non activated or PHA-activated human PBMCs at 24, 48 and 72 h after H-1 PV infection.

Markers	Status	0 h p.i	24 h p.i				48 h p.i				72 h p.i			
			Mock	MOI 1	MOI 5	MOI 25	Mock	MOI 1	MOI 5	MOI 25	Mock	MOI 1	MOI 5	MOI 25
CD3CD4	NA	52,4	55,4	54	55	56,6	51,8	53,7	54,6	54,5	52,2	56	48,3	53,2
	A		48,7	52,3	54,2	57,3	35,4	31,7	31,5	31,5	34,5	44,1	29,3	28,8
CD3CD8	NA	10,7	17,1	16,4	18	17,9	22,9	16,2	24,4	17,2	19,9	19,9	46,3	13
	A		29,4	31,7	30,4	28,3	26,5	24,5	23,3	27,4	18,2	14,4	3,85	5,72
CD19CD20	NA	11,4	18,4	16,9	17,5	16,7	16,1	20,1	18,2	19,9	24,1	20	15,2	17,8
	A		23,6	28,1	29,2	25,4	35,8	33,7	31,4	27,2	65,2	67,9	33,4	30
CD3CD56	NA	5,25	4,82	4,57	4,73	3,39	4,34	2,69	2,97	2,65	4,27	2,71	2,36	1,34
	A		4,81	5	4,67	3,39	4	4,49	4,36	3,41	3,5	4,08	2,61	1,24
CD3CD30	NA	0,21	0	0	0,02	0,04	0,27	0	0,04	0,1	0,53	0,39	0,23	0,37
	A		2,73	3,12	4,47	5,58	7	6,33	4,69	4,44	3,96	1,57	0,62	3,41
CD3CD69	NA	0	0,23	0,18	1,28	0,58	0,04	0,3	0,56	0,51	0,33	0,68	0,43	0,55
	A		1,96	1,7	1,65	0,95	24,7	20,8	18	17,1	12,4	16,3	28,5	34,3

p.i: post-infection; NA: non activated PBMCs; A: activated PBMCs; MOI: multiplicity of infection.

Freshly isolated PBMCs were inoculated with increasing amounts of H-1 PV or mock-treated. For each condition, cells were labelled with appropriate antibodies and the fraction of each cell population was analyzed using flow cytometry. Results are expressed as percentages of total cells within PBMCs. CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+CD20+ and CD3+CD56+ respectively indicate the % of CD4+ helper T cells, CD8+ effector T cells, B cells and NK cells within PBMCs. CD3+CD69+ and CD3+CD30+ respectively indicate the % of early and late activated T cells within PBMCs.

Representative data for all markers.

doi:10.1371/journal.pone.0032197.t001

Table 2. Main cell populations fractions within non activated or PHA-activated human PBMCs at 72 h after H-1 PV infection.

Markers	Status	0 h p.i	72 h p.i			
			Mock	MOI 1	MOI 5	MOI 25
CD3CD4	NA	24,67	31	33,25	33,8	36,63
	A		26,7	28,58	28	28,2
CD3CD8	NA	9,91	19,8	19,45	20,4	20,68
	A		18,33	17,8	16,49	16,13
CD19CD20	NA	4,35	8,145	7,22	6,25	6,54
	A		18,10	18,70	10,03	9,20
CD3CD56	NA	8,3	11,42	9,38	9,49	9,09
	A		11,55	12,30	11,40	10,69

p.i: post-infection; NA: non activated PBMCs; A: activated PBMCs; MOI: multiplicity of infection.

Freshly isolated PBMCs were inoculated with increasing amounts of H-1 PV or mock-treated. For each condition, cells were labelled with appropriate antibodies and the fraction of each cell population was analyzed using flow cytometry. Results are expressed as percentages of total cells within PBMCs. CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3-CD20+ and CD3-CD56+ respectively indicate the % of CD4+ helper T cells, CD8+ effector T cells, B cells and NK cells within PBMCs.

Mean data of 4 independent experiments from 4 different donors.

doi:10.1371/journal.pone.0032197.t002

H-1 PV exerts its effect on PHA-activated PBMCs in an NS1-dependent manner

For each condition, pictures of the cells were taken in the course of infection. An overall visual analysis showed that H-1 PV inoculation causes important morphological changes to PHA-activated PBMCs, leading to cell gathering in a viral dose-dependent manner (Fig. 2A). Cell aspect made us think of overactivation plates or cell death outward signs so we performed a cytotoxicity assay to settle on either possibility. The test, which is based on a bioluminescent reaction measuring the leak of a cellular marker from cytoplasm to culture medium, allows the loss of plasma membrane integrity to be revealed. 72 h after H-1 PV inoculation, there was a 4- to 6-fold increase in stimulated PBMC basal lysis whatever the dose of virus is (Fig. 2B). So H-1 PV seems responsible for killing PHA-activated cells, but possibly in an indirect way. At the same time, PBMC total protein extracts were prepared in the course of infection and analyzed by Western blotting. Non Structural protein 1 (NS1) plays a crucial role in H-1 PV life cycle achievement since it is involved in viral DNA replication, viral proteins expression and also cytotoxicity, allowing progeny virions to be released [13,14,15]. In this respect, we consequently searched for NS1 (76 kDa) in infected PBMCs. As shown in Figure 2C, PHA-activated PBMCs are able to produce NS1 in a viral dose-dependent manner. We also noticed that a slight amount of the protein becomes visible in non activated PBMCs under MOI 5 and 25 conditions. Both caspase 3 and PARP cleavage is characteristic of immune cells activation at a molecular level. It is also a well-known marker of ongoing apoptosis. In the context of H-1 PV-infected PBMCs, caspase 3 and PARP are indeed cleaved under activation conditions but their expression rate remains stable whatever infection conditions are (Fig. 2C). This suggests that PHA-activated PBMCs die in a caspase 3-independent manner upon H-1 PV infection. Besides, considering that H-1 PV typically induces the lysis of productively infected cells, we asked whether NS1 production was followed by the release of newly generated virions. PBMCs and culture

supernatants were then collected and tested according to the TCID50 method in order to quantify intracellular and released virions. We were able to detect the presence of infectious viral particles. However, the quantity did not exceed the inoculum that was not removed from the cells, and even tended to decrease (Fig. 2D). This shows that PBMCs do not support an H-1 PV productive infection despite their ability to express NS1 protein.

PHA-activated PBMCs are overactivated during H-1 PV infection and secrete Th1 and Th2 type cytokines

Cells were collected and CD3+ T cells were analyzed for the expression of early (CD69) and late (CD30) activation markers using flow cytometry. In a very interesting manner, T lymphocytes (CD3+) keep their ability to get activated upon H-1 PV infection. The virus even potentiates it, as evidenced by an increase in the expression of respectively early and late activation markers CD69 and CD30. Results show that CD69 and CD30 expression is increased at the surface of activated CD3+ T cells in a viral dose-dependent way (Fig. 3A). Moreover, culture supernatants were collected and tested for cytokine detection using Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) in order to assess the time course of PBMC cytokine release. We observed that H-1 PV enhances PHA-activated PBMC ability to secrete Th1 cytokines such as IL-2 and IFN- γ (Fig. 3B) but also Th2 cytokines, namely IL-4 and IL-10 (Fig. 3B). Interestingly, H-1 PV is also able to induce non activated PBMC late IL-4 secretion (120 h after the inoculation). Remarkably, these increased cytokine secretions depend on the viral dose and some of them remain detectable up to 120 h after H-1 PV inoculation.

Unlike PBMCs, CD4+ T cells do not undergo any major impairment upon H-1 PV infection

For all the experiments performed on human CD4+ T cells, PBMCs were first isolated from healthy donors' blood. Then CD4+ T cells were negatively selected, activated (or not) using both anti-CD3 and anti-CD28 antibodies and inoculated with increasing amounts of H-1 PV (MOI 1, 5 and 25) or mock-treated from 24 h to 120 h. First, we analyzed infected CD4+ T cells in terms of proliferation ability and viability as described above for PBMCs. The results showed that CD4+ T cell proliferation ability is not altered upon H-1 PV infection whether cells are activated or not (Fig. 4A). In the same manner, H-1 PV does not affect CD4+ T cell viability (Fig. 4B). Slight differences between the subgroups concerning both cell proliferation and viability were not statistically significant ($p > 0,1$). Moreover, pictures of the cells were taken in the course of infection and showed that H-1 PV inoculation is not related to any major morphological changes (Fig. 4C). Besides, cytotoxicity assays did not prove any increase in non activated and activated CD4+ T cell basal lysis (Fig. 4D). Nevertheless, at a molecular level, Western blot analysis revealed that CD4+ T cells transiently express a slight, dose-dependent amount of NS1 protein.

H-1 PV preserves or even enhances non-activated and activated CD4+ T cell secretion ability

In the course of infection, CD4+ T cells were collected and analyzed for the expression of early CD69 and late CD30 activation markers using flow cytometry. Activated CD4+ T cell expression of both markers is increased from the beginning of infection (Fig. 5A). And interestingly, CD30 expression is also enhanced in infected, non activated CD4+ T cells (Fig. 5A). At the same time, culture supernatants were tested for cytokine detection using ELISA method. CD4+ T cells keep their ability to secrete

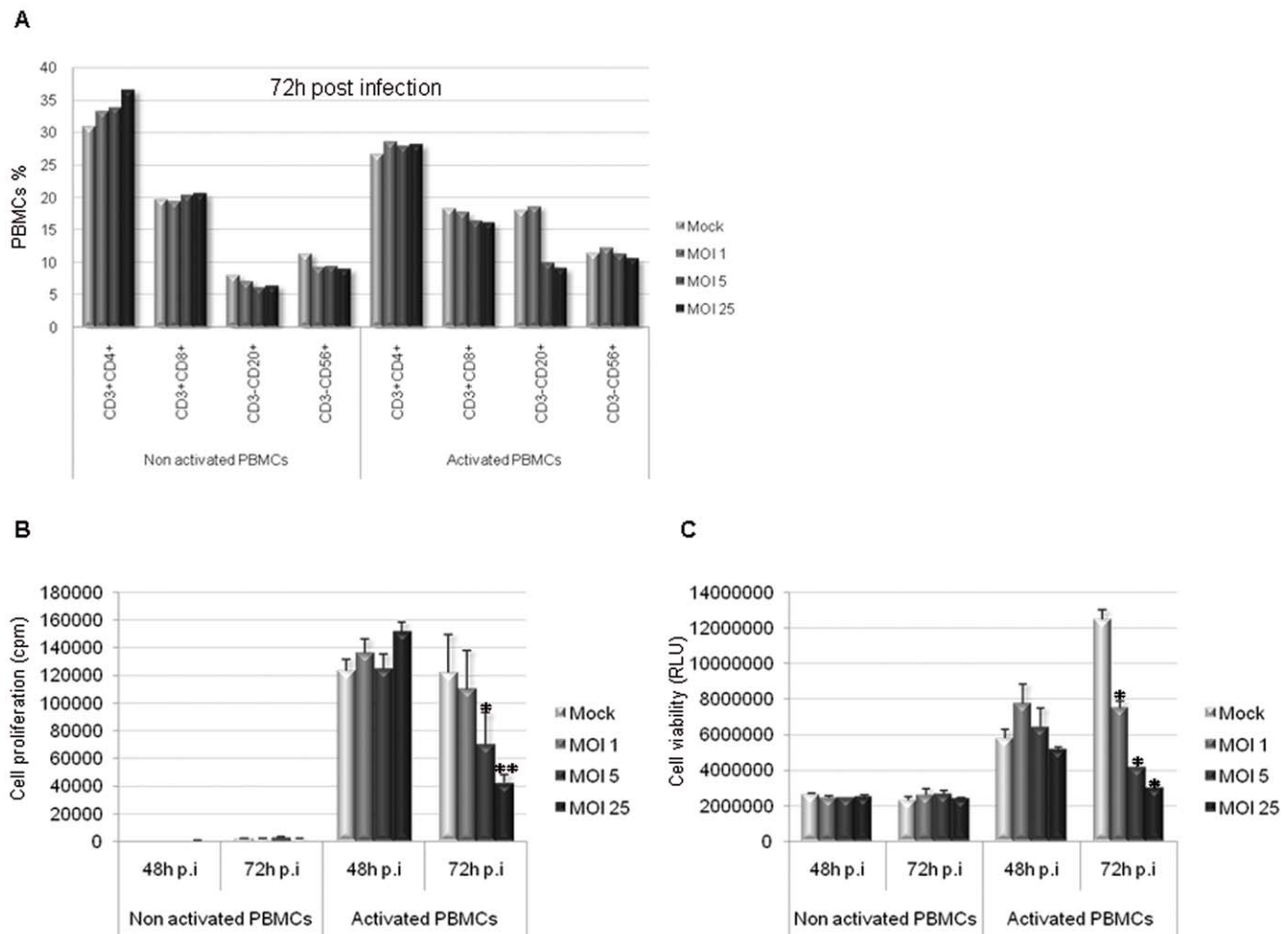


Figure 1. PHA-activated PBMCs are affected by H-1 PV infection. PBMCs were inoculated with increasing amounts of purified H-1 PV or mock-treated. MOI : multiplicity of infection, expressed as the number of plate-forming unit/cell; p.i : post-infection. **A.** CD8+ effector T cell, B lymphocyte and NK cell populations are affected by H-1 PV infection within PHA-activated PBMCs, whereas CD4+ helper T cells are not. Cells were collected 72 h p.i and labelled for appropriate cell surface antigens and the fraction of main lymphocyte populations within PBMCs was analyzed using flow cytometry. Results are expressed as percentages of total cells within PBMCs. **B.** PHA-activated PBMC proliferation ability is decreased upon H-1 PV infection. Cell proliferation was assessed by metabolic incorporation of tritiated thymidine into cellular DNA. Assays were performed at different times after H-1 PV inoculation but only 48 and 72 h p.i conditions are shown. Results from one representative experiment are represented as means of triplicate wells with $\pm$ standard deviation bars and expressed in count per minute (cpm). Statistical analysis for 4 independent experiments was performed using a Mann-Whitney test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ relative to Mock condition). **C.** PBMCs viability is decreased upon H-1 PV infection. Cell viability was evaluated using a test based on a bioluminescent reaction measuring the amount of ATP present in living cells. Assays were performed at different times after H-1 PV inoculation but only 48 and 72 h conditions are shown. Results from one representative experiment are represented as means of triplicate wells with $\pm$ standard deviation bars and expressed in relative light unit (RLU). Statistical analysis for 4 independent experiments was performed using a Mann-Whitney test (* $p < 0,05$ relative to Mock condition). Representative data from 4 independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0032197.g001

Th1 and Th2 cytokines (IL-2, IFN- γ , IL-4 and IL-10) (Fig. 5B). Very interestingly, H-1 PV is even able to enhance activated CD4+ T cell ability to release IL-2 right from the beginning of the infection, and IL-4 at early and late infection stages (24 h and 120 h after the inoculation) (Fig. 5B). Noticeably, H-1 PV also induces IL-2 secretion in non activated CD4+ T cells from 24 to 72 h after the inoculation (Fig. 5B).

Unlike PBMCs, neutrophils cells do not undergo any major impairment upon H-1 PV infection

Isolated neutrophils cells were LPS-activated or not (1 μ g/ml), and inoculated with increasing amounts of purified H-1 PV (MOI 1, 5 and 25) or mock-treated from 24 h to 72 h. The impact of such treatments was first analyzed by pictures of the cells which

were taken in the course of infection. An overall visual analysis showed that H-1 PV inoculation is not related to any major morphological changes (Fig. 6A).

Then, we analyzed infected neutrophils in terms of viability as described above for PBMCs and CD4+ T cells. Although we observed a decrease in the viability of neutrophils 18 h after infection, it is not related to an effect of H-1PV but to the fact (and it is well documented) that isolated neutrophils can not be kept very longer in culture. Thus, H-1 PV does not affect neutrophil viability whatever the MOI and up to 72 hours of contact (Fig. 6B).

Finally, we confirmed that infected neutrophils did not express NS1 protein even transiently, confirming the complete absence of H-1 PV effect on this immune sub-population (Fig. 6C).

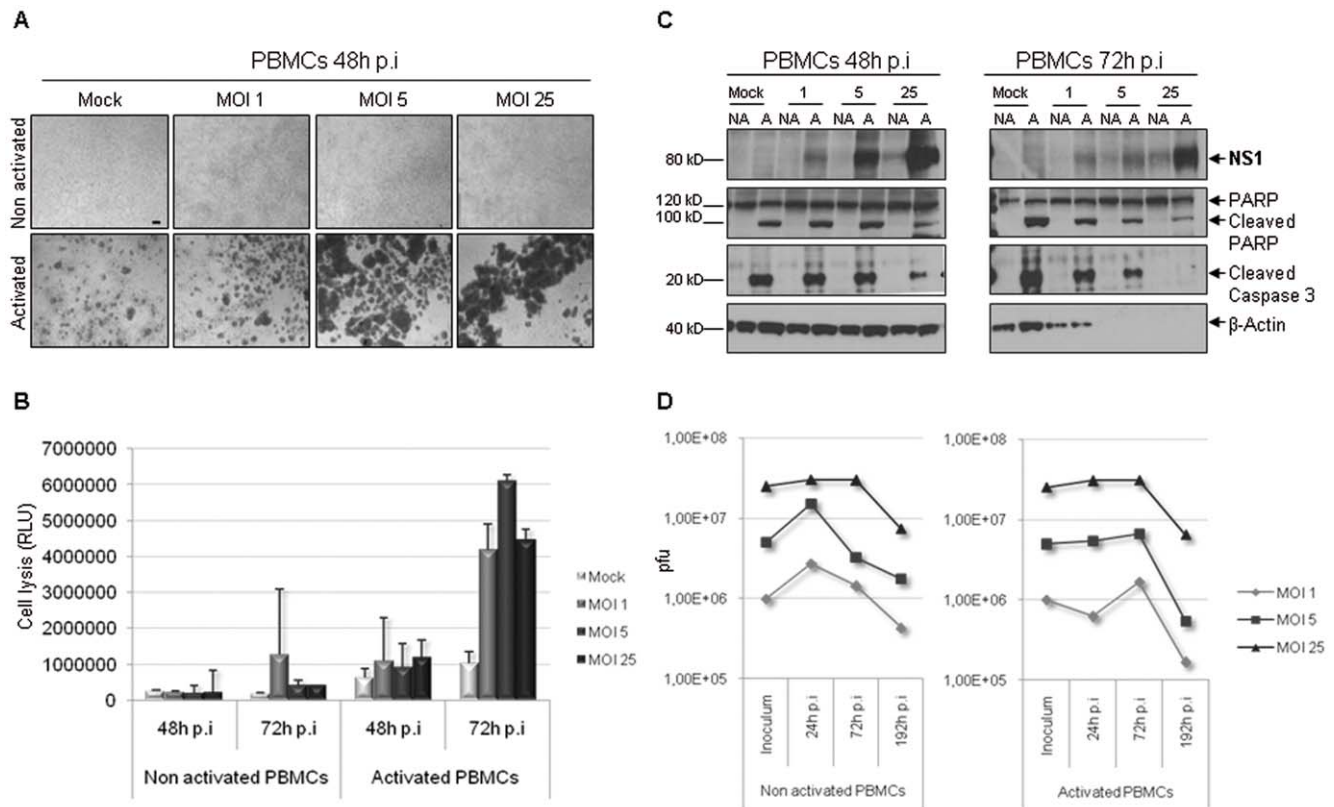


Figure 2. H-1 PV exerts its effect on PHA-activated PBMCs in an NS1-dependent manner. PBMCs were inoculated with increasing amounts of purified H-1 PV or mock-treated. MOI : multiplicity of infection, expressed as the number of plate-forming unit/cell; p.i : post-infection. **A.** H-1 PV alters PHA-activated PBMC morphology. For each condition, pictures of cells were taken in the course of infection but only those taken 48 h post-infection are shown. Scale bar = 100 μ m. **B.** PHA-activated PBMCs are lysed upon H-1 PV infection. H-1 PV cytotoxicity was assessed using a test based on a bioluminescent reaction measuring the leak of a cellular marker from cytoplasm to culture medium, which reveals the loss of plasma membrane integrity. Assays were performed at different times after H-1 PV inoculation but only 48 and 72 h conditions are shown. Results are represented as means of triplicate wells with $\pm$ standard deviation bars and expressed in relative light unit (RLU). **C.** PHA-activated PBMC death upon H-1 PV infection is related to NS1 protein expression but does not depend on caspase 3 activation. Non activated (NA) and activated (A) PBMC total protein extracts were prepared in the course of infection. Equal amounts of proteins were separated by 4–12% SDS-PAGE and analyzed by Western blot for the presence of NS1 protein, cleaved caspase 3 and both full-length and cleaved PARP. β -actin was used as a loading control. **D.** PBMCs do not support an H-1 PV productive infection. Both PBMCs and culture supernatants were collected and tested for the presence of infectious viral particles using the Tissue Culture Infectious Dose 50 method. The graph represents the time course of both released and non-released virions amounts which were added and expressed in plaque forming unit (pfu). Representative data from 3 independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0032197.g002

H-1 PV does not affect Treg cell phenotype and viability while inhibiting their suppressive activity

CD4+CD25+ regulatory T cells (Treg) play an indispensable role in maintaining immunological unresponsiveness to self antigens and in suppressing excessive immune responses deleterious to the host. In the particular context of cancer, Treg cells have been increasingly demonstrated to play an active and significant role in the pathology progression and suppress antitumor-specific immunity. Thus, assessing Treg cell status has become a crucial point in the area of new clinical strategies development [11,12]. So, we investigated the impact of H-1 PV on both regulatory T cell phenotype and function. Treg cells were isolated from healthy donors PBMCs and extemporaneously analyzed for their purity rate using flow cytometry. For this purpose, we assessed the expression of Treg cell-associated proteins, namely CD25 (IL-2 receptor α -chain), CD127 (IL-7 receptor α -chain) and FoxP3 (a transcription factor) [16]. CD4 and CD25 high expression defines cell purity which is superior to 95%. CD4+CD25⁺ cell fraction slightly expresses CD25 or even does not at all (Fig. 6A). Lack of CD127 expression has recently been described to be characteristic of functional Treg

cells. In contrast, CD4+CD25⁺ cells do express this molecule. As shown in Figure 7A, we confirmed that 90% of CD4+CD25⁺ cells but only 14% of CD4+CD25⁺ cells do not express CD127. In the same way, the analysis of intracellular FoxP3 expression shows that 86% of freshly isolated Treg cells express this protein whereas only 12% of CD4+CD25⁺ cell fraction do. As previously described for PBMCs and CD4⁺ T cells, Treg cells were then infected with increasing amounts of H-1 PV or mock-treated for 24 or 48 h. The cells were first analyzed by flow cytometry to assess the impact of such treatments on Treg cell phenotype. The results are reported in Figure 7B and reveal no significant differences in the expression of Treg cell-associated markers, whether the cells are activated or not. Once again cell viability was evaluated using the same bioluminescent test which shows that H-1 PV inoculation does not affect activated or non activated Treg cell survival (Fig. 7C).

Regulatory T cells are known to be anergic upon anti-CD3 and anti-CD28 antibodies *in vitro* stimulation whereas PBMCs are able to proliferate under these conditions. The functional suppressive ability of freshly isolated Treg cells was assessed using a Mixed Leukocyte Reaction (MLR) test between autologous PBMCs and

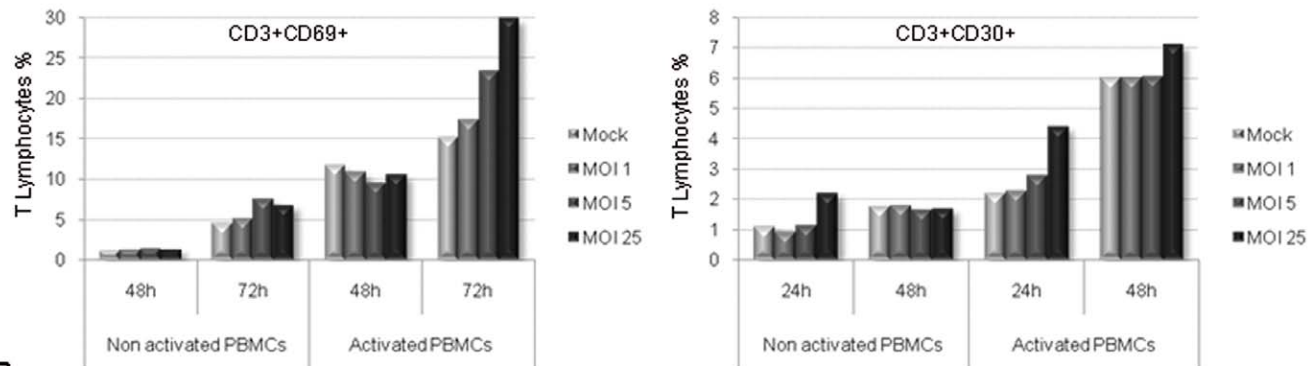
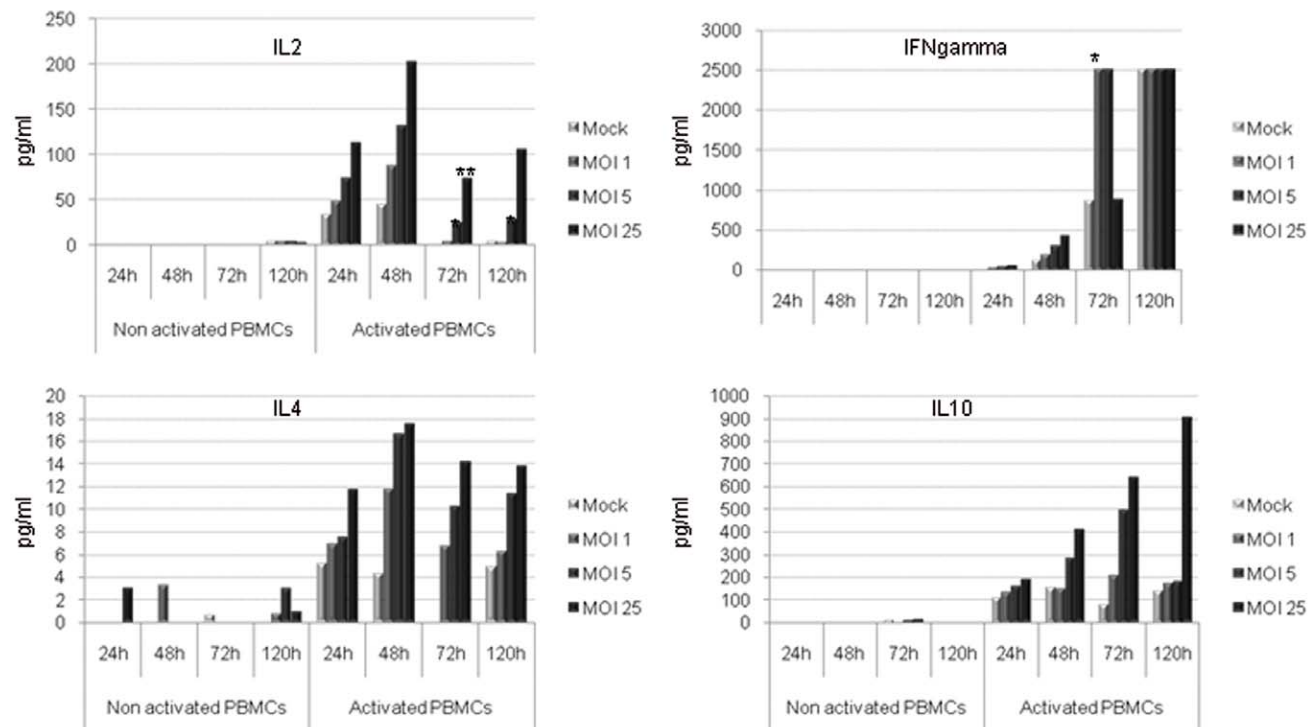
A**B**

Figure 3. PHA-activated PBMCs are overactivated during H-1 PV infection and secrete Th1 and Th2 type cytokines. PBMCs were inoculated with increasing amounts of purified H-1 PV or mock-treated. MOI : multiplicity of infection, expressed as the number of plate-forming unit/cell. **A.** Early and late activation marker expression is increased at the surface of PHA-activated PBMCs upon H-1 PV infection. In the course of infection, cells were collected, labelled for the expression of early (CD69) and late (CD30) activation markers and analyzed using flow cytometry. Results are expressed as percentages of activated cells within T lymphocytes (CD3+ cells). **B.** H-1 PV enhances the ability of PHA-activated PBMCs to secrete Th1 and Th2 type cytokines. In the course of infection, culture supernatants were collected and tested for cytokine detection by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results are expressed in pg/ml as means of duplicate wells and after subtraction of the background value. Statistical analysis for 3 independent experiments was performed using a Mann-Whitney test (* p<0,05; ** p<0,01 relative to Mock condition). Representative data from 3 independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0032197.g003

CD4+CD25+ cells at different ratios, and PBMC proliferation was determined after 48 h. Cell proliferation was measured using metabolic incorporation of tritiated thymidine into cellular DNA. Ex vivo human Treg cells still exert their suppressive activity in a dose-dependent manner, inhibiting up to 80% of PBMC proliferation (Fig. 7D). Regarding these results, we chose to perform our experiments under the 4 PBMCs to 2 Treg cells ratio (arrow, Fig. 7D) and investigated whether H-1 PV could affect Treg function. The MLR test was slightly adjusted to respond to our hypothesis since we performed it using autologous PBMCs and Treg cells, with or without H-1 PV. Under basal conditions (i.e. no

stimulation and no virus) Treg cells are able to inhibit PBMC proliferation up to 30%. When H-1 PV is added, an additional impairment is expected according to the data depicted above. We indeed noticed an additional decrease of PBMC proliferation, especially under MOI 5 condition but very interestingly this decrease is weaker than expected when cells are infected with a higher amount of virus (MOI 25) (Fig. 7E). This strongly suggests that H-1 PV may inhibit Treg cell-mediated suppressive activity.

Other possible alterations of Treg cell activity were also evaluated. More particularly ELISA assays indicate that Treg cell cytokine pattern (IL-2, IFN-γ, TGFβ and IL-10) remains

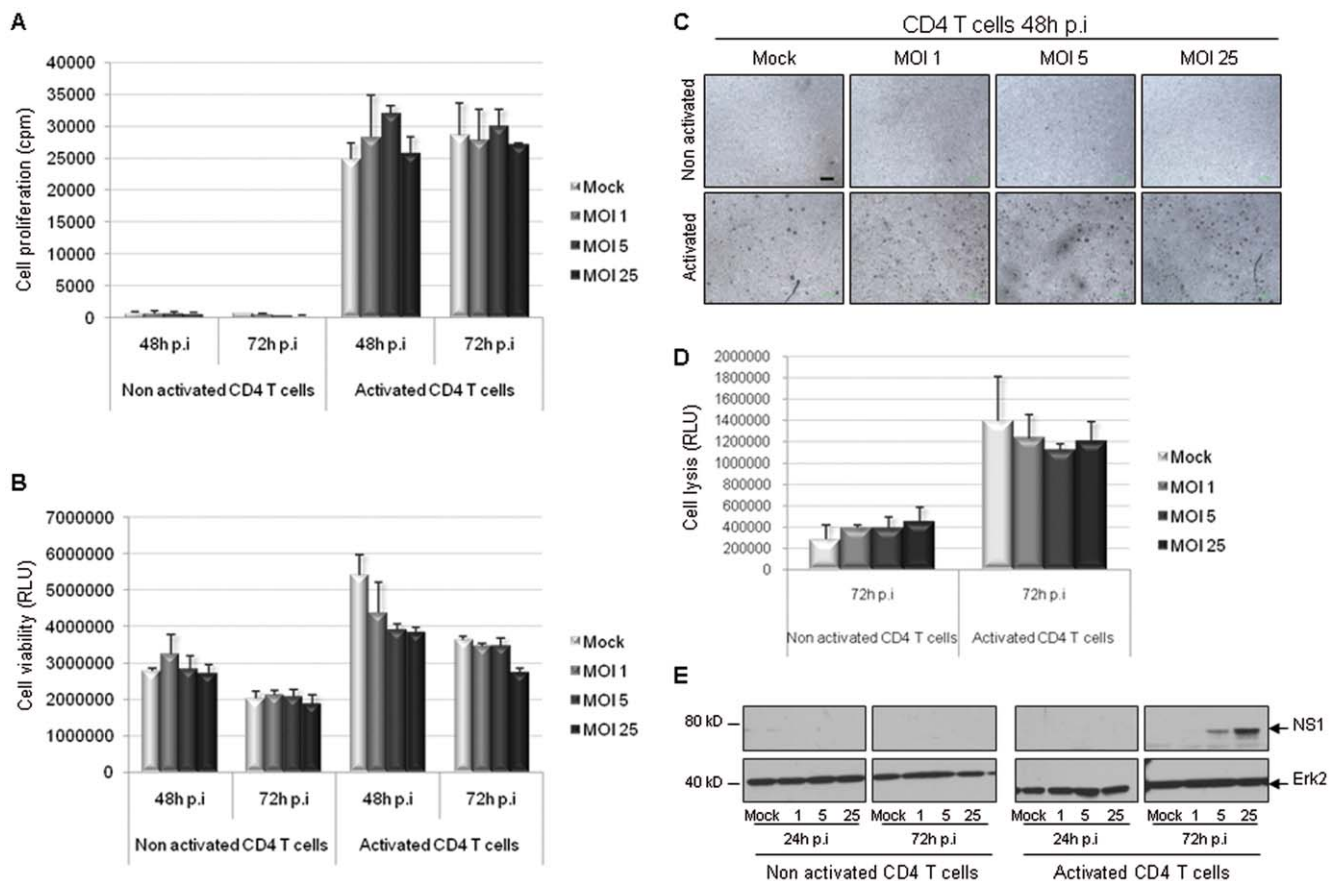


Figure 4. Unlike PBMCs, CD4+ T cells do not undergo any major impairment upon H-1 PV infection. CD4+ T cells were inoculated with increasing amounts of H-1 PV or mock-treated. MOI : multiplicity of infection, expressed as the number of plate-forming unit/cell; p.i : post-infection. **A.** CD4+ T cell proliferation ability is not altered upon H-1 PV infection. Cell proliferation was assessed by metabolic incorporation of tritiated thymidine into cellular DNA. Only 48 and 72 h p.i. conditions are shown. Results are represented as means of triplicate wells with $\pm$ standard deviation bars and expressed in count per minute (cpm). **B.** H-1 PV does not affect CD4+ T cell viability. Cell viability was evaluated using a test based on a bioluminescent reaction measuring the amount of ATP present in living cells. Only 48 and 72 h p.i. conditions are shown. Results are represented as means of triplicate wells with $\pm$ standard deviation bars and expressed in relative light unit (RLU). **C.** Infection of CD4 T cells by H-1 PV is not related to any morphological changes. For each condition, pictures of cells were taken in the course of infection but only those taken 48 h after H-1 PV inoculation are shown. Scale bar = 100 μ m. **D.** H-1 PV does not modify CD4+ T cell basal lysis. H-1 PV cytotoxicity was assessed using a test based on a bioluminescent reaction measuring the leak of a cellular marker from cytoplasm to culture medium, which reveals the loss of plasma membrane integrity. Results are represented as means of triplicate wells with $\pm$ standard deviation bars and expressed in relative light unit (RLU). **E.** CD4+ T cells transiently express a slight amount of NS1 protein. Equal amounts of total CD4+ T cell proteins were separated by 4–12% SDS-PAGE and analyzed by Western blot for the presence of NS1 protein. Erk2 was used as a loading control. Representative data from 2 independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0032197.g004

unchanged after 48 h of infection (data not shown). Besides, H-1 PV does not modify the anergic condition of Treg cells upon anti-CD3 and anti-CD28 activation. Massive IL-2 amounts combined with co-culture with irradiated autologous PBMCs are the only treatment which allows Treg cells to proliferate. Under these culture conditions we did not show any significant difference in Treg cell proliferation ability either (data not shown).

H-1 PV is able to slow down and stabilize the growth of nasopharyngeal carcinoma in humanized SCID mice

The results are presented in Tumor Volume Index versus days post-treatment in Figure 8B. Although we have seen a progressive increase in tumor size for the four groups of mice, only the groups, which did not receive H-1 PV, saw their tumors grow to 6–7 times the original size. In addition, it seems that reconstitution with a simple immune system does not limit this growth (Fig. 8B).

In contrast, in two groups of mice that received H-1 PV, we see indeed increased tumor size up to 20 days after treatment.

However, we showed that this growth does not exceed a maximum of three times the size of the primary tumor, as previously described in the work of Jean Rommelaere's team [34]. In addition and very interestingly, we observe that the size of these tumors stabilized to stay below the maximum threshold of 3.

Furthermore, we found a small decrease in tumor size in the group of mice reconstituted by human PBMC. This decrease in the presence of PBMC was reproducible. Unfortunately, the large variability in the initial tumor size did not allow us to validate statistically this decrease. In addition, we observed no tumor growth in all mice that had developed a very small tumor (difficult to measure) and who received H-1 PV regardless of immune reconstitution.

Discussion

Oncolytic viruses, such as H-1 parvovirus, are currently considered serious candidates for cancer therapy because they

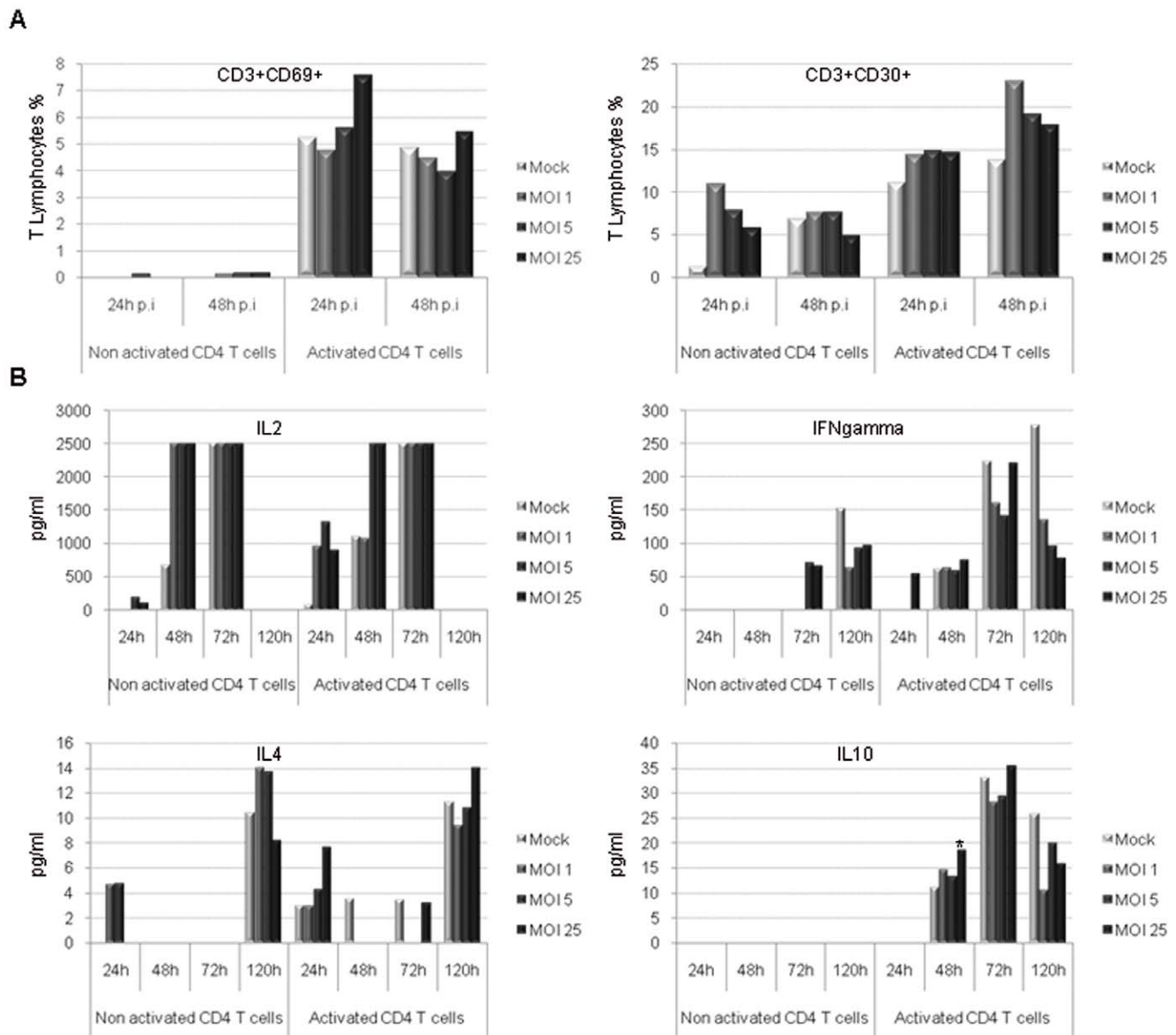


Figure 5. H-1 PV preserves or even enhances non-activated and activated CD4+ T cell secretion ability. CD4+ T cells were inoculated with increasing amounts of purified H-1 PV or mock-treated as described in Materials and Methods section. MOI : multiplicity of infection, expressed as the number of plate-forming unit/cell; p.i : post-infection. **A.** Early and late activation marker expression is increased at the surface of CD4+ T cells upon H-1 PV infection. In the course of infection, cells were collected, labelled for the expression of early (CD69) and late (CD30) activation markers and analyzed using flow cytometry. Results are expressed as percentages of activated cells within CD4+ T cell population. **B.** H-1 PV enhances CD4+ T cell ability to secrete Th1 and Th2 type cytokines. In the course of infection, culture supernatants were collected and tested for cytokine detection by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results are expressed in pg/ml as the mean of duplicate wells and after subtraction of the background value. Statistical analysis for 2 independent experiments was performed using a Mann-Whitney test (* $p < 0,05$ relative to Mock condition). Representative data from 2 independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0032197.g005

exhibit antitumor properties *in vivo* [2,4]. The immunomodulating potential of such anticancer agents could allow effective and less aggressive treatments to be developed. However, whether H-1 PV effects are also associated with the induction of specific immune responses that could potentiate its oncosuppressive properties remains to be defined. The present study shows for the first time that H-1 PV is able to directly induce an effective immune response, which could enhance antitumor immunity, in addition to its direct inherent oncolytic effect.

H-1 PV exerts several significant effects on PBMCs, but mostly when they are activated. Whether activated PBMCs are sensitive

to H-1 PV infection is a hard question to be answered, depending on the criteria to meet in order to satisfy this little-defined notion. Basically, our results emphasize three major points : i) H-1 PV induces some viral dose-dependent events : NS1 protein expression and a decrease in both activated PBMC viability and proliferation ability, ii) the infection is associated with cytolysis in a dose-independent manner, and iii) newly generated infectious particles were not detected. H-1 PV life cycle initiation relies on host cell ability to activate early P4 promoter which is known to drive NS1 protein expression [17]. This ability has been described to be mostly exerted by transformed cells as they exhibit a specific

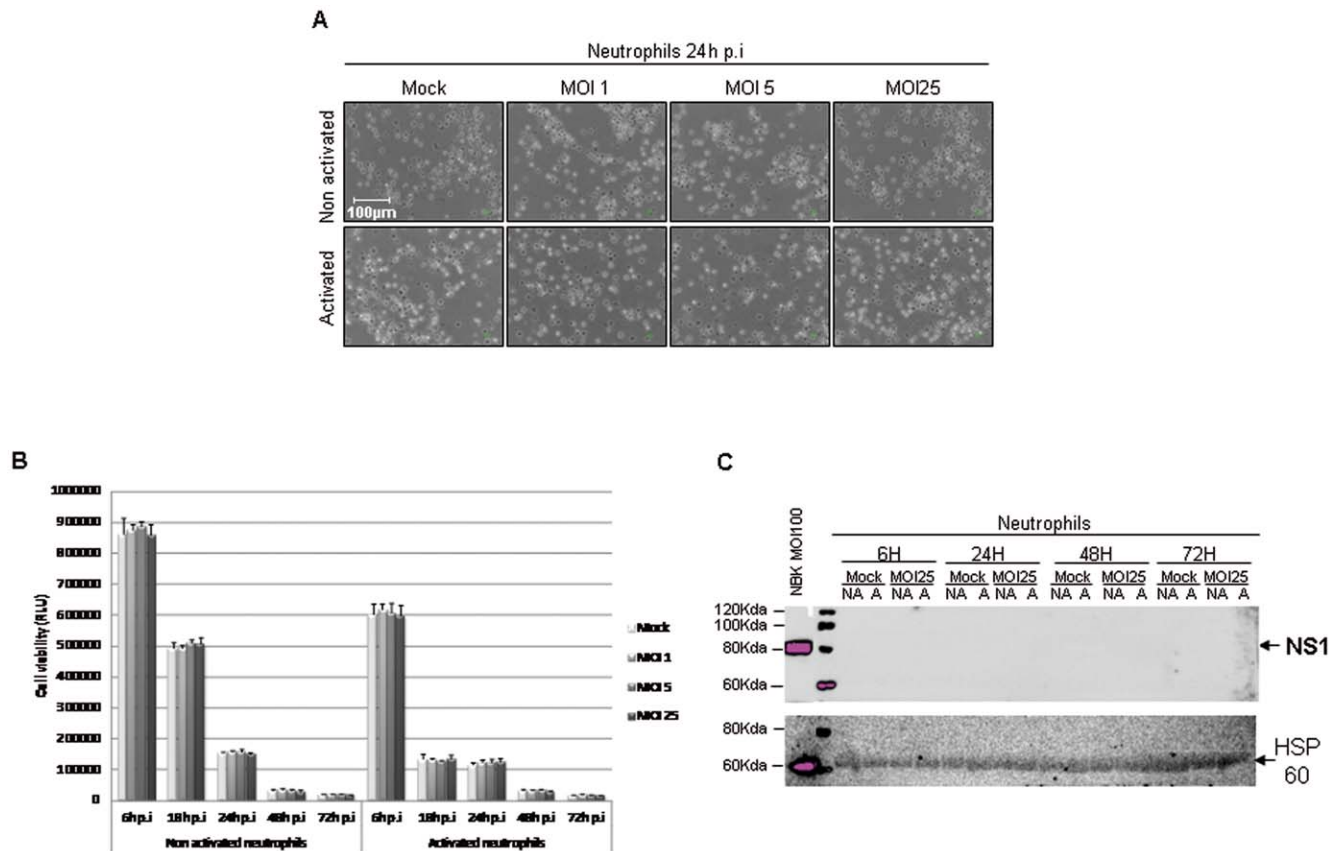


Figure 6. H-1 PV does not affect neutrophils viability. Human neutrophils cells were inoculated with increasing amounts of purified H-1 PV or mock-treated. MOI : multiplicity of infection, expressed as the number of plate-forming unit/cell; p.i : post-infection. **C.** Infection of Neutrophils by H-1 PV is not related to any morphological changes. For each condition, pictures of cells were taken in the course of infection but only those taken 48 h after H-1 PV inoculation are shown. Scale bar= 100 µm. **B.** H-1 PV does not affect Neutrophils viability. Cell viability was evaluated using a test based on a bioluminescent reaction measuring the amount of ATP present in living cells. 6 h, 18 h, 24 h, 48 h and 72 h p.i conditions are shown. Results are represented as means of triplicate wells with $\pm$ standard deviation bars and expressed in relative light unit (RLU). Representative data from 5 independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0032197.g006

expression pattern which is appropriate to achieve H-1 PV whole life cycle [18]. Nonetheless, NS1 protein detection proves that activated PBMCs allow viral life cycle to be initiated. Even though proliferating PBMCs are normal cells, our result is consistent with the fact that early steps of H-1 PV life cycle, notably P4 activation, are strongly dependent on host cell ability to enter S phase [19]. Moreover, strong ectopic NS1 protein expression has recently been reported to cause a significant decrease in normal human fibroblast viability [20], showing that transformation is not a compulsory requirement for NS1 to affect cells. This statement leads us to suggest that NS1 protein is responsible for PBMC viability impairment. The ability of infected, activated PBMC to proliferate also suffers a major decrease. This drop could result from NS1 protein ability to block cell cycle at G2 stage [14,21]. But this hypothesis cannot be validated for sure as we did not assess cell cycle progression. NS1 properties also result in H-1 PV cytotoxicity [14,22]. Even though PBMC lysis is clearly linked to the virus, the dose-independence of this phenomenon makes NS1 protein unlikely to be responsible for it. We suggest that both viability impairment and cytotoxicity should be uncoupled. In activated PBMCs, NS1 protein exerts probably more cytostatic than cytolytic properties while cell lysis would rather be an indirect effect occurring under any H-1 PV infection conditions and mediated by immune cells. In the context of cancer treatment,

cytolysis should not be considered insurmountable for H-1 PV to be used since this effect is only partial. Moreover, H-1 PV-induced impairments of human immune cells are observed in an *ex vivo* context. But in a living organism, a pool of haematopoietic stem cells continually renew them and would then also recover the cell loss due to H-1 PV infection. Besides, we did not detect any newly generated virions, which would allow the administration of the agent to be controlled in therapy. Further investigation would be necessary to determine which steps of H-1 PV life cycle activated PBMCs are not able to sustain. Because activated PBMCs display an appropriate environment for H-1 PV to exert some of its properties, they can be considered sensitive to the virus but only partly and in an abortive way since they do not achieve the whole viral life cycle. Despite these impairments, activated, H-1 PV-infected PBMCs get overactivated, as pointed out by the overexpression of CD69 and CD30. They also mostly keep, or even enhance, their cytokine secretion, mainly the Th1 pathway. This strongly suggests that H-1 PV is able to induce an effective immunological response without any other in-between stimulation.

In contrast to PBMCs, CD4+ T cells do not undergo any significant changes upon infection and thereby, are clearly resistant to H-1 PV despite slight NS1 synthesis. This suggests that a threshold has to be reached for NS1 to exhibit its properties and/or that NS1 required post translational modifications are not

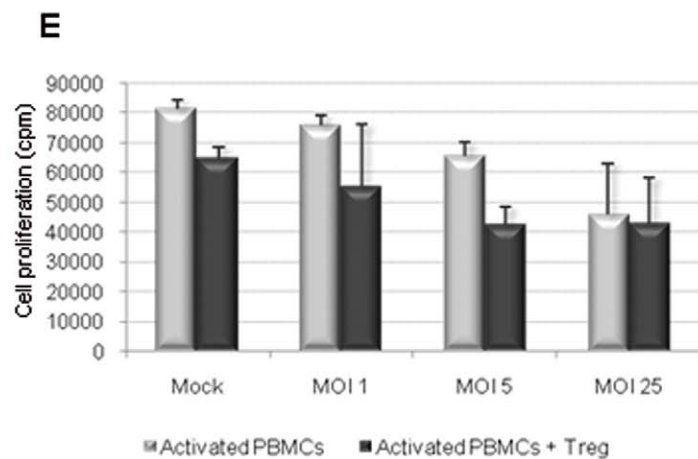
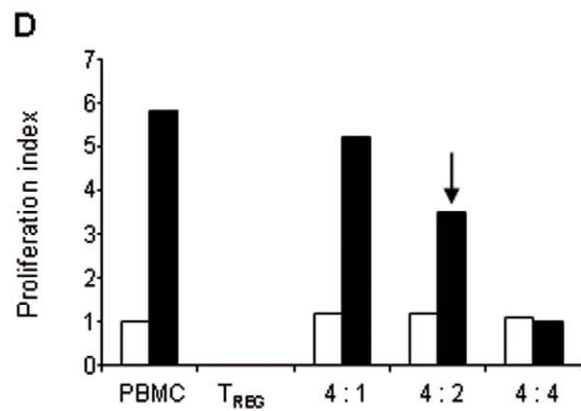
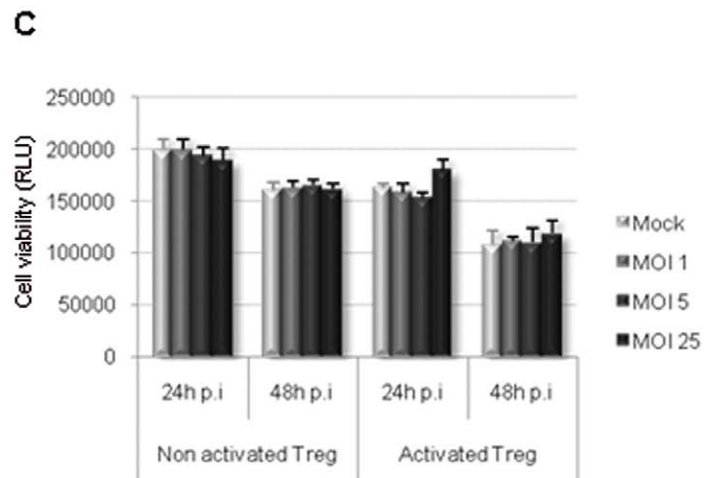
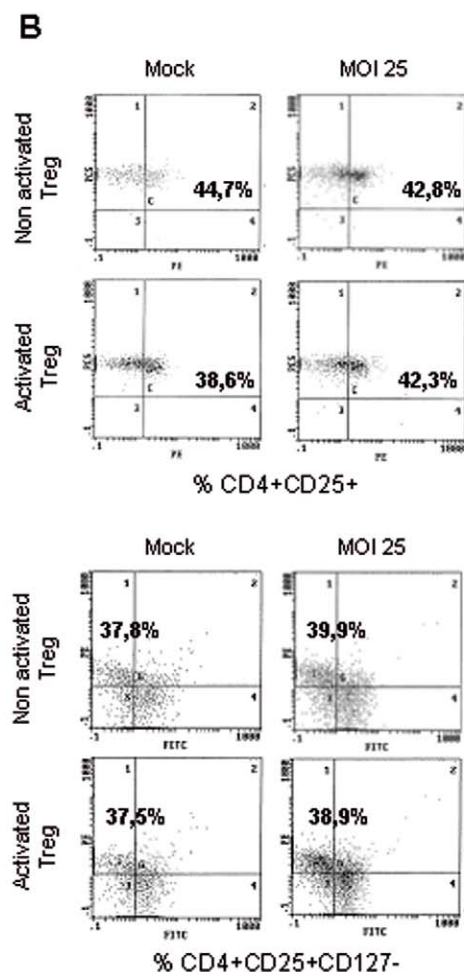
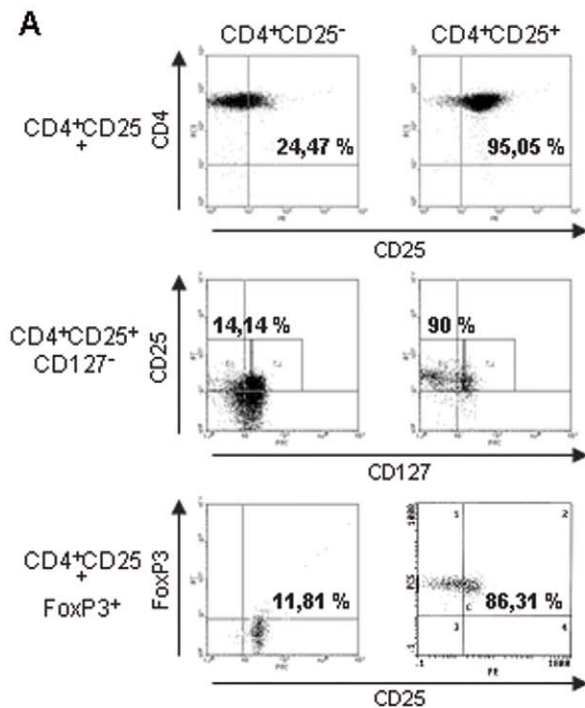


Figure 7. H-1 PV affects neither Treg cell phenotype nor viability while inhibiting their suppressive activity. Treg cells were inoculated with increasing amounts of purified H-1 PV or mock-treated. MOI : multiplicity of infection, expressed as the number of plate-forming unit/cell; p.i. : post-infection. **A. Control of Treg cell purity.** Cells were labelled for Treg cell markers and analyzed using flow cytometry. Results are expressed as percentages of CD4+CD25+, CD4+CD25+CD127- and CD4+CD25+FoxP3+ cells within the whole cell population. **B. Treg cells do not undergo any major phenotypical changes upon infection.** Cells were labelled for Treg cell markers and analyzed using flow cytometry 48 h p.i. Results are expressed as percentages of CD4+CD25+ and CD4+CD25+CD127- cells within the whole cell population. **C. H-1 PV does not affect Treg cell viability.** Cell viability was assessed 24 and 48 h p.i using a bioluminescent test measuring ATP amount in living cells. Results are represented as means of triplicate wells with $\pm$ standard deviation bars and expressed in relative light unit (RLU). **D. Ex vivo Treg cells are able to suppress autologous activated PBMCs proliferation.** Autologous PBMCs were activated (anti-CD3 and -CD28 antibodies) and cultured with increasing quantities of Treg cells. PBMCs proliferation was assessed by metabolic incorporation of tritiated thymidine into cellular DNA 48 h p.i. Results are represented as means of triplicate wells with $\pm$ standard deviation bars and expressed in count per minute (cpm). The black arrow indicates the ratio chosen for further experiments. **E. H-1 PV is able to inhibit Treg cell suppressive activity.** Autologous PBMCs were activated (anti-CD3 and -CD28 antibodies), cultured with Treg cells (4 PBMCs for 2 Treg cells) and mock- or H-1PV-treated. PBMC proliferation was assessed by metabolic incorporation of tritiated thymidine into cellular DNA 48 h p.i. Results are represented as means of triplicate wells with $\pm$ standard deviation bars and expressed in count per minute (cpm). Representative data from 3 independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0032197.g007

achieved [13,15,22,23]. Besides both unaltered viability and proliferation, CD4+ T cells remain or become activated and cytokine secretion-competent upon H-1 PV infection. Currently, CD4+ T cells are described as playing a key role in immune responses [24]. More particularly, CD4+ T helper responses (Th1 and Th2) are increasingly proving to mostly support antitumor immunity [25,26], which is what we reported upon H-1 PV infection. Indeed, IL-2 secretion increases and IFN- γ remains detectable, thus demonstrating that Th1 pathway is induced. This is of special significance because Th1 response is strongly involved in antitumor immunity [27] and usually associated with the activation of (i) the major effector cell subpopulation, namely CD8+ T cells and (ii) the commitment of CD4+T cell into cytotoxic T cells[24,28]. Even though CD8+ T cells seem to be targeted by H-1 PV within PBMCs, they are not totally cleared upon infection. We suggest that CD8+ T cell cytotoxic properties may be responsible for the cytolysis we reported on infected PBMCs. On the other hand, naive CD4+ T cells were very recently shown to be able to differentiate into Th1 cytotoxic T cells that display the remarkable ability to eradicate on their own an established human melanoma [29]. Thus, early IL-2 induction reported here might have induced IFN- γ release, and then CD4+ T cells to commit into effector T cells. This highlights another crucial aspect of CD4+ T cells in tumor clearance and their preserved functionality upon infection strengthens H-1 PV value as a promising candidate in anticancer therapy [27]. Besides its role in Th1 pathway and therefore antitumor immunity, IL-2 could also be used as a quantifiable biomarker of T cell activation. Such a sustained secretion of IL-2 could allow H-1 PV vaccination effect to be easily monitored using ELISA or ELISPOT assays [30]. Even though Th1 pathway is clearly the one to be focused on to target antitumor immunity, Th2 response is far from being insignificant and has been pointed out in anticancer therapy since specific antibodies can efficiently clear cancer cells [26,31,32]. Very interestingly, this pathway also seems to be initiated upon H-1 PV infection, as suggested by IL-4 release.

And very recently, in parallel with our *in vitro* study on human immune cells, Grekova S *et al* [33] aimed to establish whether immunomodulating mechanisms participate in the recently reported therapeutic potential of parvoviruses against pancreatic carcinoma in a rat model. In this work, they extended their study to pancreatic cancer and could show that this immunity can be further transferred to naïve tumor-bearing recipients. Recently they found that treatment of rat pancreatic tumors with H-1 PV resulted in the appearance of viral transcript in the PDAC (Pancreatic ductal adenocarcinoma)-draining celiac lymph nodes, with expression lasting up to 10 days post virus inoculation [34]. This involvement of lymphoid tissues in parvoviral oncosuppression is further sustained by their last study which showed that

intratumoral treatment of PADC with H-1 PV led to the enrichment of these tissues with T-cells, with bias toward a Th1 response as evidence by the marked induction of IFN- γ expression. Moreover, they observed a splenomegaly which seems to be in part related to a general lymphocyte proliferation reaction, in response to viral infection. All these results recently obtained, in a rat model of pancreatic cancer [33] are in agreement with our results. Dissecting in more details the relation between H-1PV and the human immune system led to the consistent finding that H-1 PV can cause an increase in the CD4/CD8 ration both in rats and humans and induce Th1 expression in both species. In addition, all the experiences we have made on neutrophils show that H1-PV has no deleterious effect on viability, proving that we can definitively exclude a negative effect of PVH-1 on neutrophils.

Immune cell infection by H-1 PV leads to the induction of events which are characteristic of a broad, complementary and effective antitumor response. However, such a response is likely to be countered by the concomitant involvement of immunoregulatory components. To investigate this aspect, we focused our attention on CD4+CD25+ regulatory T cells, which turn out to be the main mediators of active immune escape in cancer. In this context, Treg cells have been shown to play a major role in pathology progression as they are able to suppress antitumor immune response [11]. Thus, assessing Treg cells status has become a crucial point in the area of new clinical strategies development. Treg cell phenotype was not altered upon H-1 PV infection and neither was their proliferation nor viability, whether they are activated or not. Treg cells are known to be major producers of IL-10 which is notably the lead immunosuppressive cytokine [35]. Besides, experiments performed on activated PBMCs showed a significant dose-dependent increase in IL-10 release upon infection (Fig. 3). Yet, it cannot be attributed to Treg cells as H-1 PV does not modify their cytokine secretion pattern (data not shown). However, IL-10 is also involved in humoral immune response enhancement together with other cytokines *in vivo* and monocytes/macrophages are likely to secrete high amounts of IL-10 when they are stimulated [36]. Even though we did not study H-1 PV direct interplay with these cells, this hypothesis is consistent with the fact that Th1 type cytokines are induced upon infection, possibly leading to monocyte/macrophage activation. Moreover, Treg cell inoculation with high amounts of virus seems to impair Treg cell ability to suppress PBMC proliferation. Then, it is tempting to assume that in an *in vivo* context, H-1 PV would not only be able to induce an effective immune response but also prevent the immunosuppressive tumor microenvironment from getting worse.

Concerning the results obtained in our *in vivo* model, they allow us to conclude that H-1 PV is able to slow down and stabilize the growth of nasopharyngeal carcinoma when injected in large

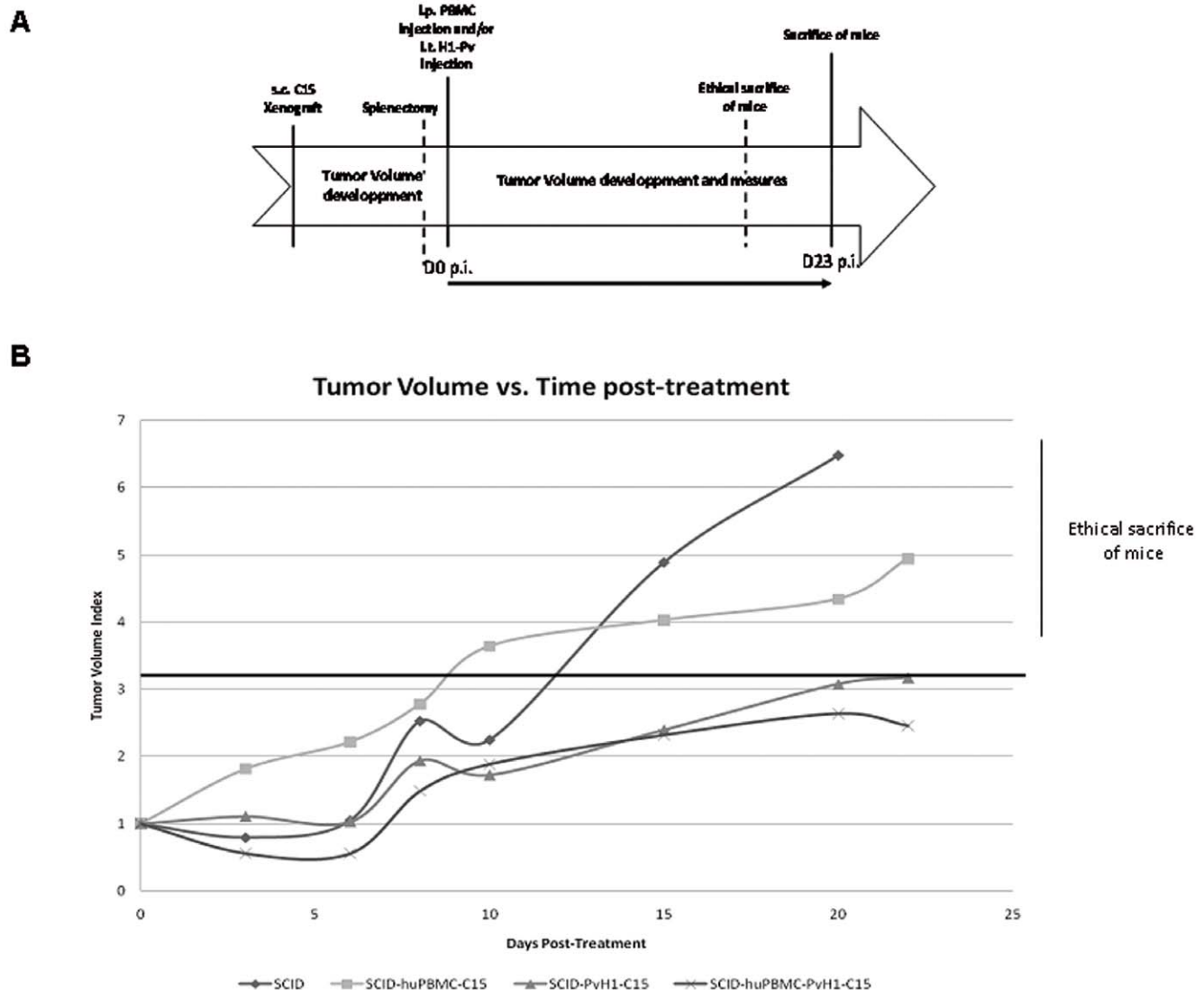


Figure 8. H-1 PV is able to slow down and stabilize the growth of nasopharyngeal carcinoma in humanized SCID mice. Immunodeficient SCID mice (Severe combined Immunodeficiency) were subcutaneously xenotransplanted with tumors of nasopharyngeal carcinoma (NPC) induced by C15 cells (human primary tumor cells of NPC). **A.** Timeline which summarizes the experimental protocol followed. After development of visible tumors, SCID mice were splenectomized and reconstituted (i.p) or not with $50 \cdot 10^6$ human PBMC. At the same moment they also received or not H-1PV directly injected within the tumor. SCID mice received only one injection of H-1 PV throughout the protocol. **B.** Results are presented in Tumor Volume Index versus days post-treatment. There is a progressive increase in tumor size for the four groups of mice. Only the groups, which did not receive H-1 PV, saw their tumors grow to 6–7 times the original size. **H-1 PV stabilize the growth of nasopharyngeal carcinoma in humanized SCID mice.** In two groups of mice that received H-1 PV, the growth of the tumor does not exceed a maximum of three times the size of the primary tumor. The size of these tumors stabilized to stay below the maximum threshold of 3. *Representative data from 2 independent experiments.*

doi:10.1371/journal.pone.0032197.g008

tumors (13 mm^3 to 210 mm^3). While it completely prevents tumor growth when injected in the early stages of tumor development (tumor not measurable).

Regarding the addition of an immune system in this model, it appears that the PBMC are able to improve slightly decreased tumor growth. However, this small but reproducible non-significant decrease is not sufficient to conclude that the activation of CD4⁺ T induced by H-1 PV promotes the onco-suppressor effect of this oncolytic virus. In contrast, activation of CD4⁺ T can have an important complementary role in the anti-tumor response. Indeed, it is well known that activated CD4⁺ T can promote dialogue between immune cells of the innate or adaptive

immunity, including the expansion of memory clones, lytic mechanisms or induction of apoptotic mechanisms.

In conclusion, our results show for the first time that H-1 parvovirus displays a cytostatic and cytolytic effect on some immune cells subsets, mostly upon activation conditions, while preserving and directly activating crucial CD4⁺ T cells after a single inoculation. Our approach is also particularly original since no study in the field of parvovirotherapy has been focused on the key aspect of immunosuppression for which we did not evidence any sign of activation upon H-1 PV infection. Therefore, our study proposes an optimal way of testing and proving H-1 PV remarkable immunomodulating properties. With this regard, H-

1 oncolytic parvovirus perfectly meets the criteria for the use of a virus as an anticancer treatment.

Materials and Methods

Cells

Blood cells were isolated from 17 healthy donors. Each donor is associated to one particular cell population, except for 3 of them whose PBMCs as well as CD4⁺ T cells were isolated.

PBMC isolation. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) from healthy donors were isolated by standard density gradient centrifugation using Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Donor blood was provided by the Etablissement Français du Sang – Nord de France (EFS), in accordance with the official ethics agreement between the latter and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) – Délégation Nord Pas-de-Calais et Picardie. The study was approved by the Institut de Biologie de Lille (CNRS) and EFS Institutional Review Boards, and informed consent was obtained in writing for each donor. When appropriate, CD4⁺ T cell and CD4⁺CD25⁺ cell isolation was further performed.

CD4⁺ T cell isolation. CD4⁺ T cells were isolated from PBMCs using a negative selection protocol according to manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Berlin, Germany). Briefly, PBMCs are incubated for 10 minutes with a cocktail of biotinylated antibodies directed against CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ and glycophorin A. Anti-biotin magnetic beads are then added for 15 minutes. Undesired cells are magnetically retained in a Magnetic-Activated Cell-Sorting (MACS[®]) column placed in a MACS[®] separator. The target cells pass through the column and are collected as the enriched, unlabeled, cell fraction, depleted of non-target cells. Flow cytometric analysis shows that more than 98% of the isolated cells are CD4⁺ cells.

Regulatory T cell isolation. Human regulatory T cells (Treg) isolation was performed using the CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell Isolation kit (Miltenyi Biotec), according to manufacturer's instructions. Briefly, PBMCs and then CD4⁺ T cells are isolated as described above. Target cells, namely CD4⁺CD25⁺ cells, are then labelled with anti-CD25 beads. Cells are magnetically separated in a MACS[®] column placed in a MACS[®] separator. The flow-through fraction can be collected as negative fraction depleted of the labeled cells. The latter step is repeated once to enhance the yield and purity of the expected cell fraction. Flow cytometric analysis shows that more than 95% of the isolated cells are CD4⁺CD25⁺ cells.

Neutrophils isolation. For all the experiments performed, human neutrophils were isolated from healthy donors' blood. Whole blood is first centrifuged to remove platelet-rich serum. The fraction containing the red blood cells, neutrophils and eosinophils were isolated by standard density gradient centrifugation using Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). From that point, immediately place the aliquots on ice. Then, the fraction is subjected to a lysis buffer (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM, EDTA 0.1 mM) to remove red blood cells using a standard protocol. After 15 min on ice, cells were again centrifuged and the pellet was washed 3 times with PBS. Quality control is performed by cell counting after classical staining (Eosin; Methylene blue). And finally, the percentage of neutrophils was evaluated by light microscopy. Only preparations containing more than 95% of neutrophils were used. For subsequent analysis, isolated neutrophils cells were LPS-activated or not (1 μ g/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and inoculated with increasing amounts of purified H-1 PV (MOI 1, 5 and 25) or mock-treated from 24 h to 72 h.

Cell culture conditions. RPMI 1640 medium (Invitrogen, Paisley, UK) supplemented with 10% human AB serum (BioWest, Nuaillé, France), 2 mM L-Glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM non essential amino acids, 10 mM HEPES, 50 U/mL streptomycin, 50 μ g/mL gentamycin and 50 μ M β -mercaptoethanol was used as standard culture medium. Cells were incubated at 37°C under controlled atmosphere (5% CO₂ and 95% humidity) in a Hera Cell 150 incubator (Thermo Electron, Cergy Pontoise, France). When appropriate, PBMCs were activated using PHA (5 μ g/mL). For CD4⁺ T cells activation, anti-CD3 (1,5 μ g/mL) (Clinisciences, Montrouge, France) antibody was plate-bound by a 2 hours incubation at 37°C before the cultivation and soluble anti-CD28 antibody (100 ng/mL) (Clinisciences) was added extemporaneously.

Flow cytometry

Cell immunophenotype was analyzed using EPICS[®] XL-MCL cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) powered by EXPO 32 software. Cells were harvested, washed with phosphate-buffer saline (PBS) (Invitrogen) and labelled with appropriate fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (mAbs). Isotypic control mAbs were systematically used for markers setting. Data were analyzed and represented using Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry Software (WinMDI) (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

Monoclonal antibodies (mAbs) directed against the relevant cell surface antigens were used to characterize main cells populations (PBMCs), cell activation status (PBMCs and CD4⁺ T cells) or cell phenotype (Treg cells). Anti-CD3-phycoerythrin(PE)-cyanin(Cy)5-mAb (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) was used to discriminate T cells from non T cells. Within T cells, anti-CD8-PE-mAb (Immunotech, Marseille, France) and anti-CD4-fluorescein isothiocyanate (FITC) or -PE-mAb (Immunotech) were respectively used to discriminate CD8 from CD4 populations. Within non T cells, anti-CD56-PE-mAb (BD Pharmingen) and anti-CD19-PE-mAb (BD Pharmingen) were respectively used to discriminate NK cells from B lymphocytes. Anti-CD4-PC5-mAb (BD Pharmingen), anti-CD25-PE-mAb (Miltenyi Biotec) and anti-CD127-FITC-mAb (Clinisciences) were used to characterize Treg cells phenotype. Finally, anti-CD30-PE-mAb (Immunotech) and anti-CD69-FITC-mAb (BD Pharmingen) were respectively used as late and early activation markers.

Virus production and quantification, and cell infections

Briefly, NB-324K cells were transfected according to manufacturer's instructions using ExGen 500 transfection reagent (Euro-medex, Souffelweyersheim, France) with a plasmid containing wild-type H-1 PV genome (pSR19, kindly provided by Pr. Jean Rommelaere, Heidelberg, Germany) [37] and allowing infectious viral particles to be generated. Cells were harvested 6 days after transfection by scraping, pelleted and lysed in 50 mM Tris-HCl/0,5 mM EDTA (pH 8,7) by two "freezing and thawing" cycles. Cell debris were removed by centrifugation and supernatant was collected for virus quantification (see below). MOLT 4 cells (ATCC CRL-1582TM) were then infected with NB-324K-generated H-1 PV (Multiplicity of Infection or MOI=0,01; expressed as the number of plate-forming unit/cell) for 3 days in order to produce large amounts of virus. Newly generated virions were collected as mentioned above and purified by iodixanol gradient centrifugation as previously described [38]. H-1 PV stock was quantified using Tissue Culture Infectious Dose 50 (TCID₅₀) method. Briefly, NB-324K cells were seeded in 96-well plates and infected with serial dilutions of virus at the rate of 10 wells per dilution. Cells were incubated at 37°C (95% humidity, 5% CO₂)

for 4 days and then stained with Giemsa solution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Virus titers were calculated according to Reed and Muench method (1938). Part of the stock was UV-treated to inactivate virions and be used as a control. Cells (PBMCs, CD4⁺ T cells or Treg cells) were infected at various multiplicities of infection (MOI 1, 5 and 25). After cells cultivation (10^6 cells/mL, whatever the cell culture tool is) and, if necessary, activation, virus was added at the rate of 10% of culture medium volume to allow proper spread and favor contact between cells and virus. A part of cells was also treated with PBS-MK, iodixanol or irradiated H-1 PV as controls. The inocula were not removed from cells. Iodixanol condition is further mentioned as “Mock”.

Cell proliferation assay

Cells were incubated with [methyl-³H]-thymidine for the last 18 hours of culture and harvested on glass fibre filter (Printed Filtermat A, Wallac, Turku, Finland) using Tomtec harvester (Wallac). The filter was then sealed in a sample bag after drying and addition of scintillation liquid (Beckman Coulter). Radioactive thymidine, incorporated into replicated cellular DNA by proliferative cells, was detected by scintillation counting using a 1450 Trilux β -counter (Wallac) and measured in count per minute (cpm). Results are expressed as means of triplicate wells.

Cell viability and cytotoxicity assays

In the course of infection, both cell viability and lysis were assessed using respectively CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability assay and CytoTox-Glo Cytotoxicity assay according to manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI, USA). The former measures the amount of ATP present in living cells and the latter evaluates the leak of a cellular marker from lysed cells cytoplasm to culture medium. Data were achieved using Centro LB 960 plate luminometer (Berthold, Thoiry, France) powered by MikroWin 2000 Software. Results are expressed in relative light unit (RLU) as means of triplicate wells.

Cytokine detection

Culture supernatants were tested for cytokine detection by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) method as previously described [39]. For each cytokine, the culture supernatant from about 10^5 cells was used. In this study, IL-2, IL-4, IFN- γ and IL-10 release was investigated using sandwich ELISA based on colorimetric quantification. Antibodies pairs and standards were purchased at BD-Pharmingen. $A_{492\text{ nm}}$ was measured using a multichannel spectrophotometer (Multiskan EX powered by Ascent Software, Thermo Electron). Results were expressed as means of duplicate wells.

Western blotting

In the course of infection, cells were scraped directly in culture medium and washed with PBS. Cell pellets were then lysed (10 minutes on ice) in PY buffer consisting of 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.02% sodium azide and a cocktail of proteases inhibitors (Roche, Basel, Switzerland). Cell debris were removed (20000 g, 15 minutes, 4°C), supernatants were collected and protein concentrations were measured using Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) according to manufacturer's instructions. Total cell extracts (20 μ g) were then analyzed by Western blotting. First, proteins were separated by SDS-PAGE electrophoresis using gradient pre-casts gels (4–12% gradient, Bis-Tris) (Invitrogen) and then transferred onto PVDF membrane (Millipore, Molsheim, France). The latter was blocked for 1 hour at room temperature in

blocking buffer containing 0.2% AuroraTM blocking reagent (MP Biomedicals, Illkirch Graffenstaden, France), 0.1% Tween20 (Sigma-Aldrich) and PBS (1 $\times$), and incubated overnight at 4°C with primary antibodies directed against : NS1 protein (SP8 rabbit serum, 1:5000) (Faisst et al., 1995), cleaved caspase 3 (1:1000) (D175, 5AE1, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), PARP (1:1000) (H-250, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), β -actin (1:5000) (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology) and Erk2 (1:1000) (sc-154, Santa Cruz Biotechnology). Membranes were washed with blocking buffer, incubated for 1 hour at room temperature with peroxidase-conjugated secondary antibodies (anti-mouse and anti-rabbit, 1:10000) (GE Healthcare, Wauwatosa, WI, USA) and washed again with blocking buffer. Specific protein signals were visualized using Western Lightning[®] Plus-ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate kit (PerkinElmer, Boston, MA, USA).

Regulatory T cell functionality assay

Mixed Leukocyte Reaction (MLR) assays were performed to test Treg cell ability to either proliferate under activation conditions or inhibit autologous PBMCs proliferative response. Autologous PBMCs, Treg cells or both cell types were cultured in round-bottom 96-well plates for 48 h. When appropriate, anti-CD3 (1.5 μ g/mL) antibody was plate-bound by a 2 hour-incubation at 37°C before the cultivation and soluble anti-CD28 antibody (100 ng/mL) (Clinisciences) was added extemporaneously and/or cells were inoculated with H-1 PV as mentioned above. Cell proliferation was then assessed as described above. Results are expressed as means of triplicate wells.

SCID Mice model

Animals. Homozygous CB-17 *scid/scid* (SCID) mice derived from breeding stocks provided by Dr M. Liberman (Stanford University, Stanford, CA), with the permission of Dr M. Bosma (Fow Chase Cancer Center, Philadelphia, PA), were bred and maintained in microisolator cages and used between 4 and 8 wk of age. The mice were kept under pathogen-free conditions without prophylactic administration of antibiotic.

Tumor xenotransplantation. Briefly, anesthetized mice were prepared for xenotransplantation by shaving the hair from a 2-cm² area. Mice were subcutaneously xenotransplanted with nasopharyngeal carcinoma (NPC) tumors induced by C15 cells (Human primary tumor cells of NPC). The protocol was approved by the local Ethical Committee of the “Institut Pasteur de Lille”.

Human PBMC reconstitution. We waited for the development of visible tumors (about 6 to 8 weeks) before mice were splenectomized and reconstituted or not with human PBMC on day 0 (intraperitoneal injection of 50.10^6 PBMC isolated from blood of healthy donor).

H-1 PV challenge. On day D0, the mice also received or not H-1 PV which is directly injected within the tumor (approximately 10 injection points for a final estimated concentration of MOI 0.1). Throughout the protocol mice received only one injection of H-1 PV.

Regular measurements of the tumor were performed from the immune reconstitution and H-1 PV challenge (at D3, D7, D9, D11, D15, D20, D22 and D23). During this period, some mice had to be sacrificed for ethical reasons. Finally, all mice were sacrificed at D23.

Under this experimental protocol, we made four separate groups of mice: (i) A control group of C15 xenotransplanted SCID mice which received neither PBMCs nor H-1 PV ($n = 5$); (ii) A group of xenotransplanted SCID mice receiving only PBMC ($n = 5$); (iii) A group of xenotransplanted SCID mice receiving only

H-1 PV (n = 5); (iv) A group of xenotransplanted SCID mice receiving both PBMC and H-1 PV (n = 5).

Statistical analysis

The relevance of the results was validated using the statistical rank sum Mann-Whitney test with Sigma-stat software.

References

- Kirn D, Martuza RL, Zwiebel J (2001) Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions. *Nat Med* 7: 781–787.
- Moehler M, Blechacz B, Weiskopf N, Zeidler M, Stremmel W, et al. (2001) Effective infection, apoptotic cell killing and gene transfer of human hepatoma cells but not primary hepatocytes by parvovirus H1 and derived vectors. *Cancer Gene Ther* 8: 158–167.
- Kirn DH, Thorne SH (2009) Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nat Rev Cancer* 9: 64–71.
- Rommelaere J, Cornelis JJ (1991) Antineoplastic activity of parvoviruses. *J Virol Methods* 33: 233–251.
- Thorne SH, Kirn DH (2004) Future directions for the field of oncolytic virotherapy: a perspective on the use of vaccinia virus. *Expert Opin Biol Ther* 4: 1307–1321.
- Toda M, Rabkin SD, Kojima H, Martuza RL (1999) Herpes simplex virus as an in situ cancer vaccine for the induction of specific anti-tumor immunity. *Hum Gene Ther* 10: 385–393.
- Muharram G, Le Rhun E, Loison I, Wizla P, Richard A, et al. (2010) Parvovirus H-1 induces cytopathic effects in breast carcinoma-derived cultures. *Breast Cancer Res Treat* 121: 23–33.
- Moehler MH, Zeidler M, Wilsberg V, Cornelis JJ, Woelfel T, et al. (2005) Parvovirus H-1-induced tumor cell death enhances human immune response in vitro via increased phagocytosis, maturation, and cross-presentation by dendritic cells. *Hum Gene Ther* 16: 996–1005.
- Raykov Z, Grekova S, Galabov AS, Balboni G, Koch U, et al. (2007) Combined oncolytic and vaccination activities of parvovirus H-1 in a metastatic tumor model. *Oncol Rep* 17: 1493–1499.
- Geletnek K, Kiprianova I, Ayache A, Koch R, Herrero YCM, et al. (2010) Regression of advanced rat and human gliomas by local or systemic treatment with oncolytic parvovirus H-1 in rat models. *Neuro Oncol* 12: 804–814.
- Nishikawa H, Sakaguchi (2010) S Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer* 127: 759–767.
- Nomura T, Sakaguchi S (2005) Naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cells in tumor immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 293: 287–302.
- Daeflter L, Horlein R, Rommelaere J, Nuesch JP (2003) Modulation of minute virus of mice cytotoxic activities through site-directed mutagenesis within the NS coding region. *J Virol* 77: 12466–12478.
- Hristov G, Kramer M, Li J, El-Andaloussi N, Mora R, et al. (2010) Through its nonstructural protein NS1, parvovirus H-1 induces apoptosis via accumulation of reactive oxygen species. *J Virol* 84: 5909–5922.
- Nuesch JP, Lachmann S, Corbau R, Rommelaere J (2003) Regulation of minute virus of mice NS1 replicative functions by atypical PKC λ in vivo. *J Virol* 77: 433–442.
- Wilczynski JR, Radwan M, Kalinka J (2008) The characterization and role of regulatory T cells in immune reactions. *Front Biosci* 13: 2266–2274.
- Rhode SL (1985) trans-Activation of parvovirus P38 promoter by the 76K noncapsid protein. *J Virol* 55: 886–889.
- Cornelis JJ, Spruyt N, Spegelaere P, Guetta E, Darawshi T, et al. (1988) Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by parvovirus minute virus of mice correlates with an increase in viral gene expression. *J Virol* 62: 3438–3444.
- Deleu L, Pujol A, Faisst S, Rommelaere J (1999) Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus minute virus of mice at early S phase is required for productive infection. *J Virol* 73: 3877–3885.
- Wizla P, Begue A, Loison I, Richard A, Caillet-Fauquet P, et al. (2010) Ectopic expression of H-1 parvovirus NS1 protein induces alterations in actin filaments and cell death in human normal MRC-5 and transformed MRC-5 SV2 cells. *Arch Virol* 155: 771–775.
- Op De Beeck A, Anouja F, Mousset S, Rommelaere J, Caillet-Fauquet P (1995) The nonstructural proteins of the autonomous parvovirus minute virus of mice interfere with the cell cycle, inducing accumulation in G2. *Cell Growth Differ* 6: 781–787.
- Caillet-Fauquet P, Perros M, Brandenburger A, Spegelaere P, Rommelaere J (1990) Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. *EMBO J* 9: 2989–2995.
- Lachmann S, Rommelaere J, Nuesch JP (2003) Novel PKC ϵ is required to activate replicative functions of the major nonstructural protein NS1 of minute virus of mice. *J Virol* 77: 8048–8060.
- Wang RF (2001) The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity. *Trends Immunol* 22: 269–276.
- Reilly RT, Emens LA, Jaffee EM (2001) Humoral and cellular immune responses: independent forces or collaborators in the fight against cancer? *Curr Opin Investig Drugs* 2: 133–135.
- Wan YY (2010) Multi-tasking of helper T cells. *Immunology* 130: 166–171.
- Ostrand-Rosenberg S (2005) CD4+ T lymphocytes: a critical component of antitumor immunity. *Cancer Invest* 23: 413–419.
- Wang RF (2003) Identification of MHC class II-restricted tumor antigens recognized by CD4+ T cells. *Methods* 29: 227–235.
- Xie Y, Akpinarli A, Maris C, Hipkiss EL, Lane M, et al. (2010) Naive tumor-specific CD4(+) T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma. *J Exp Med* 207: 651–667.
- Zhang W, Caspell R, Karulin AY, Ahmad M, Haicheur N, et al. (2009) ELISPOT assays provide reproducible results among different laboratories for T-cell immune monitoring-even in hands of ELISPOT-inexperienced investigators. *J Immunotoxicol*.
- Penault-Llorca F, Etessami A, Bourhis J (2002) [Principal therapeutic uses of monoclonal antibodies in oncology]. *Cancer Radiother* 6 Suppl 1: 24s–28s.
- White CA, Weaver RL, Grillo-Lopez AJ (2001) Antibody-targeted immunotherapy for treatment of malignancy. *Annu Rev Med* 52: 125–145.
- Grekova S, Aprahamian M, Giese N, Schmitt S, Giese T, et al. (2011) Immune cells participate in the oncosuppressive activity of parvovirus H-1PV and are activated as a result of their abortive infection with this agent. *Cancer Biol Ther* 10: 1280–9.
- Angelova AL, Aprahamian M, Grekova SP, Hajri A, Leuchs B, et al. (2009) Improvement of gemcitabine-based therapy of pancreatic carcinoma by means of oncolytic parvovirus H-1PV. *Clin Cancer Res* 15: 511–9.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19: 683–765.
- Saraiva M, O'Garra A (2010) The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 10: 170–181.
- Faisst S, Faisst SR, Dupressoir T, Plaza S, Pujol A, et al. (1995) Isolation of a fully infectious variant of parvovirus H-1 supplanting the standard strain in human cells. *J Virol* 69: 4538–4543.
- Zolotukhin S, Byrne BJ, Mason E, Zolotukhin I, Potter M, et al. (1999) Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* 6: 973–985.
- Depil S, Morales O, Castelli FA, Delhem N, Francois V, et al. (2007) Determination of a HLA II promiscuous peptide cocktail as potential vaccine against EBV latency II malignancies. *J Immunother* 30: 215–226.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: OM AR NM PCF YdL ND. Performed the experiments: OM AR NM DM CM MS. Analyzed the data: OM AR PCF JR VP YdL ND. Contributed reagents/materials/analysis tools: OM NM. Wrote the paper: OM AR ND. H-1 PV strain provider: JR.

Article 7

ARTICLE 7

Etude de Cas : Surexpression des marqueurs spécifiques des lymphocytes T régulateurs de type 1 (Tr1) chez un patient porteur d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) consécutive à une cirrhose C.

A Case Report: Overexpression of Regulatory T Cells Type 1 (Tr1) Specific Markers in a Patient with HCV-Induced Hepatocellular Carcinoma:

ISRN Hepatology Volume 2013 (2013), Article ID 928485

Laurissa Ouaguia*, Olivier Morales*, Dhafer Mrizak, Khaldoun Ghazal, Emmanuel Boleslawski, Claude Auriault, Véronique Pancré, Yvan de Launoit, Filoména Conti and Nadira Delhem.

* Co-premier auteur

Contexte et objectif de l'étude :

Le virus de l'hépatite C (VHC) est un agent causal important dans les pathologies du foie, mais les facteurs qui déterminent la résolution ou la progression de l'infection sont encore mal compris.

Dans cette étude, nous suggérons que l'existence de mécanismes immunosuppresseurs, médiée par les lymphocytes T régulateurs (Treg) et plus particulièrement par les T régulateurs induits (Tr1), pourrait expliquer l'inhibition de la réponse immunitaire durant l'infection et pendant l'évolution de la fibrose vers le carcinome hépatocellulaire (CHC).

Méthodes :

Nous avons exploré, par PCR quantitative en temps réel, la présence intrahépatique des cellules Tr1 dans les biopsies d'un patient chroniquement infecté par un VHC de génotype 1b et ayant évolué vers des lésions d'hépatite chronique active, puis vers la cirrhose et jusqu'au carcinome hépatocellulaire (CHC). Nous disposons pour ce patients d'une série de biopsies hépatiques, faites à l'aiguille, effectuée sur une période de 18 ans allant de l'infection chronique jusqu'au CHC. Malgré un recueil précieux de ces biopsies, leur petite taille (1.3 mm de diamètre) ne nous a pas permis de réaliser des analyses en immunohistochimie. Ainsi, la recherche des Tr1 s'est basée sur l'analyse par Q-PCR de l'expression des marqueurs spécifiques et associés à cette sous-population régulatrice.

Principaux résultats :

Dans un premier temps, nous avons confirmé des travaux antérieurs faits au laboratoire (Delhem et al, Bull cancer 2008) et montré, chez ce patient suivi, une augmentation significative de l'expression des marqueurs associés à une sous-population de lymphocytes T

régulateurs dit naturels (CD4, CD25, ICAM1). De façon intéressante, nous avons également montré une sur-expression des marqueurs spécifiques de la sous-population induite Tr1 (CD49b, CD18). Cette

augmentation est proportionnelle à l'évolution de l'histoire naturelle de la maladie. Ces résultats ont été corrélés à une augmentation, dans les stades avancés de la fibrose et dans le CHC, de l'expression des cytokines immunosuppressives majeures associées aux Tr1 (IL-10 et TGF- β). Par ailleurs, l'augmentation de l'expression des récepteurs à l'IL-10 (IL-R α et IL-10 R β) et au TGF- β (TGF- β RII) suggèrent l'existence d'une bio-disponibilité à ces cytokines plus importante dans le foie cirrhotique et tumoral.

Conclusion :

En conclusion, le recrutement intrahépatique des lymphocytes T régulateurs (naturels et induits) au stade de la cirrhose C et du CHC, pourrait favoriser un échappement du virus et des cellules tumorales au système immunitaire et favoriser ainsi la progression de la maladie hépatique.

Research Article

Overexpression of Regulatory T Cells Type 1 (Tr1) Specific Markers in a Patient with HCV-Induced Hepatocellular Carcinoma

Laurissa Ouaguia,¹ Olivier Morales,¹ Dhafer Mrizak,¹ Khaldoun Ghazal,² Emmanuel Boleslawski,^{1,3} Claude Auriault,¹ Véronique Pancré,¹ Yvan de Launoit,¹ Filoména Conti,^{2,4} and Nadira Delhem¹

¹ CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59021 Lille Cedex, France

² UPMC Université Paris 6, Inserm, UMR-S938, Centre de Recherche Saint Antoine, 75012 Paris, France

³ Service de Chirurgie Digestive et Transplantations, Hôpital Huriez, CHU, Université Nord-de-France, 59000 Lille, France

⁴ Centre de Transplantation Hépatique, Pôle Digestif, APHP, Hôpital Saint Antoine, 184 rue de Faubourg Saint Antoine, 75012 Paris, France

Correspondence should be addressed to Nadira Delhem; nadira.delhem@ibl.fr

Received 27 June 2013; Accepted 24 July 2013

Academic Editors: D. Capone, A. Castiella, and O. Topcu

Copyright © 2013 Laurissa Ouaguia et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Hepatitis C virus (HCV) is an important causative agent of liver disease, but factors that determine the resolution or progression of infection are poorly understood. In this study, we suggested that existence of immunosuppressive mechanisms, supported by regulatory T cells and especially the regulatory T cell 1 subset (Tr1), may explain the impaired immune response during infection and thus the fibrosis aggravation to hepatocellular carcinoma (HCC). Using quantitative real-time PCR, we investigated the intra-hepatic presence of Tr1 cells in biopsies from a genotype 1b infected patient followed for an 18-year period from cirrhosis to HCC. We described a significant increase of gene expression in particular for the cytokines IL-10, TGF- β , and their receptors that were perfectly correlated with an increased expression of the Tr1 specific markers (combined expression of CD4, CD18, and CD49b). This was strongly marked since the patient evolved in the pathology and could explain the failure of the treatment. In conclusion, evidence of regulatory T cell installation in the liver of chronically infected patient with cirrhosis and HCC suggests for the first time a key role for these cells in the course of HCV infection.

1. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) is a parentally transmitted hepatotropic RNA virus that causes chronic hepatitis, which may lead to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) [1]. Evidence suggests that clearance and control of HCV infection during acute phase is dependent on vigorous and multi-specific CD4 and CD8 T lymphocyte responses [2, 3]. On the contrary, the development and maintenance of chronic infection is linked to weak or absence of HCV-specific Th1 response and to the presence of Th2 cytokines (IL-4 and IL-10) [4, 5]. So, some studies have implicated IL-10 in HCV pathogenesis [4, 6]. Regulatory T cell 1 (Tr1) was first described in 1996 [7, 8] as a further subtype of CD4 T cells,

without specific markers but with cytokine profile distinct from that of Th1 or Th2 cells. Indeed, they were shown as secreting high level of IL-10, moderate levels of IFN- γ and IL-5, quite undetectable IL-4, and low amounts of transforming growth factor (TGF- β). Recent studies have suggested that Tr1 could be induced against bacterial, viral and parasite antigens *in vivo* and might prevent infection-induced immunopathology or prolong pathogen persistence by suppressing protective Th1 response [9, 10] but has never been directly implicated in hepatitis C viral pathogenesis. The dysfunction of the immune response against HCV could be explained by immunosuppressive mechanisms supported by Tr1 via their high production of IL-10. The recent

identification of combined expression of CD4, CD18 (integrin $\alpha 2$), and CD49b (integrin $\beta 2$) as specific markers for Tr1 cells should facilitate their characterization *in vivo* [11]. An increased frequency of Tregs was recently described in the blood of patients with persistent HCV infection when compared with those who had cleared HCV [12, 13]. It has been proposed that Tregs contribute to HCV persistence by suppressing HCV-specific T-cell responses [14, 15]. Some studies have shown a correlation between a reduced HCV-specific T-cell response and the secretion of IL-10 and TGF- β by liver-infiltrating Tregs [12] and that Tregs may inhibit HCV-specific T-cell activity in a cell-cell contact manner [12, 13]. It has also been shown that Treg levels are significantly enhanced in recurrent hepatitis C and that Treg type 1 cell (Tr1) levels are specifically higher in severe recurrent hepatitis C [16]. These findings suggest that Tregs may be implicated in the pathogenesis of HCV recurrence.

Moreover, the opportunity of studying three histologically well-defined liver biopsies of an HCV genotype 1b infected patient followed from the chronic infection to the HCC allowed us to investigate the Tr1 cells infiltration within these liver biopsies. The first biopsy was performed during the chronic phase (date not specified in the file) and appeared normal without any liver injury, the second one was performed during the cirrhotic phase (March 1990), and the third one was performed during HCC (1998). Thus, we examined the intrahepatic T cell response in terms of cytokines, cytokine receptors, and adhesion molecules in a patient under IFN- α /ribavirin treatment and who remained persistently infected >18 years.

2. Materials and Methods

2.1. Chronically HCV Infected Patient. The HCV infected patient was followed up in the Hepatogastroenterology Department of the Necker University Hospital. Information concerning the patient included age ALAT > three times the normal and negative anti-HAV, HBv, and HEV IgM, and positive serology for HCV (third generation microparticle EIA (Abbott AxSYM, Abbott Park)) confirmed by RIBA strip immunoblot assay (Chiron Corporation, Emeryville, CA). The patient was chronically infected by HCV genotype 1b. Genotyping of HCV was done using a multiplex PCR method with genotype-specific primers [17], and the concentration of HCV RNA was determined by RT-PCR with the Cobas Amplicor HCV monitor test (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ). The patient presented no human immunodeficiency virus (HIV) coinfection, immunosuppressive therapy, chronic liver disease due to hepatitis B virus, autoimmune hepatitis, or primary biliary cirrhosis and other causes of chronic liver disease.

2.2. Liver Biopsy Samples. Three liver biopsies were performed for one patient who underwent several biopsies for a longitudinal study. The three biopsies were performed as part of the routine medical followup and were obtained by the standard Menghini procedure (needle diameter: 1.6 mm) with a biopsy sample length of approximately 1 cm. Based on histologic fibrosis (F) and necroinflammatory (NI) scores,

liver biopsies were divided into biopsies with small hepatitis and without liver lesion ($F < \text{or} = 1/6$; $N < \text{or} = 1/18$), biopsies with fibrosis grade and liver lesions corresponding to histologically proved cirrhosis ($F = 6/6$), and biopsies with HCC histologically proved by anatomopathologic expertise. All biopsies were snap-frozen for subsequent RNA extraction.

The study was approved by the Institut de Biologie de Lille (CNRS) Institutional Review Boards and informed consent was obtained in writing from the donor.

2.3. RNA Extraction. Extraction of total RNA from frozen liver biopsy samples was performed using TRIzol reagent (GIBCO BRL, Invitrogen, Scotland, UK) as described by the manufacturer. Tissue samples were homogenized in 300 μL of TRIzol. Homogenized samples were incubated for 5 minutes at room temperature and resuspended in 60 μL of chloroform (PROLABO, Merck Eurolab, France). Total RNA was then immunoprecipitated with 100 μL of isopropanol (ACROS Organics, USA). The RNA pellet was finally washed twice with 75% ethanol (CARLO ERBA Reagent, France) and dissolved in DNase, RNase-free distilled water (GIBCO BRL, Invitrogen, Scotland, UK). Before reverse transcription, we performed DNase treatment using the kit Message Clean (GenHunter Corp., France).

2.4. Light Cycler-Based PCR Assay. cDNA was synthesized from total RNA at a concentration of 100 ng/ μL using random hexamers and Superscript reverse transcriptase (GIBCO BRL, Invitrogen, Scotland, UK). The quantification of transcripts from liver samples was performed by real-time quantitative RT-PCR using the Light Cycler system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The PCR mixture contained the following: *Taq* polymerase, 1X of Light-Cycler DNA master SYBR Green I (Roche Diagnostics, Meylan, France), 3 mM of MgCl_2 , 0.5 $\mu\text{mol/L}$ of each primer, and 1 μL of cDNA preparation (patient cDNA samples) in a total volume of 20 μL . Thirty-two samples were run in parallel by performing an initial denaturation at 95°C for 8 minutes; the PCR reactions were cycled 35 to 40 times as follows: 15 seconds at 95°C, 7 seconds at the appropriate annealing temperature (Table 1), and 18 to 64 seconds at 72°C according to the length of the target sequence, followed by annealing (40 s at 58°C). Fluorescence intensity was measured at the end of each elongation phase. The melting curve analysis was carried out immediately after amplification, following the manufacturer's instructions. Amplification of liver cDNA was successfully repeated three times with cDNA from the same extraction.

2.5. Primers. All primers were designed for real-time PCR use and were purchased from MWG-Biotech (Germany) (cf. Table 1). Housekeeping genes β -actin and G3PDH were used as control. Samples are quantified using relative standard curves for each amplification reaction, and results were normalized to the internal controls β -actin and G3PDH.

2.6. Gel Electrophoresis. After each Light Cycler run, agarose gel electrophoresis with TBE (Tris-borate-EDTA) 1.5% agarose (Sigma-Aldrich, Germany) gel, followed by DNA

TABLE 1: Primer sequences used in real-time quantitative RT-PCR assay.

Gene	Primers sequences	Annealing temperature (°C)
hCD4:	5'-GGGAAATCAGGGCTCCTTCTTA 5'-TGGTCCCAAAGGCTTCTTCTT	59
hCD25:	5'-GGGACTGCTCACGTTTCATCA 5'-TTCAACATGGTTCCTTCCTTGTA	59
hCD49b:	5'-CAACGGGTGTGTGTTCTGACA 5'-TCATCACACACAACCACAACATCT	59
hCD18:	5'-ATGCTTGATGACCTCAGGAATGT 5'-ACGGTCTTGTCCACGAAGGA	59
hT1-ST2:	5'-GTGTTTGCCTCAGGCCAACT 5'-TGACATTTCGCATATCCAGTCCTA	59
hCCR5:	5'-GTCAAGTCCAATCTATGACATCAATTATT 5'-CGGGCTGCGATTTGCTT	57
hCD8 α :	5'-CCCTGAGCAACTCCATCATGTAC 5'-GGCGTCGTGGTGGGC	60
hCD8 β :	5'-TGGCCGCGCAGCTG 5'-CTTGTTGGTTTGCACCTTTATGTATG	55
hCD19:	5'-CTCACCCCATGGAAGTCAG 5'-CTTGAGGCACTGCAGCACAG	60
hCD11c:	5'-AATTCAGGCGCACGTCAAA 5'-ATCCCTACGGGCCCATAT	56
hICAM1:	5'-CCCTGATGGGCAGTCAACA 5'-GCAGCGTAGGGTAAGGTTCTTG	60
h β -actin:	5'-CACGGCATCGTCACCAACT 5'-AGCCACACGCAGCTCATTG	58
hIL-4:	5'-CACAAGCAGCTGATCCGATTC 5'-TTCCAAGAAGTTTTCCAACGTACTC	59
hIL-2:	5'-ACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTAC 5'-TCCAGAGGTTTGAGTTCTTCTCTAGA	61
hIL-10:	5'-GAGAACCAAGACCCAGACATCAA 5'-CCACGGCCTTGCTCTTGTT	59
hIL-10R α :	5'-CCGAGAGTATGAGATTGCCATTC 5'-CAGATGGTTTCACCTGGACACA	60
hIL-10R β :	5'-TGGGAGTCACCTGCTTTTGC 5'-TCCGTCAAGGTAGTATTCATGCA	59
hIFN γ :	5'-ATGTAGCGGATAATGGAAGTC 5'-GACATTCAAGTCAGTTACC	53
hTGF- β 1:	5'-CGAGCCTGAGGCCGACTAC 5'-CGGAGCTCTGATGTGTTGAAGA	62
hTGF- β R1:	5'-TGACAACGTCAGGTTCTGGCT 5'-AATCGACCTTTGCCAATGCT	57
hTGF- β R2:	5'-GCTGCTTCTCCAAAGTCATT 5'-AACAAGTCAGGATTGCTGGTGTT	58
hP-Selectin:	5'-CTGGAACCCCTGAGTCTACCAC 5'-GTCTGTATCTCCATAGCTGCTGAATC	63
h5'G3PDH:	5'-CCATCAATGACCCCTTCATTG 5'-CTTGACGGTGCCATGGAATT	58

staining with ethidium bromide, was performed to have an independent validation check of the presence of an amplicon. In order to control the length of the amplicon generated, a 100 bp DNA ladder (GIBCO BRL, Invitrogen, Scotland, UK) was used.

3. Results and Discussion

As the lymphotropism of hepatitis C virus (HCV) has already been ascertained, and in the light of the fact that the

immune defense system is an organized network composed of functionally immune cells, this study was carried out to verify the possible involvement of Tr1 cells in the progression of HCV-related chronic hepatitis.

In this study, we first analyzed the quantitative expression of the different intrahepatic cell populations by real-time PCR using Light Cycler system (Figure 1), and we performed after each RT-PCR an agarose gel electrophoresis to have an independent validation check (Figure 2). We observed

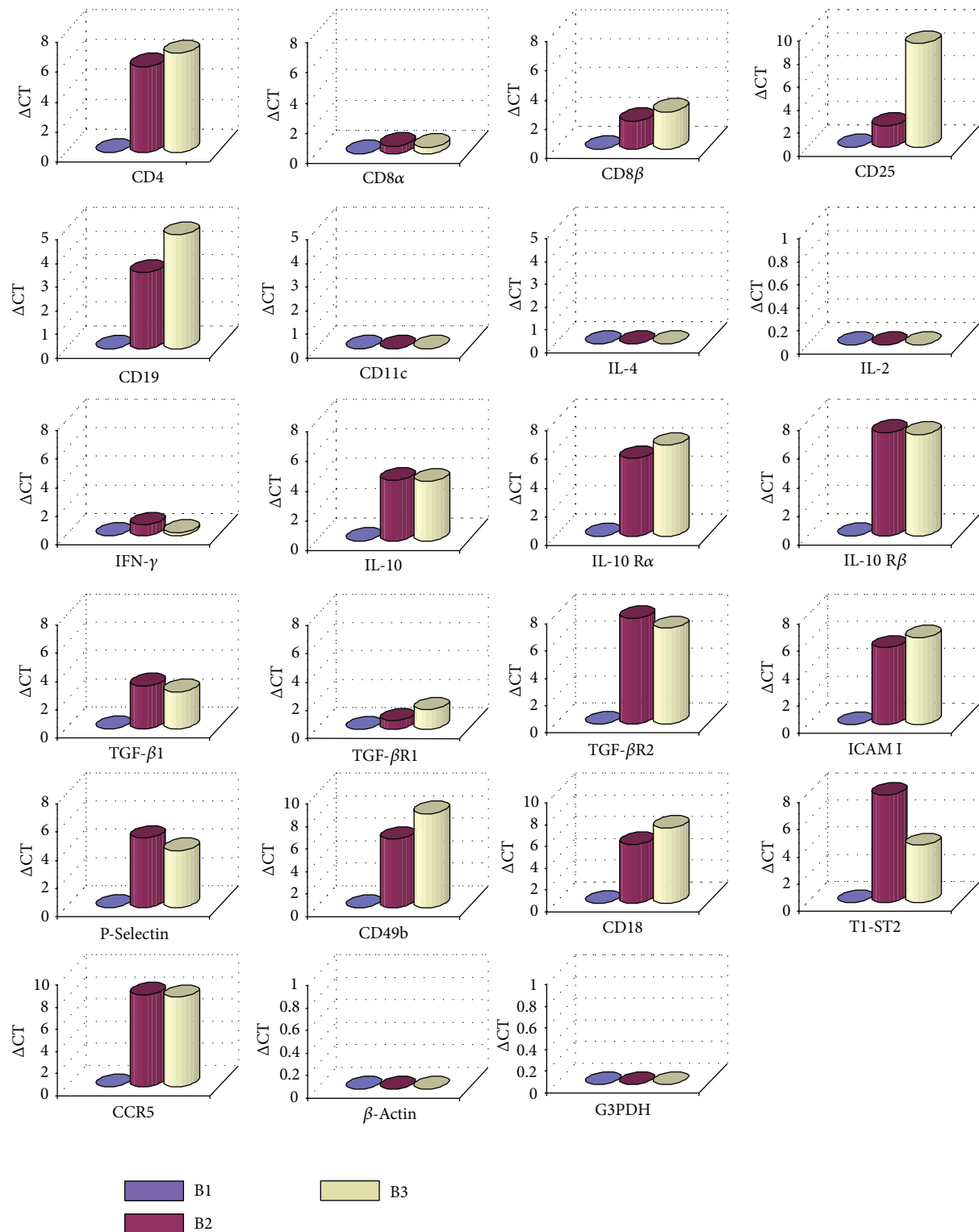


FIGURE 1: Light Cycler-based PCR assay analysis. Histogram analysis of liver biopsies from the same genotype 1b infected patient for expression of various immune markers. Amplification of liver cDNA was successfully repeated three times with cDNA from the same extraction (B1 = healthy biopsy; B2 = cirrhotic biopsy; B3 = HCC biopsy). The prevalence of gene expression was calculated by comparing the cycle numbers (CT) of the logarithmic linear phase of samples 2 and 3 with the cycle numbers of sample 1, which was designed as reference (ΔCT). Samples are quantified using relative standard curves for each amplification reaction, and results were normalized to the internal controls β -actin and G3PDH.

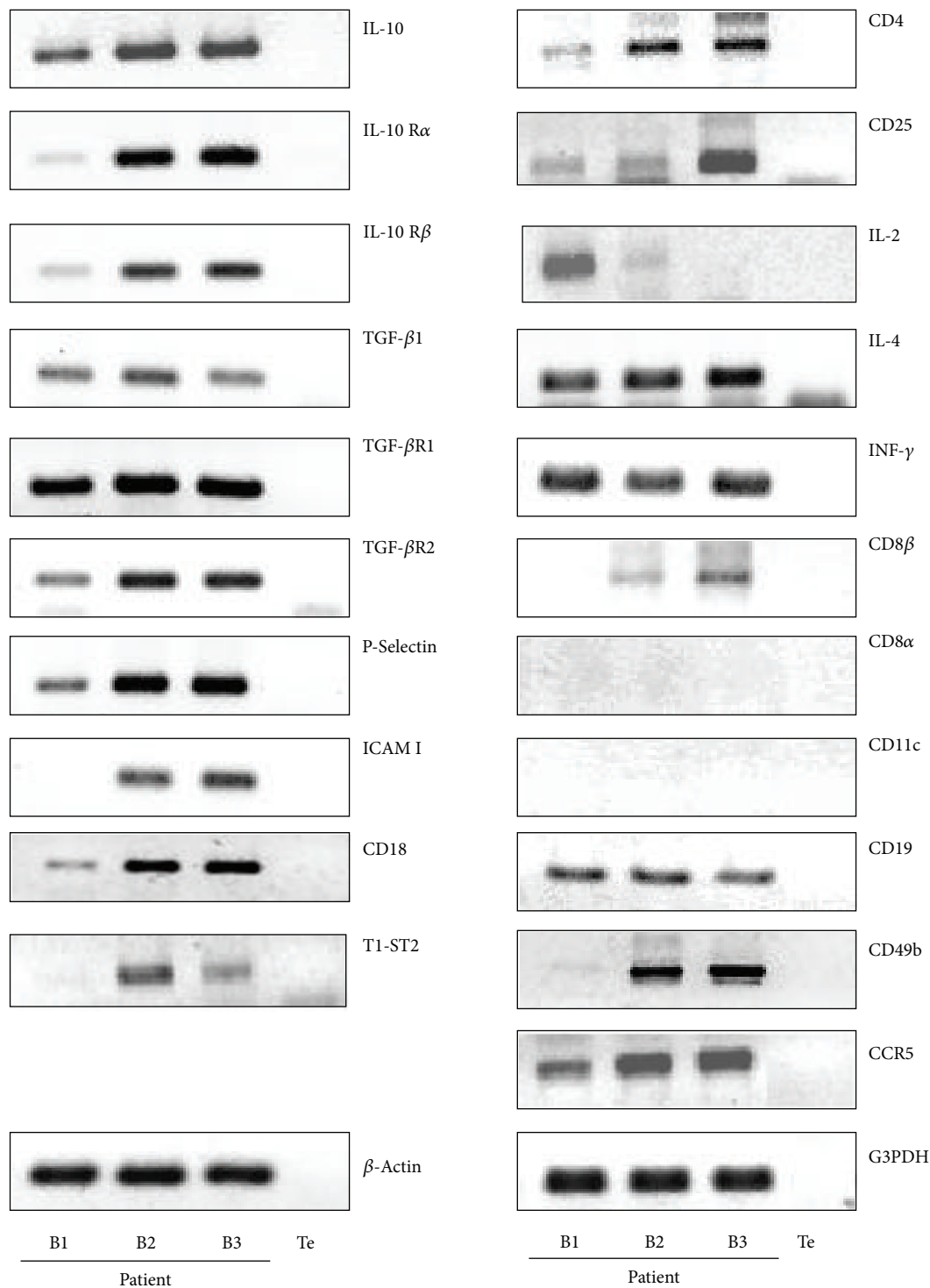


FIGURE 2: Agarose gel electrophoresis analysis. Agarose gel electrophoresis analysis showed amplification of cDNA extracted from liver biopsies, by the Light Cycler technique for T regulatory markers and immunoregulatory associated factors.

a significant increase of CD19 expression in cirrhotic and HCC liver biopsies in comparison with the first biopsy without liver lesions. This observation confirmed data of the literature showing disturbances of B lymphocyte activation and function associated with HCV chronic infection [17, 18]. The CD8 β but not CD8 α gene expression was also increased

in the cirrhotic and HCC biopsies. This observation was in correlation with recent data evidencing by a similar approach of real-time quantitative assays a significant increase and infiltration of CD8 β during chronic HCV infection [19].

But the major observation of our work was the significant increase of CD4 expression in the course of time and

proportionally with the severity of the fibrosis. However, we did not observe a variation of IFN- γ or IL-2 expression, suggesting that the CD4 marker detected in cirrhosis and HCC liver biopsies was probably not associated with the Th1 protective phenotype. Due to the absence of IL-4 expression, the CD4 cells with Th2 phenotype were also excluded in accordance with the work of Bergamini et al. [20]. A further subtype of CD4 T cells, with immunosuppressive function and cytokine profiles distinct from either Th1 or Th2 T cells, termed regulatory T cells has been described. They include Tr1 cells which secrete high level of IL-10 and low to moderate levels of TGF- β , Th3 cells which primarily secrete TGF- β , and CD4⁺CD25⁺ cells, which inhibit immune response through cell-cell contact (9). Although the level of IL-10 and TGF- β produced *in vitro* may not be significantly higher than that produced by classical Th2 cells, what is important is that Tr1 cells make these cytokines in the absence of significant levels of IL-4 [8]. We confirmed within cirrhotic and HCC biopsies a significant increase of expression of IL-10, TGF- β 1 and their respective receptors IL-10R α , IL-10R β , and TGF- β R2 whereas we did not detect an increase of IL-4. So, the production of IL-10 and TGF- β in the absence of IL-4 argued in favor of the presence of Tr1 in the cirrhotic and HCC biopsies. Although liver dendritic cells also secrete high levels of IL-10, in the present study we could not detect CD11c expression, confirming a Tr1 cells origin for IL-10 production. In this sense, functional alteration of HCV-specific CD4⁺ T cells or failure to develop a long-lasting T helper response was recently correlated to a loss of IFN- γ secretion and the presence of a significant antigen-specific IL-10 and TGF- β , which could contribute to chronic hepatitis C persistence [21]. Moreover, TGF- β plays a pivotal role in inducing fibrosis and has been proposed as its surrogate marker. Indeed, a very interesting study has shown that serum TGF- β 1 could be used to assess therapeutic outcome and short-term prognosis of HCV-related chronic hepatitis [22].

Moreover, results obtained for Tr1 specific markers CD49b and CD18 confirmed the Tr1 phenotype and showed that Tr1 cells increased during the progression of the pathology. Despite their low proliferative capacity, cloned Tr1 express normal levels of T cell activation markers such as CD25 following TCR-mediated activation. They also expressed CCR5 and T1-ST2, an IL-1-R-like molecule, markers previously expressed preferentially on Th1 and Th2 cells, respectively [9]. We clearly confirmed here within cirrhotic and HCC biopsies the expression of CD25, CCR5, and T1-ST2 in relation to the presence of Tr1 cells. In accordance with this Tr1 phenotype, the expression of TGF- β -R2 was also observed. However, we cannot exclude the implication of other regulatory T cell subsets, insofar as we observed a significant increase of CD25, Pselectin, and ICAM I expression, which were known as specific markers for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. These observations were also conformed by other experiments we performed on liver biopsies of three well-defined cohorts of 45 HCV genotype 1b infected patients, including patients without liver lesions, patients with cirrhosis, and patients with histologically proved HCC that confirmed an increase of Tr1 proportional to the aggravation of the pathology [23]. A first implication of regulatory

T cells during HCV infection was examined in peripheral blood of patients infected with HCV genotype 1b, showing a secretion of IFN- γ or IL-10 but not IL-4 by HCV core-specific CD4 T cell clones [24]. This work demonstrated that helper type 1 and regulatory T cells were induced probably against the same epitopes on the core protein. Moreover, Sugimoto et al. [25] have suggested for the first time that HCV persistence was associated with a reversible CD4-mediated suppression of HCV-specific CD8 T cells and with higher frequency of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells that could directly suppress HCV-specific type 1 CD8 T cells *ex vivo*. Indeed, it is possible that the induction of regulatory T cells during HCV infection may suppress antiviral Th1 and consequently CD8 CTL responses *in vivo*, and this may explain the persistence of infection and prevalence of cirrhosis.

4. Conclusion

Evidence of regulatory T cells installation in the liver of a chronically infected patient with cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) suggests a key role for these cells in the aggravation of the liver pathology and could potentially represent a predictive factor of liver damage aggravation. As previously described [26] high serum IL-10 levels may be related to a poor response to IFN treatment in patients with chronic hepatitis C. In this sense, it would have been interesting to investigate other markers such as spleen markers or beta2-microglobulin, although it has been described that neither spleen measurements nor serum beta2-microglobulin levels were able to predict therapeutic response to antiviral therapy [27]. In conclusion of our study, the increase of Tr1 cells, which suppressed protective Th1 responses via their high production of IL-10, could explain the failure of the IFN treatment observed for this patient. In a more general way, the implication of Tr1 in viral persistence and associated hepatic pathologies could have significant implications for our understanding of the role of T cells in immunity to infectious diseases and for the development of new therapies for the control of immune-mediated disorders.

Conflict of Interests

The authors of this paper have no conflict of interests.

Authors' Contribution

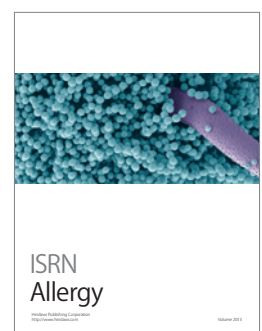
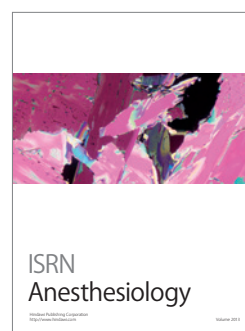
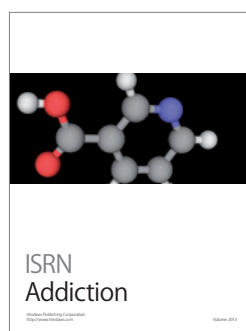
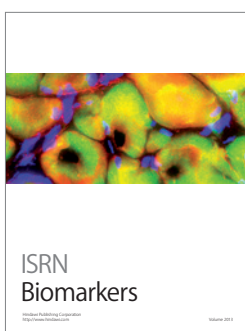
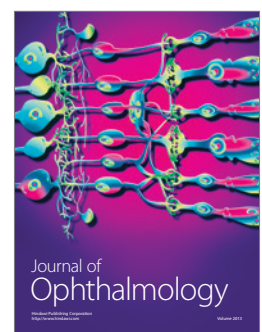
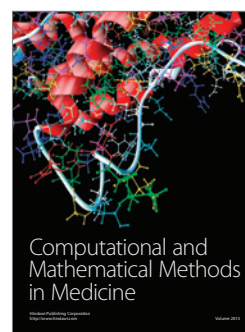
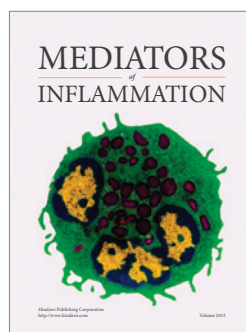
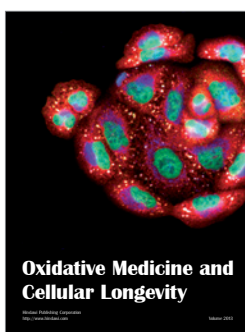
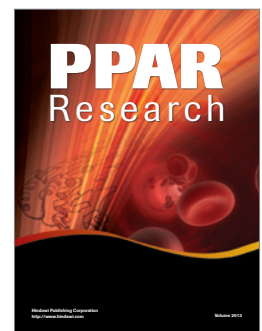
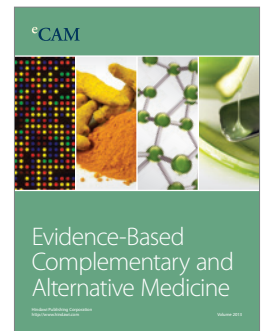
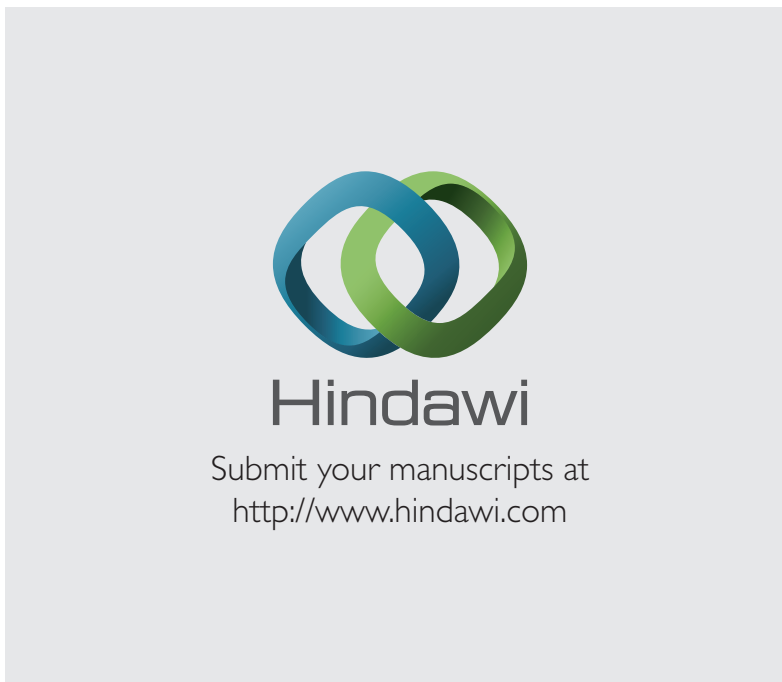
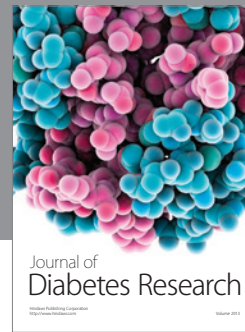
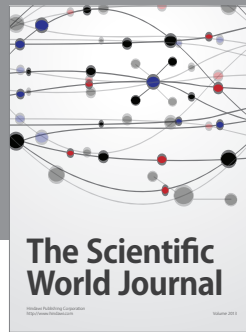
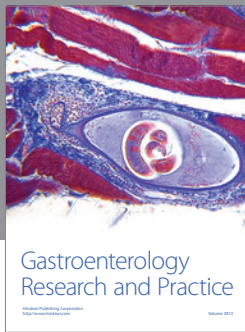
Laurissa Ouaguia, Olivier Morales, Filoména Conti and Nadira Delhem contributed equally to this work.

Acknowledgments

This work received support from the Agence Nationale de la Recherche sur le Sida et les Hépatites (ANRS). This work was supported by SIRIC ONCOLille. The authors thank Jean-Luc Lagneau of Necker Hospital for the selection of liver biopsies of HCV infected patient and Violaine François and Arnaud Carpentier for their technical assistance.

References

- [1] M. J. Alter, H. S. Margolis, K. Krawczynski et al., "The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The sentinel counties chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team," *The New England Journal of Medicine*, vol. 31, pp. 1899–1905, 1992.
- [2] K.-M. Chang, R. Thimme, J. J. Melpolder et al., "Differential CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection," *Hepatology*, vol. 33, no. 1, pp. 267–276, 2001.
- [3] B. Rehmann, "Cell mediated immune response to the hepatitis C virus," *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 242, pp. 299–325, 2000.
- [4] S.-L. Tsai, Y.-F. Liaw, M.-H. Chen, C.-Y. Huang, and G. C. Kuo, "Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity," *Hepatology*, vol. 25, no. 2, pp. 449–458, 1997.
- [5] S. Kakumu, A. Okumura, T. Ishikawa, K. Iwata, M. Yano, and K. Yoshioka, "Production of interleukins 10 and 12 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in chronic hepatitis C virus (HCV) infection," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 108, no. 1, pp. 138–143, 1997.
- [6] R. P. Woitas, U. Petersen, D. Moshage et al., "HCV-specific cytokine induction in monocytes of patients with different outcomes of hepatitis C," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 8, no. 3, pp. 562–566, 2002.
- [7] H. Groux, M. Bigler, J. E. de Vries, and M.-G. Roncarolo, "Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4⁺ T cells," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 184, no. 1, pp. 19–29, 1996.
- [8] H. Groux, A. O'Garra, M. Bigler et al., "A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis," *Nature*, vol. 389, no. 6652, pp. 737–742, 1997.
- [9] P. McGuirk, C. McCann, and K. H. G. Mills, "Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 195, no. 2, pp. 221–231, 2002.
- [10] X. Xu, K. Sumita, C. Feng et al., "Down-regulation of IL-12 p40 gene in *Plasmodium berghei*-infected mice," *Journal of Immunology*, vol. 167, no. 1, pp. 235–241, 2001.
- [11] M. Rahmoun, A. Foussat, H. Groux, J. Pène, H. Yssel, and P. Chané, "Enhanced frequency of CD18- and CD49b-expressing T cells in peripheral blood of asthmatic patients correlates with disease severity," *International Archives of Allergy and Immunology*, vol. 140, no. 2, pp. 139–149, 2006.
- [12] R. Cabrera, Z. Tu, Y. Xu et al., "An immunomodulatory role for CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection," *Hepatology*, vol. 40, no. 5, pp. 1062–1071, 2004.
- [13] S. M. Rushbrook, S. M. Ward, E. Unitt et al., "Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8⁺ T cells during persistent hepatitis C virus infection," *Journal of Virology*, vol. 79, no. 12, pp. 7852–7859, 2005.
- [14] T. Boettler, H. C. Spangenberg, C. Neumann-Haefelin et al., "T cells with a CD4⁺CD25⁺ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8⁺ T cells during chronic hepatitis C virus infection," *Journal of Virology*, vol. 79, no. 12, pp. 7860–7867, 2005.
- [15] T. Manigold and V. Racanelli, "T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies," *Lancet Infectious Diseases*, vol. 7, no. 12, pp. 804–813, 2007.
- [16] A. Carpentier, F. Conti, F. Stenard et al., "Increased expression of regulatory tr1 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation," *American Journal of Transplantation*, vol. 9, no. 9, pp. 2102–2112, 2009.
- [17] J. Ni, E. Hembrador, A. M. Di Bisceglie et al., "Accumulation of B lymphocytes with a naive, resting phenotype in a subset of hepatitis C patients," *Journal of Immunology*, vol. 170, no. 6, pp. 3429–3439, 2003.
- [18] M. P. Curry, L. Golden-Mason, D. G. Doherty et al., "Expansion of innate CD5pos B cells expressing high levels of CD81 in hepatitis C virus infected liver," *Journal of Hepatology*, vol. 38, no. 5, pp. 642–650, 2003.
- [19] V. Leroy, I. Vigan, J.-F. Mosnier et al., "Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C," *Hepatology*, vol. 38, no. 4, pp. 829–841, 2003.
- [20] A. Bergamini, F. Bolacchi, G. Cerasari et al., "Lack of evidence for the Th2 predominance in patients with chronic hepatitis C," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 123, no. 3, pp. 451–458, 2001.
- [21] A. Ulsenheimer, J. T. Gerlach, N. H. Gruener et al., "Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4⁺ T cells in acute and chronic hepatitis C," *Hepatology*, vol. 37, no. 5, pp. 1189–1198, 2003.
- [22] G. Tarantino, A. Coppola, P. Conca, E. Cimino, and G. di Minno, "Can serum TGF-beta 1 be used to evaluate the response to antiviral therapy of haemophilic patients with HCV-related chronic hepatitis?" *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, vol. 21, no. 4, pp. 1007–1012, 2008.
- [23] N. Delhem, F. Cottrez, A. Carpentier et al., "Role of the regulatory T lymphocytes in hepatitis C fibrosis progression," *Bulletin du Cancer*, vol. 95, no. 11, pp. 1029–1038, 2008.
- [24] A. J. MacDonald, M. Duffy, M. T. Brady et al., "CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 185, no. 6, pp. 720–727, 2002.
- [25] K. Sugimoto, F. Ikeda, J. Stadanlick, F. A. Nunes, H. J. Alter, and K.-M. Chang, "Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection," *Hepatology*, vol. 38, no. 6, pp. 1437–1448, 2003.
- [26] N. Kuzushita, N. Hayashi, K. Katayama et al., "High levels of serum interleukin-10 are associated with a poor response to interferon treatment in patients with chronic hepatitis C," *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, vol. 32, no. 2, pp. 169–174, 1997.
- [27] G. Tarantino, P. Conca, M. Tarantino et al., "Does spleen volume play a role in patients with HCV-related chronic hepatitis?" *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, vol. 22, no. 4, pp. 1009–1017, 2009.



BREVET D'INVENTION

BREVET D'INVENTION

Au cours de ma thèse, j'ai également contribué à des travaux de recherche qui font actuellement l'objet d'un dépôt de brevet d'invention. Ce travail ne pourra être présenté ici pour des raisons de confidentialité. Ci-dessous une attestation de la SATT NORD.

	Lille, le 10 octobre 2013
Monsieur Bernard SABLONNIERE Directeur de l'Ecole Doctorale Ecole Doctorale BIOLOGIE SANTE (ED n°446) Faculté de Médecine Pôle Recherche 1 place de verdun 59045 Lille cedex	
N/Réf. :	
Objet : Soutenance de thèse de Dhafer MRIZAK	
Monsieur le Directeur,	
Par la présente, la SATT Nord vous informe de la réception d'une déclaration d'invention en date du 12 juillet 2013 dans laquelle Dhafer MRIZAK, est cité en tant qu'inventeur de l'invention «	
Cette invention va prochainement faire l'objet d'un dépôt d'une demande de brevet.	
Je vous prie d'agréer, Monsieur le Directeur, l'assurance de mes salutations distinguées.	
Président Directeur Général P.O : Directrice Régionale Nord-Pas de Calais	
 Christine USEILLE	
SATT Nord Siège et Direction Régionale Nord-Pas de Calais 2 rue du Priez – 59000 Lille – Email : lille@sattnord.fr SIRET : 753 847 011 00016 N° TVA Intracommunautaire : FR 13 753847011	

LISTE DES PUBLICATIONS

LISTE DES PUBLICATIONS

2014	<u>Mrizak D</u> , Martin N, Niki T, De Launoit Y, Busson P, Pancré V, Moralès O and Delhem N: “ <i>Anti-viral Peptide Immunotherapy in EBV-Associated Nasopharyngeal Carcinoma Inducing CD4+ Cytotoxic T cell activity</i> ”. <i>In preparation</i>
2013	<u>Mrizak D</u>* , Moralès O*, François V, Miroux C, Depil S, Mustapha R, Decouvelaere A V, Lionne-Huyghe P, Auriault C, De Launoit Y, Pancré V and Delhem N (* co-authors): “ <i>Epstein Barr Virus Infection Increases the Recruitment of T Regulatory Type 1 (Tr1) Cells in Hodgkin’s Lymphoma patients</i> ”. <i>PlosOne (PONE-D-13-43159) Accepted</i>
2013	<u>Mrizak D</u> , Martin N, Barjon C, Jimines-Pailhes AS, Mustapha R, Niki T, Pancré V, De Launoit Y, Busson P, Moralès O, and Delhem N: “ <i>Nasopharyngeal Carcinoma-Derived Exosomes Recruit, Expand and Up-Regulate Biological Activities of Human Regulatory T Cells</i> ”. <i>JNCI (JNCI-13-1436). Accepted</i>
2013	Ouaguia L*, Moralès O*, <u>Mrizak D</u> , Sénéchal M, Ghazal K, Boleslawski E, de Launoit Y, Auriault C, Pancré V, Conti F, and Delhem N (* co-authors): “ <i>Overexpression of Regulatory T-Cells Type 1 (Tr1) specific markers in a patient with HCV-induced Hepatocellular Carcinoma</i> ”. <i>ISRN Hepatology, Vol. 2013 (2013), Article ID 928485</i>
2012	<u>Mrizak D</u> , Martin N, Wambre N, Ouaguia L, de Launoit Y, Busson P, Morales O and Delhem N: “ <i>Nasopharyngeal carcinoma-derived exosomes recruit, expand and upregulate biological activities of human regulatory T cells (Treg)</i> ” <i>J Extracellular Vesicles ; 1:18775, (2012) Abstract</i>
2012	Moralès O*, Depil S*, <u>Mrizak D</u> , Martin N, Ndour P A, Duffossé F, Miroux C, Coll J, de Launoit Y, Auriault C, Pancré V and Delhem N (* co-authors): “ <i>EBV Latency II-derived peptides induce a specific CD4+ cytotoxic T-cell activity and not a CD4+ regulatory T-cell response</i> ”. <i>J Immunotherapy ; April 2012 ; 35(3):254-66.</i>
2012	Moralès O*, Richard A*, Martin N, <u>Mrizak D</u> , Sénéchal M, Miroux C, Pancré V, Rommelaere J, Caillet-Fauquet P, de Launoit Y and Delhem N (* co-authors): « <i>Activation of a Helper and not Regulatory CD4+ T Cell Response by Oncolytic H-1 Parvovirus</i> ”. <i>PLoSOne, 2012;7(2):e32197. Epub February 16, 2012.</i>
2011	<u>Mrizak D</u> , B’chir F, Jaidane M, Arnaud M.J, and Saguem S: “ <i>Effects of change in smoking habits on bladder cancer incidence in Tunisia</i> ”. <i>Health, October 17, 2011; 3(10):613-619.</i>

LISTE DES COMMUNICATIONS

LISTE DES COMMUNICATIONS

Orales

Mai 2013	6ème journées scientifiques du Cancéropôle Nord Ouest (Deauville, France) : <i>“Imapct des exosomes tumoraux du carcinome du nasopharynx sur les lymphocytes T régulateurs humains”</i> .
Octobre 2012	Exosomes and Microvesicules 2012 (Orlando, Etats-Unis): <i>“Galectin-9 containing exosomes released by Nasopharyngeal Carcinoma cells recruit, expand and upregulate biological activities of human regulatory T cell”</i> .
Juin 2012	Journées des Doctorants « Cancer » (Lille, France): <i>« Les exosomes de carcinome du nasopharynx recrutent, expandent et augmentent l’activité biologique des lymphocytes T régulateurs humains (Treg) »</i> .
Avril 2012	International Society of Extracellular Microvesicules (ISEV) annual scientific meeting (Goteborg, Suède): <i>“Nasopharyngeal carcinoma exosomes recruit, expand and increase biological activity of human regulatory T cells (Treg)”</i> .
Juin 2011	3 rd European EBV meeting (Lyon, France): <i>“Assessing a strategy of anti-viral peptide immunotherapy in nasopharyngeal carcinoma (NPC) associated with Epstein Barr virus”</i> .
Mai 2011	4ème journées scientifiques du Cancéropôle Nord Ouest (Deauville, France) : <i>« Evaluation d’une stratégie d’immunothérapie peptidique anti-virale dans le carcinome du nasopharynx associé au virus d’Epstein Barr »</i> .
Juin 2009	16th International Student Congress of Medical Sciences (Groningue, Pays-Bas): <i>“Cigarette Filter, CYP1A2 gene polymorphisms, and adenocarcinoma of lung risk among Tunisian smokers”</i> .

Affichées

Août2013	15th International congress of Immunology (Milan, Italie): <i>« Nasopharyngeal Carcinoma-Derived Exosomes Recruit, Expand and up-regulate Biological Activities of Human Regulatory T Cells (Treg) »</i> .
Mai 2012	5ème journées scientifiques du Cancéropôle Nord Ouest, (Deauville, France) : <i>« Nasopharyngeal Carcinoma-Derived Exosomes Recruit, Expand and up-regulate Biological Activities of Human Regulatory T Cells(Treg) »</i> .
Octobre 2011	69ème journées scientifiques de l’AFEF (Association Française pour l’Etude du Foie) (Paris, France) : <i>« Propriétés oncolytiques et oncotropique du Parvovirus-H1 dans le carcinome hépatocellulaire »</i> .
Septembre 2011	11ème journée André Verbert (Lille, France) : <i>« Evaluation d’une stratégie d’immunothérapie peptidique anti-virale dans le carcinome du Nasopharynx associé au virus d’Epstein Barr »</i> .
Mai 2010	3ème journées scientifiques du Cancéropôle Nord Ouest (Deauville, France) : <i>« Epstein Barr Virus Infection in Hodgkin’s Lymphoma : a Mechanism Facilitating</i>

Induced regulatory T Cells Recruitment ».

Juin 2009

16th International Student Congress of Medical Sciences (**Groningue, Pays-Bas**):
“Cigarette Filter, CYP1A2 gene polymorphisms, and adenocarcinoma of lung risk among
Tunisian smokers”.

NOUVEAU CHAPITRE DE LA THESE

X. Nouveau chapitre de la thèse

J'ai eu l'opportunité, au cours de ma troisième année de thèse, de participer à la formation « *Nouveau Chapitre de la Thèse* (NCT) ». Le NCT, proposé par l'Ecole Doctorale Biologie-Santé et l'Association Bernard Grégory (ABG), a pour objectif de **valoriser les compétences** qui ont été développées au cours de la thèse (acquis professionnels, compétences, qualités personnelles) et d'analyser ainsi objectivement la manière dont la thèse a été gérée.

Ce stage est organisé de la manière suivante : 6 demi-journées de rencontres en groupe de 6 doctorants d'horizons différents, sous la direction d'un mentor issu du milieu professionnel. Mon mentor a été **Franck Bouilho**, qui est Consultant en développement des ressources humaines à Lille. L'objectif de ces réunions était d'essayer de dégager ensemble les compétences que nous avons pu acquérir au cours du doctorat. Au terme de cette formation, le doctorant est amené à présenter la valorisation de ses compétences par un rapport écrit et devant un jury composé de personnalités du monde industriel.

Le travail réalisé au cours du NCT m'a permis d'appréhender la thèse comme un projet, de dégager une multitude de compétences transférables dans d'autres activités et de m'ouvrir une voie sur différents projets professionnels.

Ainsi, vous trouverez dans le document ci-après, le mémoire du NCT scindé en différentes parties. Tout d'abord, l'explication vulgarisée de mon projet de thèse, avec les enjeux et les motivations. Dans une seconde partie, l'environnement de la thèse est détaillé. La troisième partie présente le déroulement de la thèse, les étapes du projet, la gestion des problèmes et le coût global. Enfin, la dernière partie expose les différentes compétences que j'ai acquises au cours de ce doctorat.



Nouveau Chapitre de la Thèse (NCT)

Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille (EDBSL)

Dhafer Mrizak

Mentor: Franck Bouilho

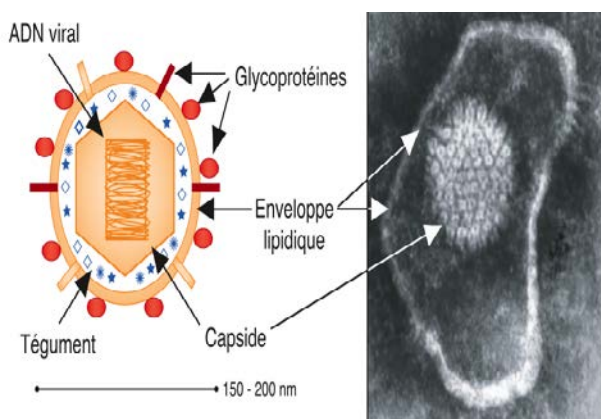
2012

I – Cadre général et enjeux de la thèse

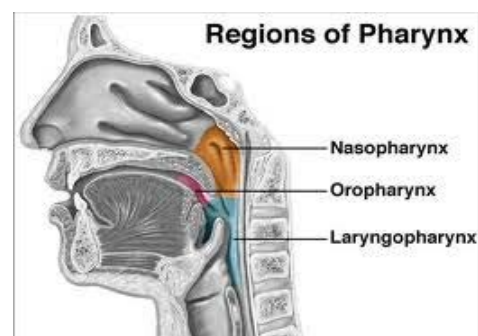
1. Présentation de la thèse

Evaluation d'une Stratégie d'immunothérapie peptidique vaccinale dans le carcinome du nasopharynx associé à EBV.

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est extrêmement répandu à travers le monde où il infecte plus de 95 % de la population adulte et persiste tout au long de la vie de l'individu. Découvert en 1964, l'EBV fût le premier virus impliqué dans des phénomènes de carcinogenèse. Il est actuellement associé à plus d'une vingtaine de cancers dont la maladie de Hodgkin (MH) et le carcinome du nasopharynx (CNP). Ce dernier est lié à l'EBV dans quasiment 100% des cas et chaque année, plus de 85000 cas sont diagnostiqués dans le monde. A l'heure actuelle, les CNP sont généralement inopérables au moment du diagnostic. Le traitement standard pour les stades I sans atteinte ganglionnaire est la radiothérapie exclusive et, si le rôle de la chimiothérapie n'est pas discuté au stade métastatique, son rôle et ses modalités d'administration dans la prise en charge initiale des cancers du nasopharynx restent controversés. Quant au traitement standard des cancers du nasopharynx localement avancés, il est basé sur la Chimio-radiothérapie. L'ensemble de ces traitements présentent un certains nombre d'inconvénients, **nécessitant d'explorer d'autres alternatives thérapeutiques telles que l'immunothérapie.**



Le virus d'Epstein Barr



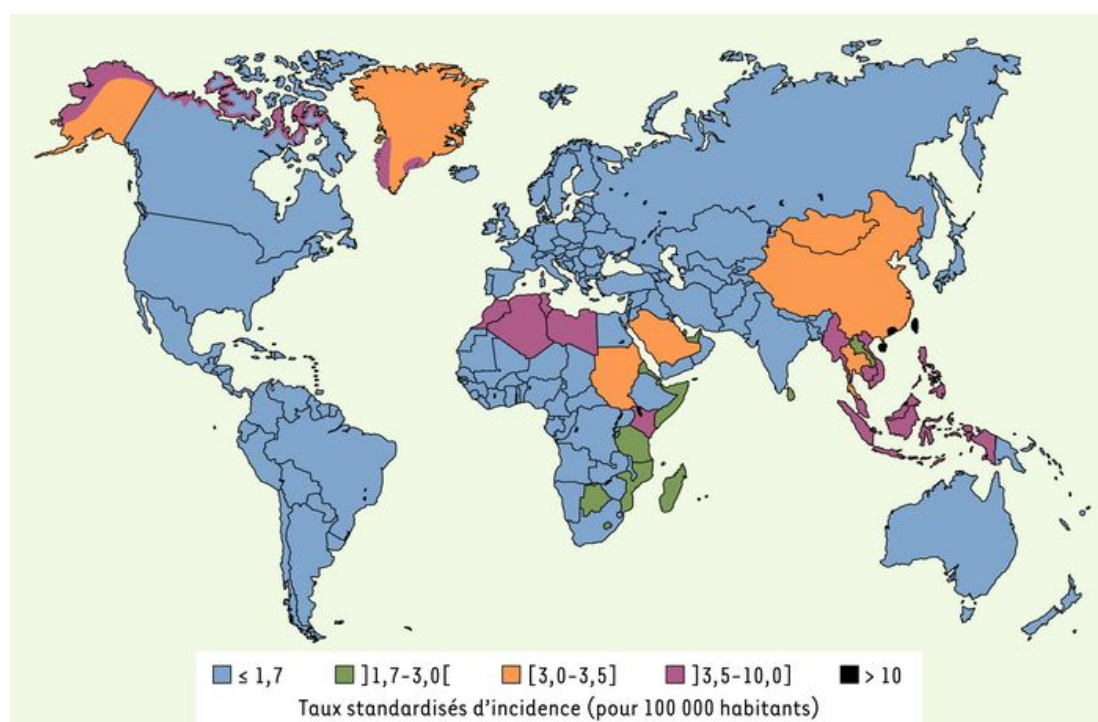
Le Nasopharynx

Il n'existe pas actuellement de protocole d'immunothérapie des cancers associés à EBV qui soit réellement efficace et facile à mettre en œuvre. En effet, l'immunothérapie cellulaire qui repose sur la préparation de lymphocytes T cytotoxiques est longue à mettre en œuvre et est peu efficace dans

la mesure où le taux d'expansion des lymphocytes T spécifiques d'EBV est faible et nécessite l'ajout d'un cocktail mitogène chez les patients atteints de la maladie de Hodgkin, en outre aucune rémission complète des tumeurs n'est observée.

Ces observations sont en faveur de l'utilisation de peptides spécifiques des antigènes d'EBV et capables de stimuler une forte réponse du système immunitaire (vaccination ou thérapie cellulaire), pour la prévention et le traitement des pathologies tumorales associées à EBV.

Bien que le système immunitaire maîtrise l'infection virale, il demeure inefficace contre les cellules tumorales infectées par l'EBV. Notre étude vise ainsi à stimuler le système immunitaire, en lui présentant des protéines virales, selon le principe d'une vaccination. Pour cela, nous avons défini, un cocktail de 6 peptides dérivés du virus et susceptible d'être reconnu par plus de 90% de la population. Nous avons pu montrer que ce cocktail était capable d'induire une réponse immune protectrice chez tous les donneurs sains testés et chez des patients atteints d'une maladie de Hodgkin. Le CNP, tumeur mortelle des pays en voie de développement, serait également une cible préférentielle de nos peptides. Cependant, les cellules de CNP sécrètent des nanovésicules, appelées exosomes, qui induisent la mort des cellules immunitaires. Dans ce contexte, l'objectif principal de ma thèse consistait alors à explorer les moyens de favoriser l'expansion et l'efficacité des cellules immunitaires anti-tumorales induites par notre cocktail, et de caractériser et neutraliser les effets des exosomes tumoraux, notamment sur les cellules régulatrices du système immunitaire, -favorables au développement des tumeurs-.



Distribution géographique du carcinome du nasopharynx

Démarche utilisée et résultats obtenus

Afin de répondre à cette question, j'ai isolé différentes populations lymphocytaires à partir de poches de sang de personnes saines (Etablissement Français du Sang, EFS) et après les avoir mis en culture, je les ai mis en contact avec les exosomes (nanovésicules) purifiés à partir de sérum de donneurs sains ou à partir de surnageants de cultures de cellules tumorales.

J'ai découvert que les exosomes tumoraux inhibaient les cellules du système immunitaire susceptibles d'éliminer les cellules tumorales. Ce résultat pourrait expliquer l'inefficacité des cellules tumorales contre les cellules du CNP malgré leur forte présence dans la tumeur. D'autre part j'ai montré que les exosomes de CNP favorisaient la population régulatrice qui a un rôle immunosuppresseur (inhibiteur sur le système immunitaire) et donc favoriser l'échappement des cellules tumorales à la réponse immune.

Les enjeux de mon projet de thèse

Les enjeux scientifiques de ce travail de thèse sont très importants, dans la mesure où cette recherche s'inscrit dans une démarche de recherche préclinique tendant à aider le patient. En effet, notre cocktail peptidique inducteur d'une réponse immune protectrice a déjà fait l'objet d'un brevet d'invention français ayant récemment bénéficié de plusieurs extensions internationales. A terme, ce cocktail devrait pouvoir être utilisé dans une stratégie de vaccination peptidique ou de thérapie cellulaire, en application thérapeutique aux cancers liés à EBV, notamment au carcinome du nasopharynx.

.

Mes motivations

L'envie de faire une thèse est venue de ma passion pour la biologie et en particulier la cancérologie, et de mon envie de répondre à une problématique médicale en cherchant à en comprendre le fonctionnement cellulaire et moléculaire. C'est aussi apprendre à gérer un projet dans son ensemble en intégrant les contraintes financières, de temps, humaines, ...

D'autre part, cette thèse, qui est très axée sur la clinique et l'amélioration des soins, me donnait l'opportunité de faire de la recherche appliquée d'intérêt public, d'allier recherche et aide médicale. De plus, l'aspect multidisciplinaire du sujet qui m'a été proposé, alliant à la fois de l'immunologie, de la cancérologie et de la virologie, m'a vraiment plu et m'a permis d'élargir mes compétences pour la suite de ma carrière.

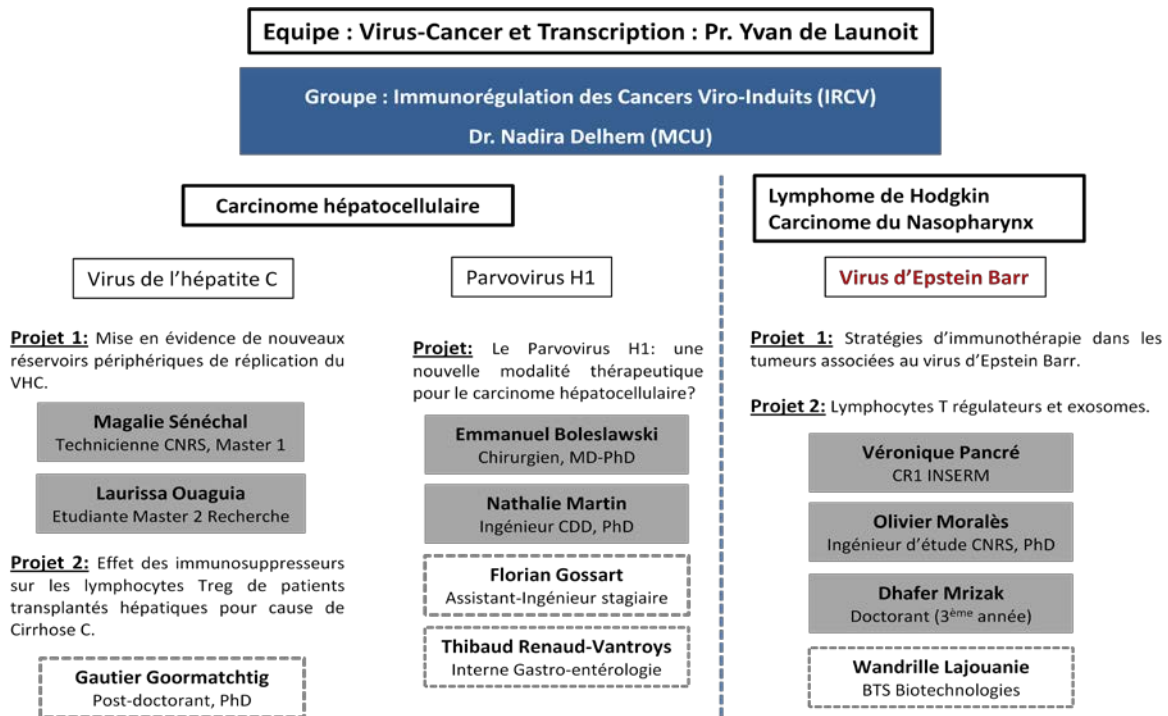
Par ailleurs, la liberté de décision et la confiance accordées, par ma responsable scientifique, dans la définition et la gestion de mon projet, tant au niveau de la programmation des manipulations que dans l'évolution à donner au sujet, me convenait tout à fait.

2. Contexte de la thèse

Environnement de travail

Le laboratoire dans lequel j'ai réalisé ma thèse est situé au sein de l'institut de Biologie de Lille (IBL) et fait partie de l'Unité Mixte de Recherche (UMR) 8161, qui est une unité CNRS (Centre National de la Recherche et de la Santé) en partenariat avec les universités de Lille 1 et Lille 2 et l'Institut Pasteur de Lille (IPL). Cette unité composée de 6 équipes a focalisé l'ensemble de ses recherches sur le cancer ; de la recherche fondamentale sur les mécanismes de cancérisation et d'invasion, en passant par la chimie des tumeurs, jusqu'à des recherches plus appliquées (chimiothérapie, immunothérapie et virothérapie).

L'équipe que j'ai rejointe pour réaliser ce projet travaille sur l'ImmunoRégulation des Cancers Viro-induits (IRCV). Cette équipe est dirigée par le Dr Nadira Delhem et le Pr Yvan de Launoit également directeur administratif de l'IBL et de l'UMR 8161. Elle est constituée de 4 chercheurs, 2 ingénieurs d'étude, 1 post-doctorant, 1 technicien, 1 étudiant en thèse et 1 Master 2 Recherche ; et ponctuellement quelques stagiaires. Chaque personne a un projet bien particulier, notamment l'étude des lymphomes de Hodgkin (cancers des ganglions lymphatiques) associés au Virus d'Epstein Barr (EBV), le cancer du foie associé au Virus de l'Hépatite C (VHC) et l'effet potentiel anticancéreux du Parvovirus-H1 (PV-H1) :



Les partenariats

La collaboration avec de multiples équipes en France et à l'étranger nous a permis d'aborder et d'analyser les aspects cliniques de mon projet en nous apportant des connaissances et une approche « médicales » que nous ne possédions pas en tant que scientifiques biologistes. De plus ces

collaborations nous ont donné accès à de multiples outils biologiques très précieux dans le projet (anticorps non commercialisés, lignées cellulaires...) mais également le transfert de technologies sophistiquées vers notre laboratoire telle que la purification des exosomes.

Environnement du projet

A mon arrivée au laboratoire après mon Master 2 Recherche, l'objectif était de continuer le travail effectué par l'équipe qui consistait à développer des stratégies d'immunothérapies dans les cancers liés à EBV. L'équipe a développé un outil vaccinal innovant constitué de 6 peptides associés en un cocktail breveté et à montré son efficacité dans le lymphome de Hodgkin (LH) associé à EBV. Sous la direction scientifique du Dr Nadira Delhem, ils ont notamment montré que ce cocktail vaccinal présentait une efficacité importante chez les patients atteints d'un LH sans affecter la composante immunosuppressive et notamment les Treg.

Mon travail de thèse s'est alors inscrit dans la continuité de ces travaux. En effet, l'équipe voulait étendre l'utilisation de ce cocktail vaccinal à d'autres pathologies tumorales associées à EBV et plus particulièrement le CNP. Donc mon rôle était de valider une stratégie d'immunothérapie peptidique dans cette pathologie (le CNP). J'ai donc été recruté pour analyser l'effet des immunosuppresseurs sur l'activité des Treg.

Approche innovante

Dans le monde scientifique, la concurrence est importante d'où l'importance de la veille technologique ainsi que bibliographique. En effet de nombreuses études ont tenté de développer des stratégies d'immunothérapies dans le CNP afin de compléter les traitements classiques ou de diminuer le risque de rechute chez les patients. Ces stratégies ont visé essentiellement la population lymphocytaire TCD8⁺ sans une réelle efficacité et avec des résultats qui ont surtout montré le manque de spécificité de ces stratégies. La stratégie que nous proposons est différente et vise à stimuler la population TCD4⁺ afin d'obtenir une spécificité plus importante et une meilleure réponse chez les patients sans affecter la population régulatrices (TCD4⁺ régulateurs = Treg) et en prenant en compte la deuxième composante inhibitrice (immunosuppressive) qui est la forte sécrétion d'exosomes par les cellules de CNP.

Capital de compétences

La réalisation de ce projet a été possible grâce aux différentes compétences scientifiques et techniques mises à ma disposition. En effet, j'ai eu la chance d'être encadrée, par le Dr Nadira Delhem, une dizaine d'années d'expérience sur les mécanismes immunitaires d'immunorégulation et par le Dr Olivier Moralès qui a beaucoup travaillé sur les pathologies associées à EBV. Par

ailleurs, notre étroite collaboration avec les cliniciens, m'a permis de mieux appréhender la partie médicale de mon travail.

Tout au long de ma thèse, j'ai eu la possibilité d'encadrer de nombreux stagiaires du BTS au Master 2 Recherche ou Professionnel ; stagiaires dont l'aide technique m'a été précieuse. De plus, au sein de l'équipe, chaque collègue a toujours été prêt à apporter son aide dans les moments de débordement.

Le fait de réaliser ce Doctorat à l'IBL, au sein du campus de l'Institut Pasteur de Lille, a certainement contribué au bon avancement de mes travaux de recherche. En effet, le campus Pasteur offre un accès libre à de nombreux moyens techniques (différents systèmes de microscopie, cytométrie de flux, trieur de cellules, PCR quantitative en temps réel, ...), ce qui facilite la réalisation des expériences.

II – Déroulement, Gestion et Coût du projet

1. Préparation et cadrage du projet

Les principales méthodes maîtrisées

A mon arrivée au laboratoire, l'équipe avait déjà de grandes compétences en caractérisation phénotypique et fonctionnelle des Treg. Sachant que les Treg représentent ~1 % des cellules du sang, nous savions que nous aurions besoin de grandes quantités de sang afin de mener à bien le projet. Pour cela, nous nous sommes rapprochés de l'Etablissement Français du Sang (EFS), afin de signer une convention avec eux pour la récupération de poche de sang total (~500mL).

Un autre aspect limitant de mon projet de thèse le développement de lignées effectrices TCD4+ stimulées par notre cocktail peptidique. Cette démarche nécessite l'isolement des cellules TCD4+ et des stimulations hebdomadaires par nos peptides et ce pendant 21 jours afin d'obtenir nos lignées TCD4+ spécifiques des cellules cancéreuses EBV+.

Transfert de technologie

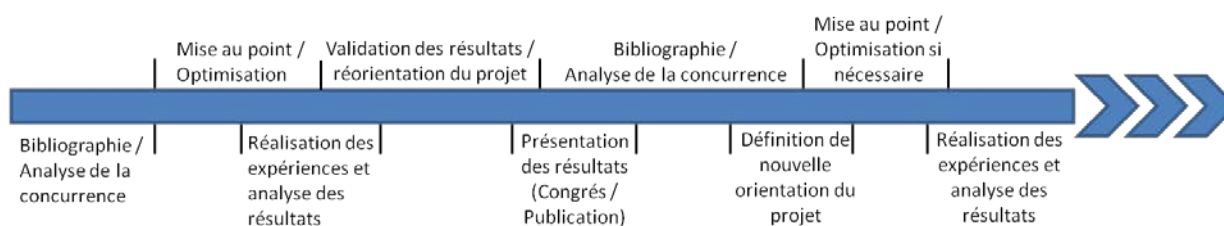
La réalisation de ce projet a nécessité la maîtrise de nouvelles technologies et techniques qui n'étaient pas disponibles au sein du laboratoire telle que l'isolement et la purification des exosomes. L'obtention de ces nanovésicules a donc nécessité un transfert de technologie à partir de l'institut Gustave Roussy auquel j'ai activement participé. Ce transfert a été rendu possible grâce à notre collaboration avec l'équipe du Dr Pierre Busson. Aujourd'hui nous sommes capables d'isoler, de purifier et de caractériser (notamment en microscopie électronique) des exosomes issus de

différentes lignées cellulaires telles que les lignées tumorales de CNP C15 et C17 qui sont des lignées xénotransplantées (cultivées dans la souris) et dont la culture dure en moyenne 45 jours. Ce transfert de technologie nous a permis d'obtenir des quantités suffisantes d'exosomes et notamment tumoraux, outil indispensable dans mon projet. De plus, aucune publication scientifique n'a décrit l'interaction des exosomes avec les Treg et ce manque de données scientifiques confirmait bien la pertinence de la démarche que nous avons entreprise au laboratoire. Je savais donc que mon travail de thèse intéressait le monde scientifique et médical et qu'il était donc fortement susceptible de se concrétiser par des publications d'articles scientifiques.

2. Conduite du projet

Les différentes étapes du projet

Le déroulement de mon projet de recherche s'est fait en plusieurs étapes (voir schéma ci-dessous). En effet, j'ai tout d'abord étudié la concurrence nationale et internationale, afin de savoir ce qui était connu sur le sujet et si le projet valait la peine d'être lancé. Il a également été très important de définir les moyens à mettre en œuvre, aussi bien techniques que financiers et de procéder à des mises au point techniques si nécessaire. J'ai ensuite commencé les premières expériences sur le projet, toujours suivies par une analyse des résultats et si nécessaire une réorientation du projet. Une fois que les résultats obtenus ont été validés (statistiques) et suffisants, j'ai alors rédigé un article qui a été publié dans un journal scientifique et présenté mes résultats dans différents congrès nationaux et internationaux. J'ai ensuite continué le projet en réitérant ces différentes étapes, qui peuvent d'ailleurs se superposer dans le temps. Tout au long de la thèse, le schéma suivi a donc été celui ci :



Les points d'avancement

Des points d'avancement des travaux, hebdomadaires et collectifs, sont animés par ma responsable scientifique : discussions sur les résultats obtenus, proposition des futures expériences et réflexion sur leur faisabilité (temps, financier), réflexion scientifique, ... Ces réunions permettent une réflexion mutuelle dans le groupe, aussi bien sur son propre projet que sur les autres projets, ceci permet donc d'avoir un « regard neuf » sur les résultats et peut être des propositions de d'évolution du sujet que nous ne soupçonnions pas.

Par ailleurs, j'ai réalisé des points d'avancement scientifiques avec nos collaborateurs, ce qui a permis bien souvent de donner une nouvelle orientation au projet, ou de mettre le doigt sur des résultats importants qui ne nous avaient pas alerté.

Tout au long de ma thèse, il a également fallu négocier avec les différents fournisseurs de produits et kits nécessaires aux recherches. En effet, le but étant d'obtenir les meilleurs tarifs et même souvent des doses d'essai de produits à tester, qui peuvent nous permettre d'améliorer nos résultats.

Gestion des problèmes

Mener à bien un projet de recherche, c'est aussi savoir gérer les difficultés que l'on peut rencontrer à différents niveaux. Sur le plan scientifique, les problèmes rencontrés étaient souvent d'ordres techniques tels que des pannes d'appareils dont il fallait attendre la réparation, ce qui nous faisait bien souvent modifier le planning des expériences ; mais aussi des expériences qui ne fonctionnent pas et pour lesquelles il a fallu réaliser des mises au point, voire même faire des formations dans d'autres laboratoires maîtrisant la technique.

3. Evaluation du coût du projet

Les dépenses

Les parts les plus importantes de dépenses sont les salaires et le matériel utilisé. Les calculs de coût en matériel et déplacements sont des valeurs moyennées (chaque expérience ou voyage étant différent) et en ce qui concerne les frais d'infrastructure, j'ai divisé le coût total pour le bâtiment par le nombre d'employés afin d'obtenir un coût par personne.

Nature de la dépense	Coûts totaux (Euros TTC)
Ressources Humaines	173160
Consommables	46000
Infrastructures	7000
Matériel (amortissements)	90300
Déplacements	4200
Formation	1400
Documentation et communication	800
TOTAL	322860

Les sources de Financement du projet

Les sources de financement du projet sont très diverses, certains financements sont obtenus chaque année, comme les financements publics (ex : CNRS) attribués en fonction du nombre de chercheurs composant l'équipe, alors que les autres financements sont demandés par l'équipe auprès de différentes associations en relation avec le sujet de travail. L'obtention de ce type de financement n'est pas systématique puisque la sélection se fait sur dossier, évalué par un comité scientifique, et le nombre de demandes est très important.

Organismes financeur	Montants (Euros TTC)
CNRS	5000
OSEO	55000
Ligue Contre le Cancer	20000
Cancéropôle Nord Ouest (déplacements congrès)	1500
Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC)	10000
Association Nationale de la Recherche Scientifique	25000
TOTAL	116500

Conclusion

L'ensemble des salaires est à la charge des employeurs et les coûts d'entretien du bâtiment sont entièrement à la charge de l'Institut de Biologie de Lille, ces frais ne sont donc pas à prendre en compte dans le budget de l'équipe.

Reste donc à la charge de l'équipe, les coûts de manipulations, les déplacements, les coûts de publications et le salaire d'un ingénieur d'étude, soit 80 000€.

Les sources de financement de l'équipe pour ce projet s'élevant à un montant de 116 500€, les frais engagés sur le projet sont donc entièrement pris en charge. La somme restante sera nécessaire pour les coûts qui seront déployés sur les 6 mois restants de la thèse, tant au niveau des manipulations, que des publications ou déplacements.

Un projet de thèse peut dans certains cas créer des bénéfices financiers pour le laboratoire, si celui-ci est exploité par des firmes privées. Dans le cas de ce projet la valorisation de l'utilisation du cocktail peptidique vaccinal dans les pathologies associées à EBV par la cellule de valorisation du CNRS est en cours. Le bénéfice direct que nous retirerons de ce travail sera la publication d'articles dans des revues internationales et donc la reconnaissance de l'équipe dans le monde scientifique.

III – Compétences, Savoir-faire, Qualités Professionnelles et Personnelles

La réalisation de ce doctorat m'a apporté de nombreuses compétences, tant au niveau professionnel qu'au niveau personnel. Seules les compétences que j'ai trouvées significatives pour piloter un projet ont été développées ci-après.

1. Compétences

Expertise Scientifique

Durant ces 3 années, j'ai pu approfondir mes connaissances, notamment en biologie cellulaire et plus particulièrement en immunologie, notamment l'immunorégulation, dans les domaines de la cancérologie (lymphomes, carcinome du nasopharynx) et de la virologie (EBV, VHC,...).

Compétences Techniques

Cette thèse m'a permis de maîtriser de nombreux outils et techniques très pointus, dans différents domaines : (i) en Biologie Cellulaire : utilisation de microscopes, isolement de cellules immunitaires (lymphocytes T CD4+, T CD8+, T régulateurs, B, ...) en utilisant différentes techniques, culture cellulaire, test de prolifération et de suppression (radioactivité), isolement et purification de nanovésicules ; (ii) en Immunologie : phénotypage (caractérisation) en cytométrie de flux (membranaire, intracellulaire), ELISA, Western Blot, immunohistochimie ; (iii) en Biologie Moléculaire : PCR quantitative en temps réel, extraction ARN, design de primers.

Par ailleurs, tout au long de mon doctorat, j'ai utilisé des matières dangereuses (radioactivité, produits chimiques toxiques et cancérigènes, virus, sang humain potentiellement contaminé). L'utilisation de ces ressources nécessite le respect méticuleux des règles d'hygiène et de sécurité (procédures de manipulation) et des règles d'éthique (réglementation sur l'utilisation de produits issus de l'Homme).

Gérer et réaliser un projet

La gestion d'un projet nécessite une grande rigueur organisationnelle de manière à assurer le bon déroulement du projet et ce dans l'échéance impartie. Pour cela, j'ai défini les ressources nécessaires (humaines, matérielles, financières, temps,...), à court terme pour une expérience, ou à moyen et long terme dans l'évolution du projet et son cadrage sur 3 années. Cette méthode de travail prévisionnelle m'a ainsi permis de prendre du recul pour acquérir une vision synthétique et stratégique de mon projet et gérer les priorités.

Gérer ce projet a nécessité une grande autonomie dans l'évaluation et la planification des expériences, mais également de la persévérance et de l'anticipation dans la gestion des problèmes qui peuvent être rencontrés, qu'ils soient techniques, financiers ou relationnels.

L'évolution de ce projet a demandé une veille scientifique et technologique régulière, de par la lecture de la bibliographie internationale, les discussions avec les différents partenaires (collaborateurs, commerciaux) et les congrès auxquels j'ai participé. J'ai ainsi fait évoluer mon projet en lui donnant une nouvelle orientation et en ayant un esprit critique sur mes travaux.

L'aspect financier a occupé une place importante dans la réalisation de mon projet. J'ai géré les financements provenant de divers organismes en évaluant le coût de chaque expérience avant leur réalisation. J'ai aussi eu l'occasion, de rédiger des dossiers scientifiques de demande de financement pour le laboratoire.

Travailler en équipe, Collaborer, Créer un réseau professionnel

Je me suis rapidement intégré au groupe et ai activement participé à la vie du laboratoire, (i) en terme d'organisation (gestion des commandes, des stocks, des délais de livraison et des relations avec les agents commerciaux pour négocier les prix des produits et obtenir des offres d'achats) ; (ii) sur le plan scientifique et technique, en intervenant régulièrement dans les projets de mes collègues, soit en tant que renfort technique mais plus particulièrement pour des conseils scientifiques et techniques dans leurs expérimentations.

Cette entraide fait partie intégrante du travail en équipe et est nécessaire à la mise en place d'un environnement de travail agréable. Elle a également souvent été réalisée en inter-équipe, au sein de l'UMR 8161 et avec les équipes de l'Institut Pasteur. Les personnes désireuses de réaliser des expériences en immunologie se sont souvent tournées vers moi afin d'obtenir des conseils techniques et scientifiques sur la méthodologie à adopter et m'ont parfois demandé de réaliser les expériences pour eux. Cette mise à disposition de mes compétences a été pour moi le point de départ de collaborations scientifiques et du réseau professionnel que je me suis créé.

Par ailleurs, j'ai également participé au renforcement de la collaboration avec les cliniciens, qui ont ainsi intégré mon projet.

Les collaborations établies étant très diverses, j'ai aussi régulièrement eu à adapter mon discours en fonction du type de collaborateur (médical, commercial, entraide).

Gérer une équipe : Encadrer, Former, Enseigner

Tout projet ne se réalise pas seul, c'est souvent le fruit d'un travail collectif, un travail d'équipe que le chef de projet doit gérer. En effet, tout au long de ma thèse, j'ai formé et encadré de nombreux stagiaires du BTS au Master 2 (Recherche et Professionnel). J'ai géré leurs emplois du temps et leur ai confié des « missions » selon leur niveau d'études. Je les ai également accompagnés dans la préparation du mémoire et de la soutenance de stage.

J'ai également eu la chance, dans le cadre de mon contrat doctoral, d'enseigner 64 heures à l'université de Lille1 où j'ai encadré des étudiants en Licence 1 sciences de la vie et de la terre. J'ai aussi eu la tâche de préparer les séances de travaux pratiques et de corriger les copies des comptes rendus et d'examins.

L'ensemble de ces encadrements et formation a fait naître chez moi des capacités pédagogiques que je ne connaissais pas. Cette expérience m'a également permis d'améliorer mon adaptabilité face à un public au niveau d'étude et à l'expérience professionnelle variés.

Valoriser, Exposer des Travaux

La communication et la valorisation de mon travail lors de réunions scientifiques en groupe restreint ou en congrès auprès d'un public spécialiste ou non averti, ont constitué une étape essentielle de mon projet. J'ai exposé mes travaux à plusieurs reprises, lors de congrès nationaux (français) et internationaux (anglais), sous la forme de présentations de posters ou de présentations orales dont trois en anglais.

J'ai également eu l'occasion de participer à des manifestations rassemblant des doctorants de divers horizons scientifiques (« Doctoriales » : stage de sensibilisation des docteurs au monde de l'entreprise, « Journées André Werbert » : présentation des travaux des doctorants de 2^{ème} année de thèse de l'Ecole Doctorale Biologie-Santé). La vulgarisation et la pédagogie ont alors été essentielles pour véhiculer et valoriser les résultats de mes recherches, auprès d'un public non-spécialiste.

Au cours de ma thèse, j'ai pratiqué la rédaction et la synthèse en français et en anglais : résumés en vue d'une sélection de congrès, courriels aux partenaires pour les tenir informés de l'avancée de mes travaux ou leur demander des conseils, demandes de financement, demande d'outils techniques à d'autres équipes nationales et internationales. La rédaction d'articles scientifiques et de revues en anglais sont les éléments constituant la partie la plus importante de l'exercice de rédaction que j'ai réalisé.

2. Résultats et Impact de la thèse

Mes travaux de thèse se sont soldés par la publication d'un premier article dans une revue internationale, la soumission actuelle d'un second article en attendant la finalisation d'un troisième article. Par ailleurs, mes recherches ont été présentées à huit reprises lors de congrès en France ou en Europe. Cette divulgation de mes travaux a permis au laboratoire et à nos collaborateurs d'être représenté dans le monde scientifique international dans les domaines des nanovésicules, de l'immuno-régulation et de la virologie.

Mon projet a permis de mettre en évidence la nature des deux composantes immunosuppressives majeures dans le CNP qui sont les Treg et les exosomes. On a montré qu'il y a une coopération entre ces deux composantes ce qui expliquerait l'échappement immunitaire des CNP malgré la forte présence de lymphocytes dans la tumeur. C'est pourquoi lors de la mise en place de notre stratégie d'immunothérapie peptidique, nous avons procédé à la neutralisation des exosomes en utilisant des anticorps bloquants. Ce couplage des anticorps bloquants à nos peptides vaccinaux constitue une nouvelle application de nos peptides dans une pathologie associée à EBV (le CNP) et pourra faire l'objet d'une nouvelle extension du brevet existant voire d'un nouveau brevet.

3. Pistes professionnelles envisagées

La gestion de ce projet de thèse a été, pour moi, très enrichissante aussi bien d'un point de vue scientifique (pluridisciplinarité) que d'un point de vue personnel. J'y ai appris beaucoup de choses sur moi et mes capacités à mener à bien un projet, travailler en équipe, mais surtout gérer une équipe de travail (stagiaires, techniciens), gérer les priorités et les imprévus (expériences qui ne fonctionnent pas, gestion financière, pannes de matériels, ...), organiser et planifier son emploi du temps méthodiquement et rigoureusement, ...

En parallèle, les formations que j'ai suivies au cours de mon doctorat (Doctoriales, Nouveau Chapitre de la Thèse...), m'ont ouvert d'autres opportunités d'avenir professionnel.

J'ai ainsi pu découvrir que je pouvais travailler en dehors de la recherche pure et simple mais tout en restant en lien avec mes compétences scientifiques.

Dans ce sens, un projet professionnel principal a émergé. Ma priorité après la thèse sera la recherche d'un emploi de chef de projet R&D en immunologie dans une entreprise pharmaceutique. Ce projet professionnel m'est d'autant plus proche que j'ai une formation initiale d'ingénieur en biologie industrielle qui s'est consolidé par un projet de fin d'étude de 6 mois au sein d'une industrie pharmaceutique.

Je n'écarte pas pour autant, si l'opportunité se présente, une carrière dans la recherche académique et notamment une carrière d'enseignant chercheur à l'université. Pour y parvenir, il faudra passer les concours de maître de conférence des universités. C'est pourquoi la possibilité de réaliser un stage postdoctoral en France ou à l'étranger n'est pas écartée et ce afin de consolider mon expérience dans la recherche et renforcer mon CV pour augmenter mes chances de recrutement.

Par ailleurs, je reste persuadé que l'ensemble de mes compétences est transférable dans tous les domaines de travail, même dans un autre domaine que la biologie.

RESUME

Le virus d'Epstein Barr (EBV) est impliqué dans différentes pathologies malignes qui expriment divers profils d'expression des antigènes de latence. La latence de type II, limitée à l'expression des antigènes non-immunodominants EBNA-1, LMP-1 et LMP-2, est notamment associée au Lymphome de Hodgkin (LH) et au carcinome indifférencié du nasopharynx (CNP). De nombreux arguments suggèrent que les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle primordial dans le contrôle de ces tumeurs. C'est pourquoi, nous avons privilégié une approche d'immunothérapie peptidique, basée sur la stimulation d'une réponse T CD4⁺ spécifique. Nous avons défini 6 peptides « *promiscuous* » dérivés des antigènes de latence II d'EBV et ayant une forte affinité pour les molécules HLA II. A mon arrivée au laboratoire, j'ai participé à une étude qui a montré que ces peptides étaient reconnus par les cellules T CD4⁺ mémoires et induisaient une forte sécrétion d'IFN- γ et d'IL-2. Nous avons pu générer des lignées cellulaires T CD4⁺ spécifiques des peptides et montrer leur potentiel cytotoxique. De même, aucun changement phénotypique et fonctionnel des cellules T CD4 régulatrices CD4+CD25+CD127low n'a été observé en réponse aux peptides EBV.

Le CNP est « le carcinome associé à une latence II d'EBV » et serait donc une cible préférentielle de nos peptides. Cependant, une étude a montré que les cellules de CNP sécrétaient des exosomes contenant des quantités élevées de Galectine-9 (Gal-9). Cette Gal-9, en se fixant au Tim3 des cellules T CD4⁺ Th1, induit leur mort par apoptose. Ainsi, cette production massive d'exosomes pourrait être un obstacle à l'utilisation de notre cocktail peptidique. En outre, cet environnement immunosuppresseur est aggravé par un recrutement important de lymphocytes T régulateurs qui sont associés à un mauvais pronostic dans le CNP, mais aussi dans le LH comme j'ai pu le montrer au cours de ma thèse. *Ainsi, les principaux objectifs de ma thèse se sont inscrits dans ce contexte immunosuppresseur très particulier des CNP et ont consisté (i) à étudier l'impact des exosomes tumoraux de CNP (Exo-CNP) sur le phénotype et la fonctionnalité des Treg (ii) à explorer les moyens de favoriser l'expansion et l'efficacité des effecteurs anti-tumoraux, notamment des lymphocytes T CD4⁺ Th1 anti-EBV, en proposant une stratégie d'immunothérapie peptidique.*

Dans la première partie de ma thèse, nous avons montré dans un modèle murin immunodéficient humanisé et xénotransplanté avec des tumeurs de CNP humaines, que la chimiokine CCL-20 était responsable du recrutement des Treg au sein de la tumeur. Par ailleurs, nous avons montré que les exosomes de CNP expriment la CCL-20 et sont capables de favoriser *in vitro* l'attraction des Treg via cette chimiokine. En parallèle, une première étude transcriptomique a montré que la co-culture des Treg avec des Exo-CNP induit une surexpression des gènes associés au phénotype des Treg, à leur activité suppressive et à leur recrutement. Ces données ont été confortées par des analyses fonctionnelles montrant que les Exo-CNP (i) augmentent significativement l'expansion des Treg, tout en étant insensibles à la suppression induite par ces exosomes, (ii) augmentent significativement le niveau d'expression du CD25 et du FoxP3 sur les Treg, (iv) conduisent à la conversion des cellules T CD4+CD25neg en Treg CD4+CD25high présentant une activité suppressive importante sur des PBMC autologues. Et enfin, l'ensemble de ces résultats a été corrélé à une augmentation significative de l'activité suppressive des Treg en présence des exosomes de CNP.

Dans la deuxième partie de ma thèse, nous avons validé *ex vivo* l'immunogénicité des peptides sur des cellules immunitaires humaines, comme l'atteste l'induction de la prolifération des PBMC et la production de l'IFN γ , cytokine principalement produite dans un contexte anti-tumoral. Les résultats obtenus montrent également que des lignées T CD4⁺ humaines spécifiques d'EBV induisent une lyse des cellules de CNP EBV+. Et, de façon inattendue, la présence des Exo-CNP ne semble pas altérer les capacités de lyse des lignées. Enfin, nous avons pu valider l'efficacité des peptides dans un modèle *in vivo*. En effet, nous avons évalué l'effet anti-tumoral de la vaccination par les peptides dérivés d'EBV en mesurant l'évolution des masses tumorales. Nous avons pu montrer, par deux approches complémentaires, que la reconstitution immunitaire des souris SCID-CNP couplée à la vaccination peptidique permet la stabilisation de la croissance tumorale au cours du temps.

En conclusion, la mise en évidence d'une coopération entre les exosomes de CNP et les Treg est très importante car elle pourrait être impliquée dans la régulation de la tolérance périphérique des tumeurs et représenter ainsi un nouveau mécanisme d'échappement du CNP au système immunitaire. Par ailleurs, nos résultats consolident l'efficacité des peptides EBV qui pourraient être utilisés, à terme, dans une stratégie de vaccination peptidique ou de thérapie cellulaire en complément des traitements de référence, à la fois chez les patients réfractaires, pour contrôler la maladie résiduelle mais aussi chez les patients présentant des rechutes, malheureusement très fréquentes et très agressives dans le CNP.