

**THESE**  
**pour le**  
**DIPLÔME D'ETAT**  
**DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
**par**  
**Anne-Lise RUELLAN**

*Présentée et soutenue publiquement le 31 mars 2006*

**Ciblage du système Interleukine-2/récepteur :  
enjeux thérapeutiques et préventifs dans le rejet  
d'allogreffe et les hémopathies malignes**

**Président :** Monsieur Alain FAIVRE-CHAUVET, Maître de Conférence de Biophysique

**Membres du jury :** Monsieur François DAVODEAU, chargé de recherche INSERM

Madame Françoise NAZIH, Maître de Conférence de Biochimie

Monsieur Patrick PARERE, Pharmacien d'officine à Rezé

## **TABLE DES ILLUSTRATIONS**

### Figures

<b>Figure 1</b> -Hématopoïèse du système immunitaire (d'après Goldsby et al. 2000)	9
<b>Figure 2</b> -Représentation de la structure tridimensionnelle des domaines externes d'une molécule de HLA humain d'après une analyse de cristallographie par rayons X. (d'après Goldsby et al.2000).	12
<b>Figure 3</b> - Voie de présentation des antigènes associés aux molécules de CMH I. Les protéines sont dégradées par le protéasome. (d'après Berzofsky et al., 2004).	13
<b>Figure 4</b> - Structure du thymus (d'après Janeway et al.1999).	18
<b>Figure 5</b> - La tolérance centrale (d'après Lebranchu Y. 2004).	19
<b>Figure 6</b> - L'ignorance : absence de rencontre entre cellules présentatrices professionnelles et LT due à une compartimentalisation. (d'après Lebranchu Y. 2004).	22
<b>Figure 7</b> - La réponse immune agressive.(d'après Lebranchu Y. 2004).	23
<b>Figure 8</b> - L'anergie (d'après Macian et al. 2002).	24
<b>Figure 9</b> -La délétion clonale : processus physiologique nécessaire pour éliminer les lymphocytes activés après la destruction du stimulus immunitaire.(d'après Lebranchu Y. 2004).	25
<b>Figure 10</b> - L'apoptose active : AICD (Activation-induced Cell Death). D'après Lebranchu Y. 2004.	26
<b>Figure 11</b> -Rôle des corécepteurs dans l'affinité de liaison du TCR et interactions entre le récepteur des cellules T et le complexe peptide-CMH et de diverses molécules accessoires avec leurs ligands sur une cellule présentatrice d'antigènes.	28
<b>Figure 12</b> - Vue d'ensemble de la transduction du signal au cours de l'activation des cellules T (d'après Goldsby et al.2000).	34
<b>Figure 13</b> - Groupes ou familles de cytokines.Les feuillets représentés sous la forme rectangle et les hélices $\alpha$ sous la forme de fines flèches.(Mortier E., Thèse de doctorat, 2005)	36
<b>Figure 14</b> - Structure des récepteurs des cytokines hématopoïétiques (d'après Goldsby et al., 2000).	39
<b>Figure 15</b> - Structure cristallographique de l'IL-2 humaine (Protein Data Bank (128), crystal structure at 1.99 Å resolution/Gaffen et al. 2004).	43
<b>Figure 16</b> -Fonctions physiologiques de l'IL-2 dans le système immunitaire	49
<b>Figure 17</b> - Promoteur du gène de l'IL-2. Région 5' contenant les sites de fixation des facteurs de transcription Oct, AP-1 et NF $\kappa$ B (d'après Gaffen et al.2004).	51
<b>Figure 18</b> -Structure du complexe IL-2/IL-2R $\alpha$ .(d'après Rickert et al.2005).	56
<b>Figure 19</b> -Schéma des voies transduction auxquelles participent le système IL-2.	67
<b>Figure 20</b> -Représentation schématique des mécanismes de rejet de greffes	74
<b>Figure 21</b> - La coopération entre anergie, apoptose et régulation. (d'après Lebranchu Y. 2004).	78
<b>Figure 22</b> - Les deux phases d'induction et de maintien de la tolérance périphérique (D'après Lebranchu Y. 2004)	80
<b>Figure 23</b> -Structure chimique de la ciclosporine	83
<b>Figure 24</b> - Structure chimique du tacrolimus (FK 506).	86
<b>Figure 25</b> -Structure chimique de l'azathioprine	88
<b>Figure 26</b> -Structure chimique de la prednisonne	90
<b>Figure 27</b> -Structure chimique des inhibiteurs de la mTOR.	91
<b>Figure 28</b> -Structure du basiliximab. (Laboratoire Roche)	93
<b>Figure 30</b> - Mécanisme d'action du daclizumab : liaison spécifique à la chaîne réceptrice alpha du complexe récepteur de l'IL-2. A. Avant fixation. B. Après fixation.	96
<b>Figure 31</b> - Mécanisme d'action des immunosuppresseurs	99
<b>Figure 32</b> - Parcours et dépôts d'énergie des particules bêta (Faible TEL) sur des cellules isolées ou regroupées en amas.	100
<b>Figure 33</b> - Parcours et dépôts d'énergie des particules alpha (Fort TEL) sur des cellules isolées ou regroupées en amas.	106

### Tableaux

<b>Tableau 1</b> - Définitions	69
<b>Tableau 2</b> - Radioéléments et utilisés dans les protocoles de RIT.	107
<b>Tableau 3</b> - Résultats au traitement par le LMB2 chez divers patients atteints d'hémopathies malignes (d'après Kreitman et al 2000)	126

# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>6</b>

## **Introduction à l'immunobiologie** **8**

<b>A . Le systeme immunitaire</b>	<b>8</b>
I. Principaux éléments du système immunitaire	11
I.1. Les cellules présentant l'antigène	11
I.2. Les lymphocytes T	11
I.2.1. Les antigènes reconnus par les lymphocytes T	11
I.2.2. Les lymphocytes T CD8+	13
I.2.3. Les lymphocytes T CD4+	14
I.3. Les lymphocytes B	14
I.4. Les cellules NK	15
I.5. Les cytokines	15
<b>B .developpement deS Lymphocytes T et education thymique</b>	<b>16</b>
I. Principe de sélection thymique	17
II. Acquisition du récepteur à l'antigène et discrimination du "soi" et du "non soi"	19
II.1. La sélection positive	20
II.2. La sélection négative	20
III. La tolérance périphérique	21
III.1. L'ignorance immune	21
III.2. L'anergie	22
III.3. L'apoptose	24
III.4. La suppression par les lymphocytes T régulateurs	26
IV. Activation des cellules effectrices du système immunitaire	27
IV.1. Activation des lymphocytes T CD4+	27
IV.2. Activation des lymphocytes T CD8+	30
IV.3. Activation des lymphocytes B	31
V. Signalisation intracellulaire des lymphocytes T	32

## **Les cytokines hématopoïétiques** **31**

<b>A .Généralités</b>	<b>31</b>
I. Les cytokines	31
II. Les récepteurs de cytokines	33
III. Les cytokines hématopoïétiques	34
III.1. Caractéristiques de cytokines hématopoïétiques	34
III.2. Les récepteurs des cytokines hématopoïétiques	35
III.2.1. Structure des chaînes réceptrices	35
III.2.2. Les familles de récepteurs hématopoïétiques	36

## **Le Système Interleukine-2** **38**

<b>A</b>	<b>.L'interleukine 2</b>	<b>38</b>
I.	Structure	38
II.	Fonctions et rôles physiologiques de l'IL-2 dans le SI	40
II.1.	Les lymphocytes T	40
II.1.1.	<i>Le rôle de facteur de croissance de l'IL-2</i>	40
II.1.2.	<i>L'activité anti-nergique de l'IL-2</i>	41
II.1.3.	<i>Induction de la mort programmée (apoptose)</i>	41
II.1.4.	<i>La régulation du cycle cellulaire par l'IL-2</i>	41
II.2.	Les lymphocytes T CD4+/CD25+(Treg)	42
II.2.1.	<i>Rôle des lymphocytes T CD4+/CD25+(Treg)</i>	42
II.2.2.	<i>IL-2 et lymphocytes T régulateurs : nouveau concept</i>	43
II.3.	Les cellules NK (Natural Killer)	43
II.4.	Les lymphocytes B	44
II.5.	Les monocytes	45
III.	Régulation de l'expression de l'IL-2	46
III.1.	Les molécules de co-stimulation	46
III.2.	Les molécules endogènes inhibitrices et activatrices	47
III.2.7.	<i>Les molécules inhibitrices</i>	47
III.2.8.	<i>Les molécules activatrices</i>	48
<b>B</b>	<b>.Le récepteur de l'interleukine 2</b>	<b>49</b>
I.	Les trois formes du récepteur de l'IL-2	49
II.	La structure du récepteur de l'IL-2	50
II.1.	La chaîne privée du récepteur de l'IL-2 : l'IL-2R $\alpha$ (Tac ; P55; CD25)	50
II.1.1.	<i>Mise en évidence</i>	50
II.1.2.	<i>Constitution</i>	51
II.1.31.	<i>Rôle physiologique</i>	52
II.2.	La chaîne réceptrice de l'IL-2 commune au récepteur de l'IL-15 : l'IL-2R $\beta$ (p75 ; CD122)	53
II.2.1.	<i>Mise en évidence</i>	53
II.2.2.	<i>Constitution</i>	53
II.3.	La sous-unité $\gamma$ c (Common $\gamma$ , p64, CD132)	54
II.3.1.	<i>Constitution</i>	54
II.3.2.	<i>Rôle physiologique</i>	54
III.	Le récepteur soluble de l'IL-2 (sIL-2R $\alpha$ ) : propriétés et implications dans les pathologies	55
IV.	Signalisation intra-cellulaire par le système IL-2	57
IV.1.	Les domaines cytoplasmiques des sous-unités $\beta$ et $\gamma$ c	58
IV.1.1.	<i>La chaîne réceptrice <math>\beta</math></i>	58
IV.1.2.	<i>La chaîne réceptrice <math>\gamma</math>c</i>	59
IV.2.	Les différentes voies de transduction du système IL-2	59
IV.2.1.	<i>Les tyrosine-kinases Jak1 et Jak3</i>	59
IV.2.2.	<i>Les facteurs de transcription cytoplasmiques STATs</i>	60
IV.2.3.	<i>Les sérine/thréonine kinases MAPKs</i>	61
IV.2.4.	<i>La kinase PI3-K</i>	62

## **Ciblage du récepteur de l'IL-2 dans la prévention du rejet de greffe** **64**

<b>A</b>	<b>.Mecanismes immunologiques du rejet de greffe</b>	<b>64</b>
I.	Antigènes exprimés par les cellules du greffon	65
I.1.	Antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH ou HLA)	65
I.2.	Les antigènes des groupes sanguins	66
I.2.1.	<i>Le système ABO</i>	66
I.2.2.	<i>Autres systèmes antigéniques des groupes sanguins</i>	66
I.3.	Les antigènes mineurs d'histocompatibilité	67
II.	Les aspects du rejet de greffe	67
II.1.	La présentation directe	67

II.2.	La présentation indirecte	68
III.	Mécanismes impliqués dans le rejet de greffe	68
III.1.	Phase de sensibilisation	68
III.2.	La phase effectrice	69
IV.	Manifestations cliniques du rejet du greffon	71
IV.1.	Le rejet hyperaigu	71
IV.2.	Le rejet aigu	71
IV.3.	Le rejet chronique	72
IV.4.	GVHD (graft-versus-host disease).	72
<b>B</b>	<b>. Implication pour la transplantation</b>	<b>73</b>
I.	Les Aspects expérimentaux	73
II.	Anergie, apoptose et régulation	74
III.	Les perspectives	75
<b>C</b>	<b>. Immunosuppression et IL-2</b>	<b>77</b>
I.	Les inhibiteurs de l'IL-2	78
I.1.	La ciclosporine A (CsA - Néoral® ; Sandimmun®)	79
I.2.	Le tacrolimus ou FK 506 (Prograf®)	82
II.	Les anti-métabolites	84
II.1.	Le mycophénolate mofétil (Cellcept®)	84
II.2.	L'azathioprine (Imurel® ; Imuran®)	85
III.	Les corticostéroïdes	86
IV.	Les inhibiteurs de la mTOR (mammalian target of rapamycin)	87
IV.1.	Le sirolimus (Rapamune®)	87
IV.2.	L'évérolimus (Certican®)	87
V.	Les anticorps antilymphocytaires	89
V.1.	OKT3 et ATG	89
V.2.	Les antagonistes du récepteur de l'IL-2	90
V.2.1.	<i>Le Basiliximab (Simulect®)</i>	91
V.2.2.	<i>Le daclizumab (Zenapax®)</i>	92
	<b>Ciblage du récepteur de l'IL-2 en cancérologie</b>	<b>95</b>
<b>A</b>	<b>. Introduction</b>	<b>95</b>
I.	Le traitement du cancer	95
I.1.	Les traitements classiques	95
I.2.	Les associations thérapeutiques	96
I.3.	Les thérapies expérimentales	97
I.3.1.	<i>Le ciblage des néo-vaisseaux tumoraux</i>	97
I.3.2.	<i>Les inhibiteurs de tyrosine kinase</i>	97
I.3.3.	<i>Les anticorps couplés à de petites molécules toxiques</i>	98
I.3.4.	<i>La radioimmunothérapie</i>	98
I.3.5.	<i>L'immunothérapie</i>	102
II.	Les Cancers	103
II.1.	La maladie de Hodgkin	103
II.2.	Les lymphomes malins non hodgkiniens (LMNH ou lymphosarcome)	105
II.3.	Les cancers induits par le virus HTLV-1	107
II.4.	Les lymphomes cutanés T épidermotropes (CTLC)	109
II.4.1.	<i>Le mycosis fongoïde (MF)</i>	110
II.4.2.	<i>Le syndrome de Sézary</i>	110
II.5.	La leucémie lymphoïde chronique (LLC)	111
II.6.	La leucémie à tricholeucocytes (HCL, Hairy cell leukemia)	113
III.	Le ciblage du récepteur de l'IL-2 dans le traitement des hémopathies malignes	113
III.1.	Denileukin Diftitox (DAB <sub>389</sub> IL2, Ontak®)	114
III.1.1.	<i>Structure et mécanisme d'action</i>	114
III.1.2.	<i>Applications</i>	115
III.2.	L'anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2)	117

<i>III.2.1.</i>	<i>Structure et mécanisme d'action</i>	118
<i>III.2.2.</i>	<i>Applications</i>	119
<b>CONCLUSION</b>		<b>127</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>		<b>129</b>

## INTRODUCTION

Découverte en 1976 dans le surnageant de cultures de lymphocytes (Morgan et al., 1976), l'interleukine-2 (IL-2) est une cytokine qui constitue un véritable "dopant" du système immunitaire. Il a fallu attendre, comme pour l'interféron, la fin des années 80 pour qu'elle puisse être obtenue par génie génétique en quantités suffisantes, pour permettre une étude détaillée de ses mécanismes d'action au niveau moléculaire dans lesquels elle est impliquée.

Aujourd'hui ses champs d'applications cliniques ainsi que ses activités biologiques ne cessent d'évoluer. Le système IL-2/récepteur reste actuellement le système de cytokines le plus étudié, et a servi de modèle pour identifier le mécanisme de nombreuses autres cytokines. La complexité et la polyvalence de cette cytokine est le reflet de la structure multimérique de son récepteur, de la variété des voies de transduction dans laquelle elle est impliquée mais aussi celui de son activité *in vivo*.

L'IL-2 induit une stimulation et une prolifération des lymphocytes T (LT) activés et des cellules NK (*Natural killer*). L'IL-2 augmente leur activité cytotoxique. Elle stimule également la prolifération et la différenciation des lymphocytes B. Enfin, elle entraîne une cascade de sécrétions de multiples cytokines comme : l'interféron gamma, le TNF (*Tumor Necrosis Factor*), l'IL-1, l'IL-4, l'IL-6, etc. Ces cytokines ont, à la fois, des effets inhibiteurs et synergiques sur l'activité de l'IL-2.

Après le clonage du gène en 1983, la préparation d'une interleukine 2 recombinante (adesleukine) par génie génétique (Proleukin<sup>TM</sup>) a permis son utilisation en thérapie. De nombreuses études ont été ainsi entreprises en oncologie, en particulier dans le cancer du rein métastasé dont les traitements restent peu efficaces, le mélanome, et dans divers sarcomes (peu sensibles à la chimiothérapie). Des résultats initiaux prometteurs ont été publiés, plus ou moins remis en question à l'heure actuelle. Seule l'indication pour le cancer du rein métastatique est resté confirmé dans la pharmacopée française. Cependant, compte tenu des effets secondaires observés dans une pathologie d'évolution spontanée, et du faible nombre

Sde rémissions répertoriées (maximum 30%) et le plus souvent, de courte durée, certains doutent des indications réelles de l'IL-2 dans les métastases rénales. Le protocole PERCY Quattro vient d'être présenté à l'ASCO 2005 par le Docteur Negrier et montre l'absence complète d'efficacité de l'IL-2. Par ailleurs, en situation adjuvante, le Groupe allemand pour la chimiothérapie du cancer du rein (DGCIN) a publié également des résultats négatifs. Les essais actuels s'orientent donc davantage vers le traitement de pathologies cancéreuses comme la leucémie lymphoïde chronique ou la maladie de Hodgkin.

En transplantation d'organe, la 6-mercaptopurine en association avec les corticoïdes, a longtemps été le traitement immunosuppresseur chimique de référence. Puis les anticorps polyclonaux (1970), la ciclosporine et enfin les anticorps monoclonaux (1980), dirigés contre des sous-population lymphocytaires, leurs récepteurs et/ou les cytokines, ont permis d'obtenir une immunosuppression plus spécifique en diminuant morbidité et mortalité associées. Depuis 1990, de nouveaux médicaments immunosuppresseurs d'action élective et puissante sont apparus (FK 506, mycophénolate, rapamycine). Leur intérêt est en cours d'évaluation. Ces traitements inhibent la sécrétion de différentes lymphokines, notamment l'IL-2, nécessaire à l'amplification de la réponse immune et la prolifération des cellules effectrices dirigées contre les greffons.

Il a été démontré également que des taux sériques élevés d'IL-2 pouvaient être associés à la progression de pathologies auto-immunes telles que la sclérodermie ou l'arthrite rhumatoïde (Tebib et al.1991). Il est important également de noter que les taux sériques du récepteur soluble de l'IL-2 ont été étudiés dans de nombreuses pathologies auto-immunes. Dans la plupart des cas, l'augmentation de ce récepteur sous forme soluble peut être associée à la sévérité de la pathologie et peut être ainsi considéré comme facteur pronostic (Rubin et al., 1990). Le système IL-2 constitue donc un champ d'application thérapeutique novateur et fait aujourd'hui l'objet de nombreux protocoles cliniques.

Ainsi, après une brève introduction à l'immunobiologie et le système de cytokines, une présentation du système de l'IL-2 permettra de mieux comprendre ses applications actuelles. La seconde partie de ce mémoire sera consacrée à l'étude du ciblage du complexe récepteur dans le cadre de transplantations d'organes et dans le traitement des hémopathies malignes.

## Introduction à l'immunobiologie

### ***A . LE SYSTEME IMMUNITAIRE***

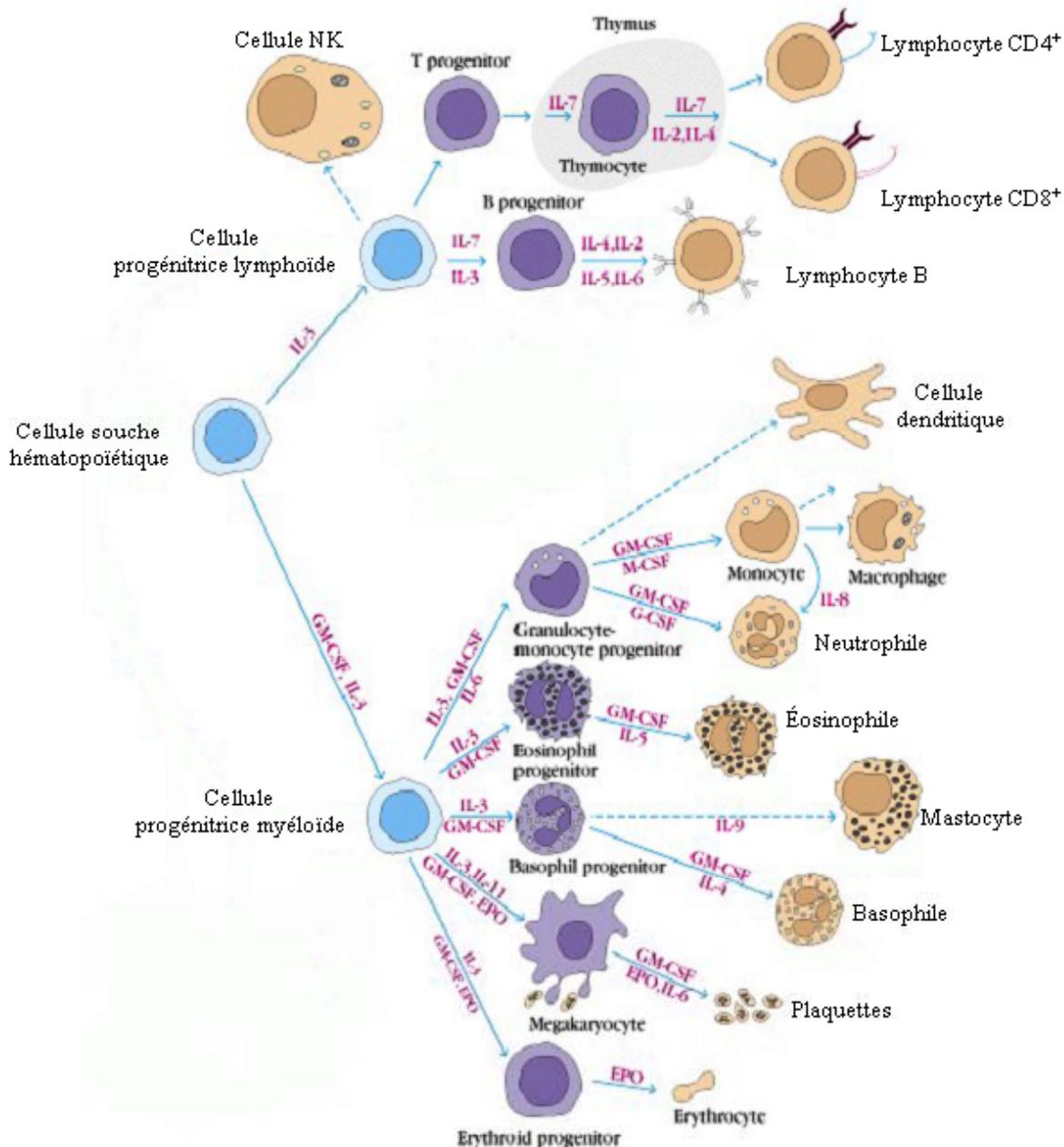
Le système immunitaire sert de défense contre les organismes pathogènes étrangers infectant l'individu. Ce système de défense est capable de discriminer ce qui appartient au "soi" de ce qui appartient au "non soi". Les cellules du système immunitaire sont toutes issues de la moelle osseuse. Ces cellules mûrissent et migrent dans différents tissus lymphoïdes, où elles effectuent leurs fonctions respectives.

Une réponse immunitaire spécifique, caractérisée par la production d'anticorps contre un pathogène spécifique, est considérée comme une réponse immunitaire adaptative ou acquise puisqu'elle apparaît au cours de la vie d'un individu comme un mode de résistance à l'infection par ce pathogène. La plupart du temps, cette réponse immunitaire adaptative procure une protection immunitaire à vie contre toute réinfection par le même pathogène. Les anticorps ne sont produits qu'après une infection et sont spécifiques du pathogène infectieux. Les anticorps présents chez une personne donnée sont donc le reflet direct des infections auxquelles elle a été exposée. De nombreux micro-organismes sont ingérés et digérés par les cellules phagocytaires : les macrophages. Ces cellules sont immédiatement disponibles pour combattre un grand nombre de pathogènes sans avoir besoin d'une exposition préalable. Les macrophages sont les acteurs clés du système immunitaire naturel.

Les réponses immunitaires innées et adaptatives dépendent toutes les deux de l'activité des globules blancs du sang, ou leucocytes. L'immunité innée implique les granulocytes (ou leucocytes polynucléaires) macrophages et cellules Natural Killer (NK). L'immunité adaptative dépend quant à elle, des lymphocytes B et T. Ces cellules sont responsables de la mémoire immunologique, suite à l'exposition à une maladie ou à une vaccination (Janeway et al.2003). Ces cellules expriment des récepteurs spécifiques de certains constituants retrouvés chez un grand nombre de pathogènes tel que le récepteur au mannose présent dans les parois des bactéries ou le LPS (LipoPolySaccharide).

Toutes les cellules du système immunitaire sont issues des cellules souches hématopoïétiques (cellules présentes dans la moelle osseuse). Ces cellules souches peuvent se

différencier en cellules progénitrices, qui donneront ensuite naissance à différents types cellulaires. Les progénitrices myéloïdes sont entre autre les précurseurs des granulocytes, des macrophages, des cellules dendritiques et des mastocytes du système immunitaire (Janeway et al. 2001). Les progénitrices lymphoïdes donnent naissance aux lymphocytes et aux cellules NK (Figure 1). La différenciation des lymphocytes T s'effectue au niveau du thymus, en suivant un processus complexe, tandis que les lymphocytes B se différencient au niveau de la moelle osseuse.



**Figure 1**-Hématopoïèse du système immunitaire (d'après Goldsby et al. 2000)

Les lymphocytes B sécrètent des anticorps qui sont spécifiques d'un antigène particulier présent chez un individu, et servent aussi de sentinelles en captant les protéines solubles circulantes pour activer une réponse immune.

Les lymphocytes T acquièrent au cours de leur différenciation thymique un récepteur à l'antigène très diversifié (TCR), spécifique d'un antigène particulier.

Au niveau de la lignée myéloïde, les macrophages et les cellules dendritiques ont une fonction essentielle pour le déclenchement de la réponse immunitaire (i.e. le rejet actif des antigènes étrangers). Ces cellules dites phagocytaires, ingèrent les antigènes pour les présenter aux lymphocytes dans une disposition adéquate pour générer une réponse immunitaire. On les appelle des cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

Cette fonction de présentation est indispensable au contrôle et à la régulation de la réponse lymphocytaire.

Le système immunitaire possède ainsi plusieurs caractéristiques qui augmentent son efficacité. En premier lieu, la spécificité de reconnaissance des antigènes discrimine entre les antigènes du soi et ceux du non-soi et élimine ainsi les invasions étrangères. Les lymphocytes stimulés possèdent une "mémoire" qui leur permet de répondre rapidement à une rencontre subséquente du même antigène. Le système immunitaire est enfin doté d'une capacité de reconnaissance d'une grande variété d'antigènes, ce qui lui attribue sa qualité d'adaptation.

Les systèmes immunitaires inné et adaptatif assurent donc ensemble un système de défense remarquablement efficace. La plupart des infections sont résolues par le système immunitaire inné sans causer de maladies. Celles qui ne peuvent l'être entraînent une réponse immune adaptative qui les maîtrisera et induira une mémoire immunitaire durable.

Dans le processus de rejet de greffe, les populations effectrices sont essentiellement les lymphocytes T et les CPA, qui présente à ces lymphocytes les antigènes du greffon comme agent pathogène.

La compréhension du mécanisme de rejet de greffe impose de connaître également le mécanisme de reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte T avant d'aborder plus spécifiquement le rôle de l'IL-2 et de son récepteur dans la réaction immunitaire.

## ***I. Principaux éléments du système immunitaire***

### ***I.1. Les cellules présentant l'antigène***

Les cellules de la lignée monocytes/macrophages, comprenant les monocytes du sang circulants et les macrophages tissulaires, constituent les principales cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T. L'antigène étranger est capté, internalisé, puis dégradé par une action enzymatique au sein du protéasome. Cette transformation produit des peptides qui sont ensuite exprimés à la surface des monocytes-macrophages en association avec les molécules HLA de classe II, sous forme de complexes CMH-peptide (CMH pour Complexe Majeur d'Histocompatibilité). Cette étape s'accompagne, entre autres, de la sécrétion de cytokines (*Tumor necrosis factor* alpha ou TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6) et d'enzymes (protéases, lysozyme) par le monocyte-macrophage.

### ***I.2. Les lymphocytes T***

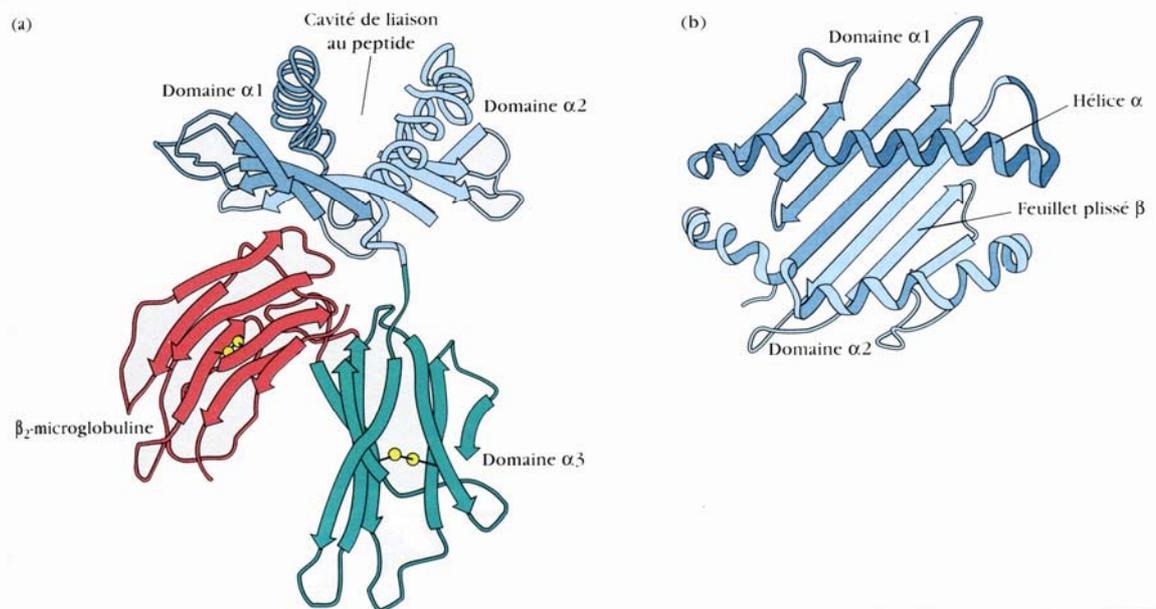
Ils ont un rôle majeur dans la réponse immunitaire cellulaire et agissent directement comme cellules effectrices. Chez l'homme, tous les lymphocytes T expriment le récepteur CD2 (LFA-2). La reconnaissance de l'antigène (complexe CMH-peptide) par les lymphocytes T s'effectue par le biais de leur TCR (*T Cell Receptor*) spécifique de l'antigène et couplé à la chaîne transmembranaire CD3. L'expression d'un complexe CD3/TCR à la surface cellulaire rend les cellules T immunologiquement fonctionnelles. Le complexe CD3 transmet à l'intérieur de la cellule un signal d'activation lorsque le TCR est stimulé par l'antigène.

#### ***I.2.1. Les antigènes reconnus par les lymphocytes T***

Les lymphocytes T ne reconnaissent pas les antigènes sous leur forme native, mais sous la forme de courtes séquences peptidiques complexées à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ces molécules sont situés sur le bras court du chromosome 6. Ces protéines sont microbiologiques et ont été découvertes par Jean Dausset en 1958. Le typage HLA d'un individu, initialement réalisé par technique sérologique ou de

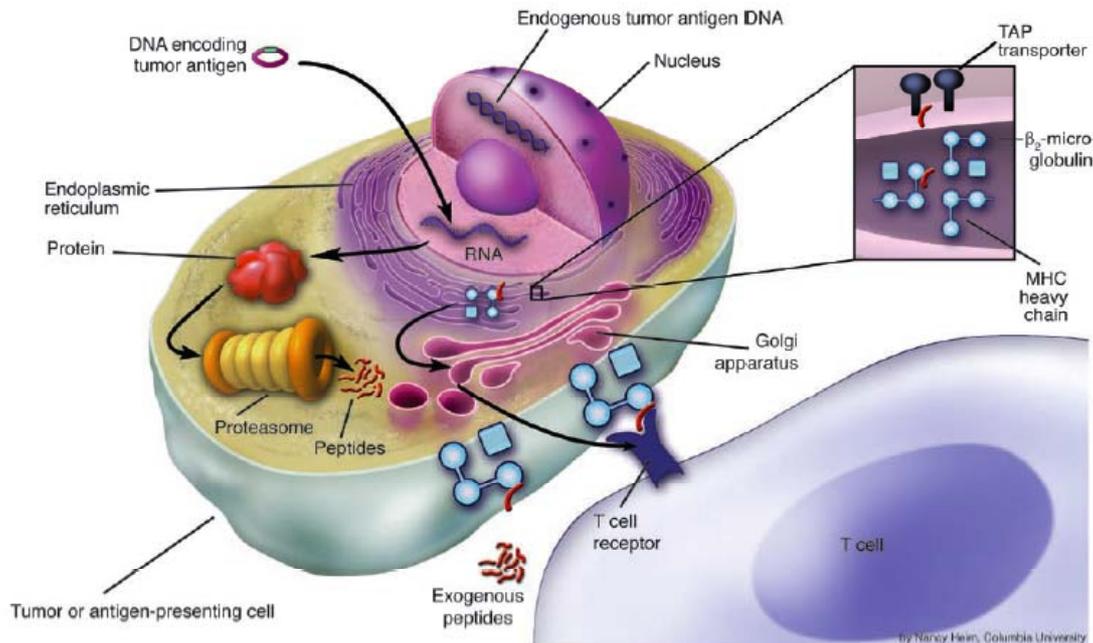
microlymphotoxicité et maintenant par biologie moléculaire, permet de définir les produits géniques issus de chaque chromosome parental et donc ses 2 haplotypes. Les complexes CMH-peptides de classe I, sont la cible de la lymphototoxicité due aux cellules T CD8+. Les antigènes HLA de classe II, qui présentent l'antigène aux cellules T CD4+, induisent la transformation blastique des cellules T dans la réaction lymphocytaire mixte.

Les antigènes HLA de classe I sont constitués de 2 chaînes polypeptidiques: une chaîne lourde de 45 kDa, codée dans le CMH, qui porte la variabilité et est associée de façon non covalente à une chaîne légère, codée en dehors du CMH (chromosome 5), identique pour toutes les molécules: la  $\beta_2$  microglobuline (Figure 2).



**Figure 2**-Représentation de la structure tridimensionnelle des domaines externes d'une molécule de HLA humain d'après une analyse de cristallographie par rayons X. (a) Vue latérale dans laquelle les brins  $\beta$  sont représentés sous la forme de flèches épaisses et les hélices  $\alpha$  sous la forme de rubans en spirales. Les liaisons dissulfures sont représentées par deux sphères interconnectées. Les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  interagissent pour former la cavité de liaison au peptide. (b) Les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  sont vus par le haut, ce qui montre la cavité de liaison au peptide constituée d'une base de brins  $\beta$  antiparallèles et de côté formés d'hélices  $\alpha$ . Dans les molécules de classe I, cette cavité peut recevoir des peptides contenant 8-10 résidus (d'après Goldsby et al.2000).

Les CMH servent donc de "carte d'identité" immunitaire. Les lymphocytes circulants sont tolérants à leurs propres CMH présentant un peptide du soi, grâce à un principe de sélection, intervenant au cours de leur différenciation. Un lymphocyte peut s'activer et engendrer une réponse immunitaire si une CPA présente un peptide étranger ou si cette CPA possède des CMH étrangers comme dans le cas de la greffe d'organes (Figure 3).



**Figure 3** - Voie de présentation des antigènes associés aux molécules de CMH I. Les protéines sont dégradées par le protéasome. Les peptides ainsi formés sont transportés, via le système TAP, dans le réticulum endoplasmique où ils sont chargés sur les molécules de CMH I néosynthétisées. Les complexes ainsi formés sont ensuite transportés à la surface de la cellule pour être reconnus par le TCR des clones LT (d'après Berzofsky et al., 2004).

### 1.2.2. Les lymphocytes T CD8+

Trente pour cent des lymphocytes T circulants expriment le récepteur CD8. Ces lymphocytes qui reconnaissent les complexes formés à partir de la production de protéines endogènes associées aux molécules du CMH de classe I. Les molécules du CMH de classe I étant exprimées par l'ensemble de cellules de l'organisme. Deux types de lymphocytes T portent le marqueur CD8: les lymphocytes T cytotoxiques exerçant une cytotoxicité directe sur les cellules cibles sans l'intermédiaire d'une cellule présentatrice d'antigènes. Les

lymphocytes T ont une fonction effectrice. Ils sont cytotoxiques vis-à-vis des cellules de l'organisme exprimant ces complexes CMH-peptides dont ils sont spécifiques.

### ***1.2.3. Les lymphocytes T CD4+***

Soixante-dix pour cent des lymphocytes T circulants expriment le marqueur CD4. Ils sont appelés lymphocytes T auxiliaires ou "helper" et reconnaissent les complexes formés à partir de la production de protéines exogènes associées aux molécules du CMH de classe II. Ils participent à la transformation des lymphocytes B en cellules productrices d'anticorps et à la différenciation des cellules T CD8+ cytotoxiques. On distingue 2 types de sous-populations lymphocytaires CD4+ selon leur profil de sécrétion de cytokines après stimulation antigénique:

- 1) les CD4+ **Th1** sécrètent de l'**IL-2**, de **l'interféron gamma (IFN gamma)**, activent les macrophages et sont également responsables de l'hypersensibilité retardée;
- 2) les lymphocytes CD4+ **Th2** sécrètent de **l'IL-4**, de **l'IL-5** et de **l'IL-10**, responsable de la production d'IgE, de la stimulation des éosinophiles et des mastocytes.

Il est également important de noter l'action inhibitrice qu'exercent les lymphocytes T CD4+ Th1 sur les Th2 et réciproquement.

### ***1.3. Les lymphocytes B***

Les lymphocytes B matures expriment à leur surface des immunoglobulines IgM ou IgD, qui jouent le rôle de récepteurs spécifiques de l'antigène ou BCR (*B Cell Receptor*), mais aussi différents marqueurs de surface, dont les molécules HLA de classe I et de classe II. Après stimulation antigénique, ils prolifèrent en présence d'IL-4 puis se différencient en plasmocytes en présence d'IL-6. Le plasmocyte sécrète initialement une IgM de surface puis lors d'une seconde stimulation antigénique (réponse secondaire) des immunoglobulines

solubles (IgG) ou d'autres immunoglobulines d'isotypes différents (IgA ou E) exprimant la même région variable qui caractérise la reconnaissance de l'antigène.

Contrairement aux lymphocytes T dont la diversité du TCR est acquise précocement au cours du processus de sélection thymique, le récepteur à l'antigène des lymphocytes B subissent au cours du processus de stimulation antigénique des modifications de deux ordres. Dans un premier temps, un processus de mutation somatique des parties variables des Ig permet une augmentation de l'affinité des BCR pour l'antigène. Il s'agit du processus de maturation d'affinité. Dans un second temps, les lymphocytes B exprimant les IgM de meilleure affinité entreprennent un processus de "switch" qui conduit, par réarrangement des gènes des Ig à associer les parties variables qui portent la spécificité du récepteur à différentes parties constantes qui définissent la fonctionnalité de l'immunoglobuline. Ainsi, la formation de l'IgG soluble permettra le développement d'une réponse humorale alors que la production d'IgE ou IgA seront préférentiellement associées à une réponse de type allergique ou sécrétoire.

#### ***1.4. Les cellules NK***

Les cellules NK représentent environ 2 % des lymphocytes périphériques circulants. Non restreintes par le système majeur d'histocompatibilité, elles n'adhèrent pas et ne phagocytent pas, mais peuvent reconnaître par leur récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines, différentes cellules cibles recouvertes d'anticorps. Leur cytotoxicité correspond alors au phénomène de cytotoxicité dépendante des anticorps (*antibody dependent cellular cytotoxicity* ou ADCC), à médiation cellulaire en l'absence de complément. Les cellules NK sont également dotées d'une activité cytotoxique, en interagissant par le biais de leur récepteur.

#### ***1.5. Les cytokines***

Rappelons que les cytokines sont des glycoprotéines solubles sécrétées par certaines sous-populations de lymphocytes T et par les monocytes. Elles agissent à distance lors d'une réaction inflammatoire mais surtout permettent l'activation des cellules du système

immunitaire (lymphocytes B, T, macrophages), des cellules responsables des réponses cytotoxiques et celles qui sont liées à l'hypersensibilité retardée.

\* **L'IL-1** sécrétée par les monocytes/macrophages, est la première cytokine intervenant dans la maturation et l'activation des lymphocytes B et T après contact antigénique et contrôle l'induction des récepteurs de l'IL-2.

\* **L'IL-2** est au centre de la réaction de rejet de greffe et représente la cible de plusieurs traitements immunosuppresseurs (ciclosporine, anticorps monoclonaux).

\* **L'IL-4** synthétisée par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th2, agit sur la prolifération des lymphocytes B, la production d'immunoglobulines et induit l'expression des antigènes de classe II. L'IL-4 peut également agir sur les macrophages en augmentant leur cytotoxicité.

\* **L'IL-6** synthétisée par les monocytes/macrophages et les lymphocytes B et T induit la prolifération des lymphocytes B et la différenciation en plasmocytes avec production d'immunoglobulines. Elle active les lymphocytes T, induit la différenciation des lymphocytes cytotoxiques et des monocytes en macrophages avec augmentation de la phagocytose.

\* **L'IFN  $\gamma$**  produit par les lymphocytes T activés, est un puissant activateur des macrophages. Il augmente l'expression des molécules de classe II à la surface des macrophages et des lymphocytes B. Il augmente également l'activité des lymphocytes cytotoxiques et des cellules NK ainsi que sa propre synthèse.

## ***B .DEVELOPPEMENT DES LYMPHOCYTES T ET EDUCATION THYMIQUE***

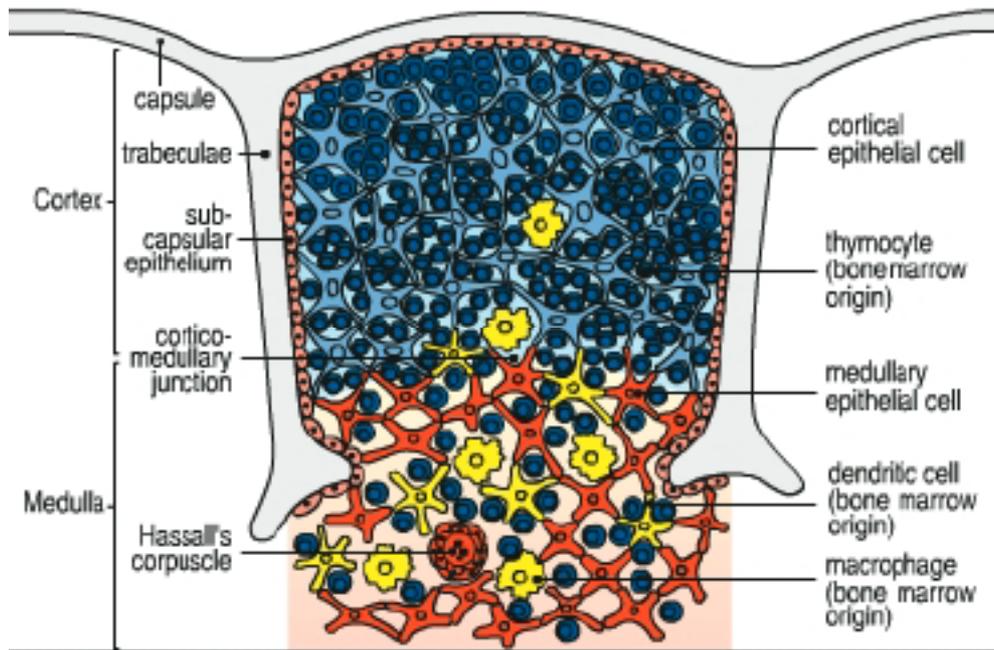
La grande diversité de reconnaissance des antigènes par les TCR et les anticorps permet aux lymphocytes T et B de réagir contre la totalité des pathogènes rencontrés tout au long de la vie d'un individu. Par contre, cette grande diversité de reconnaissance englobe la possibilité de réagir aussi contre les antigènes du soi. Au cours du développement thymique, le système immunitaire élimine par un principe de sélection, les lymphocytes réagissant trop fortement ou trop faiblement contre les antigènes du soi. Les lymphocytes sélectionnés positivement permettent la défense contre les antigènes étrangers reconnus dans un contexte CMH du soi,

tandis que la sélection négative est essentielle pour éviter les réactions auto-immunes (réactions dirigées contre des antigènes du soi).

## ***I. Principe de sélection thymique***

Les organes lymphoïdes sont des tissus organisés contenant un grand nombre de lymphocytes dans un contexte de cellules non-lymphoïdes. Ils se divisent en organes lymphoïdes primaires ou centraux (thymus et moelle osseuse) et secondaires ou périphériques (rate, ganglions lymphatiques, etc.). C'est dans les organes lymphoïdes primaires que mûrissent les lymphocytes, tandis que les réponses immunes spécifiques sont initiées dans les organes lymphoïdes secondaires. Une fois leur maturation terminée, les lymphocytes entrent dans la circulation sanguine et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires.

Les progéniteurs des lymphocytes T migrent de la moelle osseuse vers le thymus. Cette migration débute vers le 11<sup>ème</sup> jour de gestation chez la souris et entre la 8<sup>ème</sup> et la 9<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'humain. Le thymus continue à se développer durant les 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> semaines après la naissance chez la souris tandis que, chez l'humain, le thymus est complètement formé à la naissance. Après la puberté, le thymus commence à diminuer en taille, dû à une production diminuée de nouveaux lymphocytes T. Le thymus est composé de plusieurs lobules divisés en une région corticale externe, appelée le cortex thymique, et une région interne appelée médulla (Figure 4) (Goldsby et al. 2000).



**Figure 4-** Structure du thymus (d'après Janeway et al.1999).

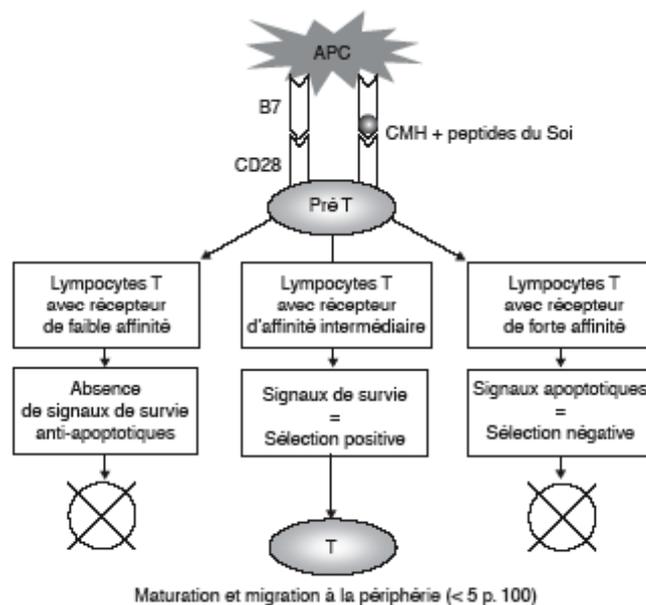
A leur arrivée au sein du thymus, les progéniteurs lymphoïdes n'expriment pas de molécules de surface caractéristiques des lymphocytes. Ces progéniteurs vont passer une première phase de maturation en lignée lymphocytaire qui dure environ une semaine. Ils vont interagir avec un réseau de cellules épithéliales dans le cortex thymique, ce qui leur permettra d'acquérir certaines molécules de surface spécifiques aux lymphocytes T. Passé ce stade, les cellules sont appelées thymocytes "doubles négatifs" puisqu'elles n'expriment pas encore le complexe CD3/TCR et le co-récepteur CD4 ou CD8. Par la suite, les thymocytes "doubles négatifs" sont subdivisés selon leur expression des molécules CD25 (récepteur de l'IL-2), CD44 (molécule d'adhésion) et c-kit (récepteur du "*stem cell factor*"). C'est à ce stade qu'intervient le réarrangement du locus  $\beta$  du TCR. Ces réarrangements conduisent à la production de la chaîne  $\beta$  du TCR spécifique de chaque lymphocyte. L'expression de cette chaîne  $\beta$  est associée à une chaîne  $\alpha$  invariante sous la forme d'un pré-TCR. A ce stade, intervient le réarrangement du locus  $\alpha$  du TCR. La production d'une chaîne  $\alpha$  fonctionnelle permettra alors aux thymocytes d'exprimer un TCR  $\alpha\beta$  fonctionnel.

L'assemblage CD3/pré-TCR engendre une prolifération et l'expression des molécules CD4 et CD8, appelés thymocytes "doubles positifs". Lorsque la prolifération s'arrête, un TCR fonctionnel se forme. Par la suite, les cellules doubles positives passent un processus de sélection positive avant de migrer vers la médulla.

## II. Acquisition du récepteur à l'antigène et discrimination du "soi" et du "non soi"

Le mécanisme physiologique de la tolérance T est initiée dans le thymus par la destruction des lymphocytes T autoréactifs, c'est-à-dire dont les récepteurs reconnaissent les complexes CMH-peptides du soi. En effet, la majeure partie des précurseurs des lymphocytes meurt dans le thymus, sous l'influence d'une double sélection, positive et négative. Les réarrangements de gènes du récepteur T génèrent environ  $10^9$  récepteurs différents, permettant de reconnaître la totalité des structures antigéniques, y compris des auto-antigènes. Dans le thymus, ces LT ou thymocytes vont être en contact avec les peptides du soi présentés par les cellules dendritiques thymiques. Schématiquement, trois cas de figure peuvent être distingués . (Figure 5) :

- 1- ceux dont le récepteur T n'interagit pas avec les complexes CMH-peptides du soi ne vont pas générer de signaux anti-apoptotiques de survie et de différenciation et vont mourir (absence de sélection positive) ;
- 2- ceux qui, au contraire, ont un récepteur de forte affinité pour les peptides du soi (auto-antigènes), vont s'activer, générer des signaux apoptotiques et mourir ;
- 3- seuls ceux qui ont un récepteur d'affinité intermédiaire vont recevoir des signaux anti-apoptotiques de survie (sélection positive), mûrir et migrer à la périphérie.



**Figure 5-** La tolérance centrale (d'après Lebranchu Y. 2004).

## ***II.1. La sélection positive***

La sélection positive permet la survie des thymocytes qui possèdent une affinité intermédiaire pour les complexes CMH de classe I et II exprimés (présentants un peptide du soi) sur les cellules épithéliales du cortex thymique. Cette sélection est nécessaire pour induire une réponse immunitaire restreinte aux molécules du CMH. Ainsi les thymocytes "doubles positifs" interagissent avec les complexes CMH I et II par leur TCR et les molécules CD8 et CD4 respectivement. Les thymocytes qui ne se lient pas aux CMH mourront par apoptose dans les jours suivants. La sélection positive permet aussi de différencier les lymphocytes en CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. Suite à leur sélection, les lymphocytes n'expriment qu'une seule de ces deux molécules. Cette discrimination dépendra du type de CMH contracté par le TCR (des thymocytes). L'interaction avec les molécules du CMH de classe I produira des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> tandis que l'interaction avec les molécules du CMH de classe II engendrera des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. La plupart des lymphocytes (> 95%) ne survivront pas à ce processus de sélection positive. Les thymocytes sélectionnés positivement passent ensuite à la médulla, où ils subiront la sélection négative.

## ***II.2. La sélection négative***

Les affinités entre les TCR et les CMH peuvent varier de faible à forte. La sélection négative permet la discrimination entre les différentes affinités et ainsi élimine les thymocytes qui réagissent fortement aux interactions entre le CMH présentant un peptide du soi. Cette sélection est importante pour développer une tolérance au soi. La médulla est composée de différents types cellulaires dont les plus importants sont les cellules dendritiques et macrophages dérivés de la moelle osseuse. Ces cellules exposent leur CMH de classe I et II et interagissent avec les thymocytes. Les mécanismes précis de la sélection négative ne sont pas encore connus mais les cellules meurent par apoptose.

Une fois ces deux sélections terminées, les lymphocytes T sont de petite taille et en état de repos. Ils sont expatriés à la périphérie et migreront dans les organes lymphoïdes

secondaires. Ils pourront donc effectuer leur tâche de reconnaissance des antigènes étrangers lors d'une infection.

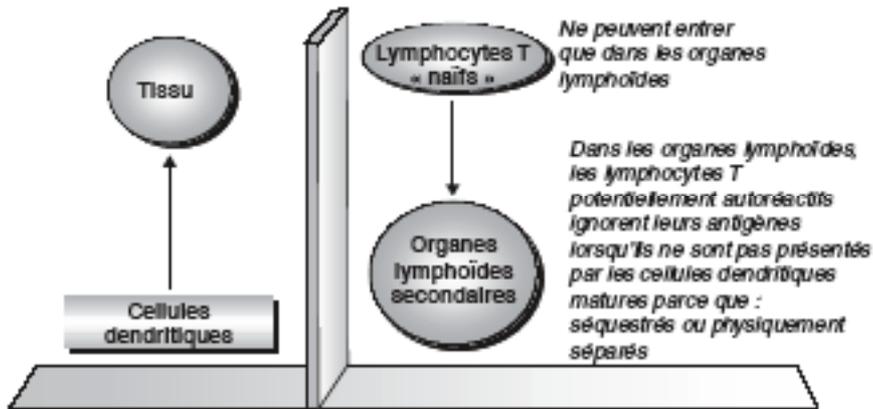
### ***III. La tolérance périphérique***

Tous les antigènes du soi ne sont pas représentés au niveau du thymus. Un certain nombre de lymphocytes T échappent à la sélection thymique négative et pourraient induire des réactions auto-immunes en l'absence de mécanismes de tolérance périphérique. Ces mécanismes sont schématiquement au nombre de quatre :

- l'ignorance immunologique
- l'anergie ou paralysie lymphocytaire
- l'apoptose ou sélection clonale
- la suppression par régulation négative

#### ***III.1. L'ignorance immune***

L'ignorance immune est liée à la compartementalisation des cellules immunitaires. Cellules dendritiques, dans les tissus où elles captent un signal danger avant de migrer dans les organes lymphoïdes secondaires en mûrissant et en s'activant, et cellules lymphocytaires naïves, uniquement dans les organes lymphoïdes secondaires (Figure 6) (Williams et al. 1997). Aussi, les lymphocytes T naïfs potentiellement auto-réactifs, ignorent leurs antigènes lorsqu'ils ne sont pas présentés par des cellules dendritiques matures parce que ces antigènes sont séquestrés ou physiquement séparés. Ce phénomène n'est probablement pas très important en transplantation. Néanmoins, on pourrait imaginer que le blocage de la migration des cellules dendritiques allogéniques, ou surtout de la sortie des organes lymphoïdes secondaires pour les lymphocytes T activés ou le blocage de l'infiltration du greffon, pourraient constituer une certaine forme d'ignorance. Par ailleurs, la destruction des lymphocytes T alloréactifs pourrait entraîner une tolérance par ignorance, probablement transitoire en l'absence de phénomènes de régulation.



**Figure 6-** L'ignorance : absence de rencontre entre cellules présentatrices professionnelles et LT due à une compartimentalisation. (d'après Lebranchu Y. 2004).

### III.2. L'anergie

L'anergie, ou paralysie lymphocytaire, est l'incapacité fonctionnelle de lymphocytes T naïfs activés par un antigène à proliférer lorsqu'ils sont restimulés par cet antigène (Schwartz et al. 1996). L'anergie est un processus en deux étapes :

Un processus d'activation "incomplète", généralement lié à l'engagement du récepteur T (signal 1) sans signaux de costimulation (signal 2), mais aussi dans certains modèles, à l'altération du premier signal par liaison du récepteur avec un ligand peptidique modifié, de faible affinité pour le récepteur (Sloan-Lancaster et al. 1996), ou par modification de la présentation peptidique par l'IL-10. Sur le plan moléculaire l'anergie nécessite l'engagement du récepteur T et la translocation nucléaire du facteur de transcription NFAT car les cellules T sans NF-AT-1 sont résistantes à l'anergie (Sloan-Lancaster et al. 1996). L'association des facteurs NF-AT et AP-1 au niveau des séquences de promoteurs de gènes de cytokines est nécessaire à une réponse immunitaire agressive. AP-1, formé de c-jun et c-fos, résulte généralement des signaux transduits par les molécules de co-stimulation (signal 2) (Figure 7). La fixation nucléaire de NF-AT seul (en l'absence d'AP-1) induit l'activation d'un nombre limité de gènes (Macian et al. 2002) qui caractérisent l'état d'anergie et inhibent l'activation ultérieure du premier signal induit par l'engagement du récepteur T (Figure 8). Les gènes induits dans l'anergie sont mal caractérisés. Les gènes Ikaros, Grg 4, Jumanji ont été

impliqués. Les mécanismes d'inhibition ultérieure du premier signal le sont aussi : induction de protéines interférant avec la signalisation intracellulaire comme des tyrosines phosphatases, la DAG kinase  $\alpha$  ou CD 98 ou d'une protéolyse par des pro-caspases 3 (Macian et al. 2002).

En transplantation le blocage de la co-stimulation induit une tolérance dans de très nombreux modèles animaux (Adams et al.2002 ; Mandelbrot et al. 2003), qu'il s'agisse du blocage de la liaison CD80-CD86/CD28 (Lin et al. 1993) ou de liaison CD 154/CD 40 (Larsen et al. 1996). Cette tolérance est généralement inhibée par la ciclosporine, ce qui souligne l'implication de la fixation nucléaire de NFAT dans ce processus de tolérance.

Néanmoins, l'induction de tolérance observée par l'association de ciclosporine et du blocage de la liaison de la molécule de co-stimulation ICoS à son ligand (Ozkaynak et al. 2001) montre que les mécanismes de tolérance périphérique induits par le blocage de la co-stimulation ne se limitent pas uniquement à l'anergie.

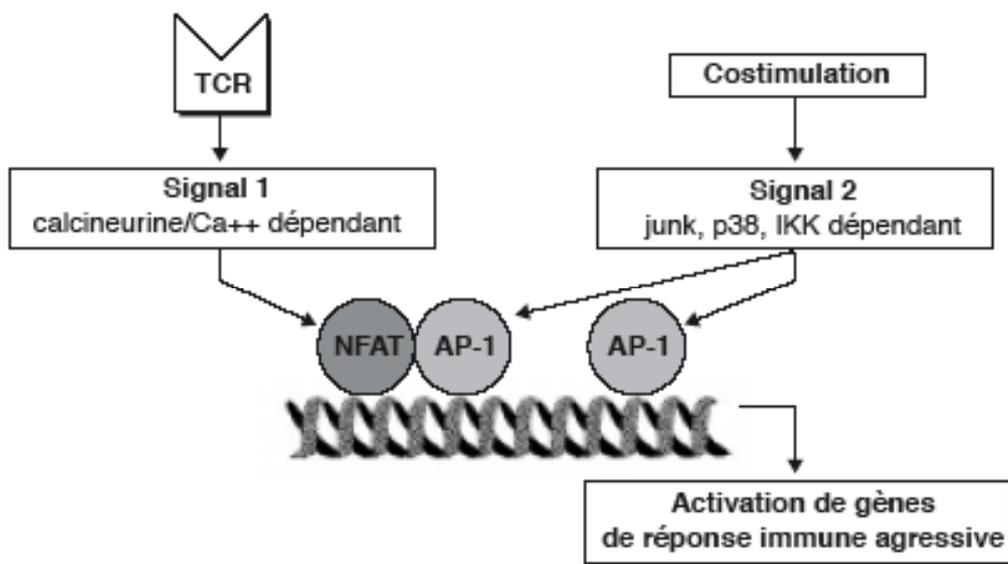


Figure 7- La réponse immune agressive.(d'après Lebranchu Y. 2004).

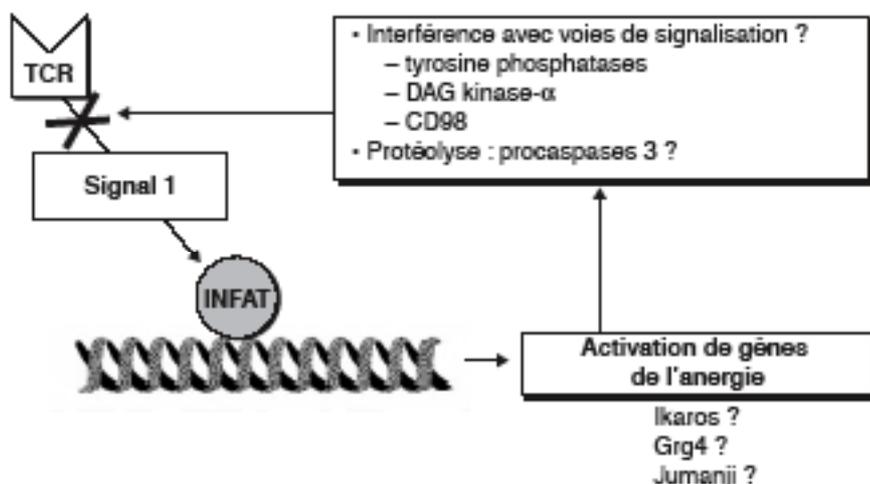


Figure 8- L'anergie (d'après Macian et al. 2002).

### III.3. L'apoptose

La délétion clonale par apoptose est un processus physiologique nécessaire pour éliminer la majorité des lymphocytes T activés, après la disparition du stimulus immunitaire qui a généré leur prolifération clonale (Figure 9). Deux mécanismes d'apoptose sont impliqués dans la délétion clonale des lymphocytes T :

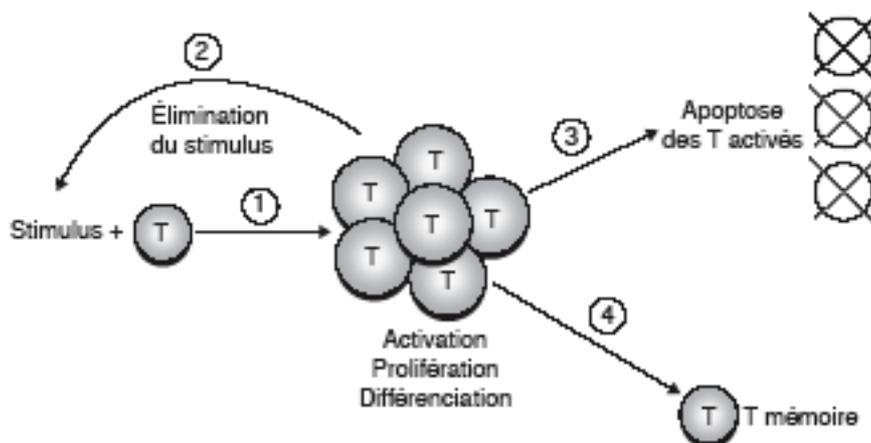
1-L'apoptose passive lorsque les cellules T sont privées de leurs facteurs de croissance (IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 et IL-21) permettant l'activation de facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-xl.

2-L'apoptose active induite par la fixation de l'IL-2 sur son récepteur (*activation-induced cell death* ou AICD) (Lechler et al. 2003). L'IL-2 est en effet indispensable et les inhibiteurs de la calcineurine bloquent l'AICD et l'induction de tolérance dans certains modèles expérimentaux (Li et al. 1999).

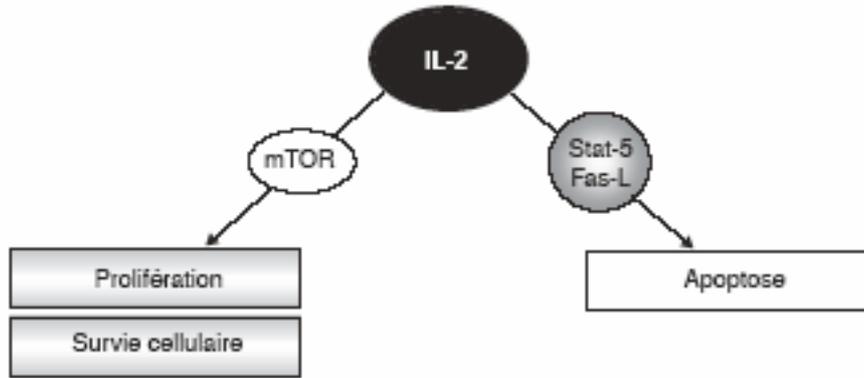
D'autre part, l'induction de la tolérance est extrêmement difficile chez les souris dont les gènes de l'IL-2 ont été inactivés (souris IL-2<sup>-/-</sup>) (Wells et al. 1999 ; Dai et al. 1998). L'induction d'apoptose par activation semble spécifique de l'IL-2 puisqu'elle n'est pas générée par d'autres interleukines, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 qui ont pourtant la même chaîne  $\gamma$  au niveau de leur récepteur. L'IL-2 et l'IL-15 semblent donc jouer des rôles différents, voire antagoniste *in vivo*, bien qu'elles aient, en plus, en commun la même chaîne  $\beta$  au niveau de leurs récepteurs (Waldmann et al. 2002). L'IL-15 pourrait induire la division et la

prolifération T et inhiber l'AICD induite par l'IL-2 tandis que l'IL-2 pourrait limiter la prolifération des lymphocytes T en diminuant l'expression de la chaîne  $\gamma c$  (Li et al. 2001). Les signaux intracellulaires induits par l'IL-2 sont donc, en partie, différents de ceux induits par l'IL-15 et les signaux d'apoptose induits par l'IL-2 sont indépendants de m-TOR (*The molecular Target of Rapamycin*) (Van Parijs et al. 1999 ; Kreisel et al. 2002). Ainsi l'inhibition de m-TOR pourrait favoriser l'apoptose active tout en évitant la prolifération cellulaire (Figure 10) (Li et al. 2001). Le principal mécanisme de l'apoptose active repose sur l'activation de Fas L (CD 178) par l'IL-2 à la surface des lymphocytes activés (Li et al. 2000). Fas L, en se liant à Fas exprimé aussi à la surface des lymphocytes, induit un signal de mort cellulaire et l'activation des caspases. Néanmoins, il existe d'autres mécanismes d'apoptose impliquant l'activation de NF- $\kappa$ B (Smiley et al.2000) puisqu'une tolérance de greffe peut être induite chez des souris ayant une mutation des gènes de Fas (Li et al.1999).

De plus, l'apoptose induite par l'IL-2 pourrait favoriser l'apparition de lymphocytes T régulateurs. En effet, les cellules apoptotiques externalisent des résidus phosphatidylsérine qui favorisent leur élimination par les phagocytes possédant des récepteurs de phosphatidylsérine. La phagocytose de ces cellules apoptotiques pourrait induire la synthèse de cytokines immunorégulatrices, telles que l'IL-10 et le TGF $\beta$ , qui suppriment la réponse inflammatoire et régulent la réponse immunitaire en favorisant l'émergence de lymphocytes T régulateurs (Chen et al.1998 ; Sauter et al. 2000).



**Figure 9**-La délétion clonale : processus physiologique nécessaire pour éliminer les lymphocytes activés après la destruction du stimulus immunitaire.(d'après Lebrnchu Y. 2004).



**Figure 10-** L'apoptose active : AICD (Activation-induced Cell Death). D'après Lebrnchu Y. 2004.

### ***III.4. La suppression par les lymphocytes T régulateurs***

Le concept de la suppression de la réponse immune agressive par les lymphocytes T a été largement développé dans les années 1970 (Gershon et al. 1970) puis abandonné en l'absence de caractérisation précise de ces cellules. Il a été remis à l'ordre du jour en 1995 par Sakaguchi qui a décrit le rôle d'une sous-population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exprimant avec une forte intensité la molécule CD25 (chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2) dans le contrôle des réactions auto-immunes de la souris (Sakaguchi et al. 1995). Les lymphocytes T ont été depuis identifiés par plusieurs groupes, à la fois dans des modèles expérimentaux de tolérance mais aussi chez des êtres humains tolérant leur greffon (Vanbuskirk et al.; Wood et al. 2003). Dans le cadre de la tolérance de greffe allogénique, les LT régulateurs prolifèrent faiblement *in vitro* lorsqu'ils sont stimulés par les cellules du donneur (les LT régulateurs sont anergiques) et sont capables, *in vitro*, de supprimer la réponse proliférative des lymphocytes aux alloantigènes (Jonuleit et al. 2001 ; Dhodapkar et al. 2001).

*In vivo*, les LT régulateurs sont capables d'induire une tolérance d'allogreffe et de la transférer à des receveurs naïfs. Cette tolérance "infectieuse" a été bien mise en évidence chez la souris par H. Waldmann (Waldmann et al. 2001 ; Graca et al. 2003). Une survie à long terme du greffon en l'absence de tout traitement immunosuppresseur continu peut être observée après blocage des corécepteurs (anticorps non déplétant anti-CD4 et anti-CD8) ou de la costimulation (anti-CD 154). Cette tolérance est suffisamment robuste pour résister à un transfert de lymphocytes de souris non tolérantes (Quin et al. 1990 ; Scully et al. 1994). Cette résistance, spécifique de l'antigène, est la marque de tolérance dominante et est médiée par

des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Graca et al. 2000 ; Qin et al. 1993 ; Chen et al.1996). De plus les lymphocytes non transfusés acquièrent des propriétés régulatrices au contact des lymphocytes T CD4 tolérants. Enfin, l'injection de LT d'animaux tolérants peut prévenir le rejet de greffe chez des receveurs lymphopéniques (Gregori et al. 2001 ; Hara et al. 2001) et inhiber les réactions de GVH (*Graft versus Host* ou réaction du greffon à l'hôte) (Taylor et al.2002, Cohen et al. 2002, Hoffman et al. 2002).

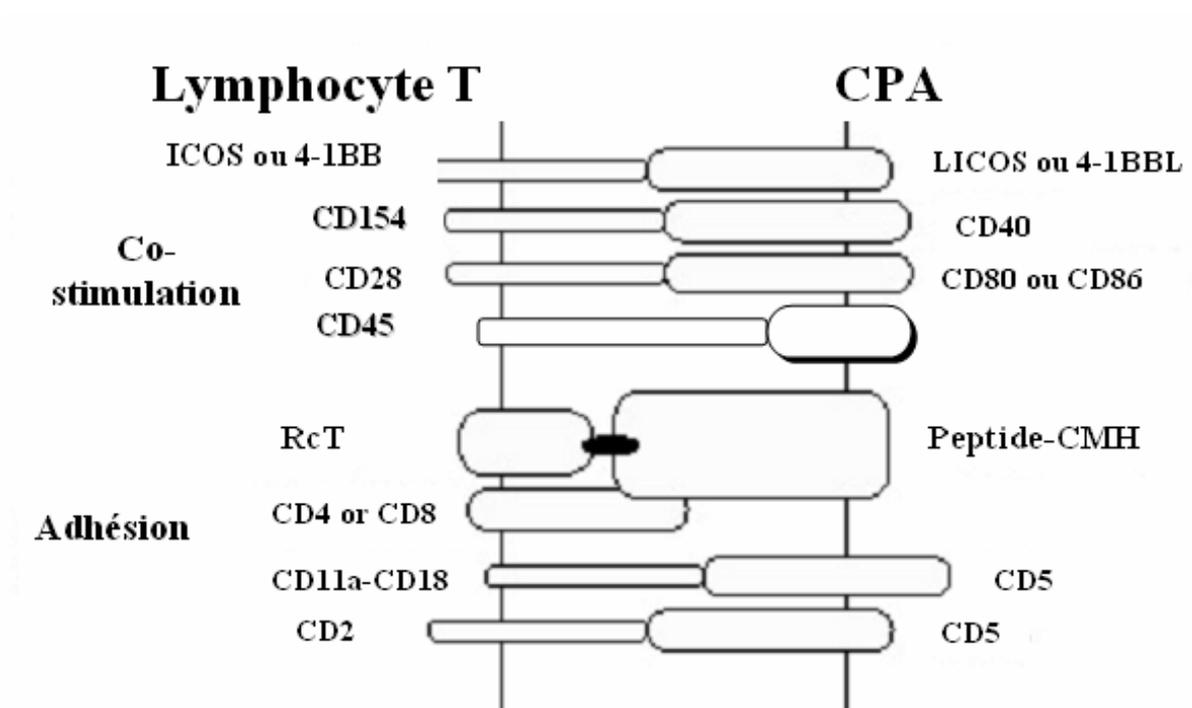
## ***IV. Activation des cellules effectrices du système immunitaire***

### ***IV.1. Activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>***

La coopération entre les cellules du système immunitaire est essentielle pour développer une réponse adéquate contre un antigène. L'activation des lymphocytes T nécessite la présentation des antigènes étrangers par une CPA (macrophage, cellule dendritique ou lymphocyte B). La capacité de ces cellules à présenter l'antigène aux lymphocytes T est conditionnée par la perception "d'un signal danger", résultant de l'agression de l'organisme par un pathogène. De manière générale, les lymphocytes T ne sont pas activés par des antigènes qui ne sont pas présentés par une CPA. L'engagement d'un TCR avec un CMH de classe II, présentant un peptide immunogène sur une CPA, constitue le "signal I". L'interaction du TCR avec le complexe CMH-peptide est renforcée par l'interaction de molécules d'adhésion, qui joue également un rôle d'amplification du signal I d'activation des lymphocytes T. Parmi celles-ci, on retrouve principalement le LFA-1 ("lymphocyte function-associated antigen-1"; CD11a-CD18), CD2 et ICAM-3 ("intracellular adhesion molecule"-CD54) sur le lymphocyte T et ICAM-1, ICAM-2, LFA-3 et DC-SIGN sur la CPA (Figure 11). Lorsqu'un lymphocyte T naïf reconnaît le peptide présenté par une CPA, il y a changement de conformation du LFA-1, ce qui augmente grandement son affinité pour ses ligands ICAM-1 et ICAM-2 (Janeway et al. 2001).

L'activation complète des lymphocytes nécessite un second signal, "signal II", appelé co-stimulation, qui doit être reçu par une CPA au moment de la reconnaissance de l'antigène par le TCR (Figure 11). Les molécules de co-stimulation les mieux caractérisées sont B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86). Les homodimères B7 font partie de la superfamille des

immunoglobulines et sont retrouvés à la surface des cellules stimulant la prolifération cellulaire (CPA). Leur récepteur sur le lymphocyte T est le CD28. Le CD28 est exprimé constitutivement sur les lymphocytes et sa liaison engendre la division cellulaire et la production d'IL-2. Lorsqu'un lymphocyte T naïf s'active, il exprime alors plusieurs protéines qui contribuent au maintien du signal de co-stimulation et permet l'expansion et la différenciation de celui-ci. Une de ces protéines est le CD154 (CD40L) dont le récepteur est le CD40 exprimé par la CPA. La liaison CD154-CD40 active le lymphocyte, mais aussi active la CPA à exprimer la molécule B7. CD154 fait partie de la famille de récepteurs TNF.



**Figure 11**-Rôle des corécepteurs dans l'affinité de liaison du TCR et interactions entre le récepteur des cellules T et le complexe peptide-CMH et de diverses molécules accessoires avec leurs ligands sur une cellule présentatrice d'antigènes. La liaison des corécepteurs CD4 et CD8 et des autres molécules accessoires à leurs ligands renforce la liaison entre les cellules qui entrent en interaction et/ou contribue à la transduction du signal qui conduit à l'activation de la cellule T.

Une autre molécule de co-stimulation des lymphocytes T est la molécule 4-1BB (CD137) qui lie 4-1BBL sur les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B activés. Comme l'interaction CD154-CD40, la liaison 4-1BB-4-1BBL est bidirectionnelle (Janeway et al. 2001). La protéine ICOS (*inducible costimulator*) est aussi reconnue comme permettant d'augmenter la réponse du lymphocyte T à une stimulation antigénique. ICOS est exprimée sur les lymphocytes T activés, et son ligand, LICOS, est exprimé sur les cellules dendritiques, les monocytes et les lymphocytes B activés. Malgré la ressemblance avec le CD28 pour induire la prolifération cellulaire, l'interaction ICOS-LICOS est différente dans sa production de cytokine. En effet, ICOS induit la production d'IL-10 tandis que CD28 induit la production d'IL-2.

La molécule CD45 est une protéine tyrosine phosphatase transmembranaire et s'exprime en plusieurs isoformes encodées par différents exons (A, B et C) (Trowbridge et al. 1994). Le CD45 joue un rôle important dans la régulation, par le TCR, de l'activation des lymphocytes T. CD45 peut déphosphoryler des sites d'auto-phosphorylation et des résidus tyrosine à régulation négative de la famille des protéines tyrosine phosphatase Src, suggérant un double rôle de la molécule CD45. Le ligand du CD45 n'est pas encore identifié.

Une molécule importante dans l'homéostasie lymphocytaire est le CTLA-4 ("*cytotoxic T-lymphocyte antigen*" 4/CD152). Le CTLA-4 s'exprime tardivement après l'activation et lie avec une avidité 20 fois plus forte les molécules B7 que peut le faire CD28. La liaison CTLA-4-B7 induit un signal négatif au lymphocyte qui diminue sa production d'IL-2 et sa prolifération (Janeway et al. 2001).

Les lymphocytes activés synthétisent des cytokines et entrent en division cellulaire. Les lymphocytes libèrent l'IL-2 et expriment la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 (CD25), permettant ainsi à cette cytokine d'agir de manière autocrine pour activer leur prolifération. Le récepteur de l'IL-2 est constitué de trois chaînes ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). Lorsque les lymphocytes sont au repos, seules les chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  sont exprimées. D'autres cytokines sont aussi exprimées par les lymphocytes T CD4+, et ces cytokines sont importantes pour stimuler les autres cellules du système immunitaire. Par exemple, la sécrétion d'IL-4 et d'IL-5 stimule l'activation des lymphocytes B reconnaissant l'antigène étranger à produire des anticorps contre cet antigène.

La libération d'IL-2 par les cellules CD4+ peut aussi activer les lymphocytes CD8+ reconnaissant un antigène étranger présenté par un CMH de classe I. La fonction des lymphocytes CD4+ réside dans l'orchestration et l'amplification des réponses immunes envers des antigènes. C'est pourquoi la communication intercellulaire est importante.

La différenciation des lymphocytes T CD4+ naïfs peut se produire en deux directions : TH1 ou TH2. Les facteurs déterminant la direction de différenciation ne sont pas complètement compris à ce jour. En outre, la présence de cytokines, les signaux de co-stimulation utilisés et la nature de la liaison du peptide avec les molécules du CMH ont tous un effet. Les conséquences d'une différenciation TH1 ou TH2 sont importantes. La production de cellules TH1 mène à une immunité cellulaire tandis que la production de cellules TH2 mène à une immunité humorale. La différence entre les cellules TH1 et TH2 réside dans les profils de cytokines produites. Les cellules TH1 sécrètent principalement l'interféron- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), l'IL-2, le TNF- $\alpha$  et le TNF- $\beta$  tandis que les cellules TH2 sécrètent principalement l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et le TGF- $\beta$  (Janeway et al. 2001).

## ***IV.2. Activation des lymphocytes T CD8+***

Les lymphocytes T CD8+ sont aussi appelés cytotoxiques (CTL pour *Cytotoxicity T Lymphocyte*), du fait de leur fonction cytolitique. La stimulation des lymphocytes CD8+ requiert un signal généré par la liaison du CMH de classe I présentant un peptide étranger, des signaux de co-stimulation et un signal généré par la liaison de l'IL-2 à son récepteur. Une cellule dendritique activée, possédant des molécules de co-stimulation, peut directement activer un lymphocyte T CD8+. La cellule T CD8+ peut alors sécréter de l'IL-2 et induire sa propre activation et différenciation. Cependant, dans la plupart des cas, l'IL-2 est produite par les lymphocytes CD4+ activés (Janeway et al. 2001).

Lorsqu'un CTL activée rencontre une cellule présentant un peptide étranger reconnu par son TCR, il libère des substances, comprises dans des granules cytoplasmiques, pour lyser et

tuer cette cellule. Ces substances incluent la perforine, qui perce la membrane des cellules cibles, et le granzyme B, qui induit l'apoptose de la cellule cible (Abbas et al. 1991). Les CTL sont efficaces pour éliminer les cellules infectées par des virus ou des parasites, inaccessibles par les anticorps. Les CTL sont aussi importantes pour le rejet de greffes allogéniques.

La sécrétion de granules cytolytiques par les CTL est le moyen le plus employé par les CTL mais deux autres mécanismes apoptotiques peuvent aussi être utilisés. Les CTL expriment Fas L et l'engagement Fas-FasL provoque l'activation des caspases et induit l'apoptose de la cellule cible. Un CTL sécrète aussi certaines cytokines, comme l'INF- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  et le TNF- $\beta$ . L'INF- $\gamma$  inhibe directement la réplication virale et induit l'expression de CMH de classe I et II. Cette cytokine active aussi les macrophages et les recrute au site d'activation. Les TNF synergisent avec l'INF- $\gamma$  pour l'activation des macrophages (Janeway et al. 2001).

### ***IV.3. Activation des lymphocytes B***

Les lymphocytes B reconnaissent les antigènes à l'aide de leur récepteur (BCR), qui est constitué, entre autres, d'une immunoglobuline. Les cellules B captent les antigènes circulants sous leur forme native et n'ont pas besoin de présentation d'antigène par les molécules du CMH. L'activation de lymphocytes B par des antigènes protéiques nécessite la coopération des cellules T CD4+. Suite à la capture de protéines solubles par le BCR, les lymphocytes B internalisent ce complexe. Celui-ci sera dégradé et présenté par les CMH de classe II. Les cellules T CD4+ reconnaissant le peptide étranger par leur TCR, présenté par les molécules du CMH de classe II sur le lymphocyte B, reçoivent aussi les signaux de co-stimulation CD154-CD40 et sécrètent l'IL-4 et l'IL-5, qui sont nécessaires à l'activation complète des lymphocytes B. Le lymphocyte B reçoit aussi un signal par son CD40, ce qui contribue à son activation. L'interaction avec le CD40 et la sécrétion de cytokines contribuent aussi au changement d'isotype des immunoglobulines par un mécanisme de "switch" impliquant une recombinaison somatique des gènes du BCR. D'autres types d'antigènes, comme le LPS induisent l'activation des lymphocytes B en liant plusieurs récepteurs sur la même cellule. Ces

lymphocytes B activés par le LPS produisent des anticorps de type IgM. Cependant ce type d'antigène n'induit pas de réponse par les cellules CD4+ ce qui empêche la formation de cellules B mémoires. Les lymphocytes B activés se divisent rapidement et se différencient en plasmocytes, cellules productrices d'anticorps, qui migrent vers la moelle.

## ***V. Signalisation intracellulaire des lymphocytes T***

L'activation lymphocytaire est un processus complexe et extrêmement régulé pour éviter des activations inutiles qui pourraient être dommageables à l'individu. Plusieurs voies intracellulaires complexes et reliées entre elles sont nécessaires pour activer un lymphocyte.

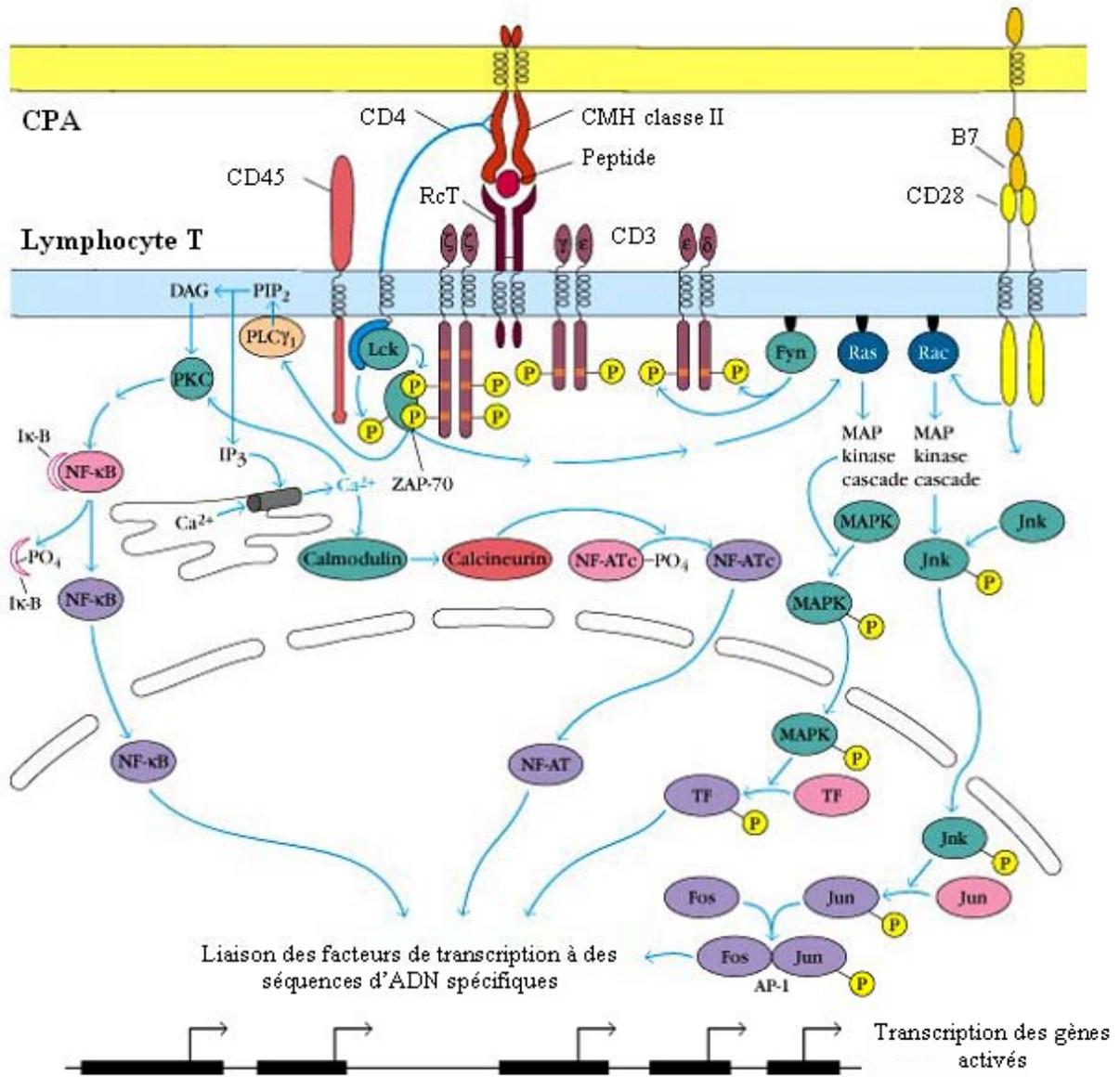
Lorsqu'un TCR et les molécules CD4+ ou CD8+ s'engagent avec une molécule du CMH présentant un peptide étranger, le complexe CD3 transduit trois types de signaux activateurs qui sont reliés entre eux et nécessaires pour stimuler le lymphocyte : (1) la phosphorylation de protéines membranaires et cytoplasmiques, (2) l'hydrolyse de phospholipides inositol de la membrane plasmique et (3) l'augmentation de la concentration du calcium cytoplasmique. Tous ces signaux stimulent la synthèse protéique ou la transcription de gènes par des cascades complexes (Figure 12). Ces signaux intracellulaires peuvent induire plusieurs événements : la prolifération, la différenciation, l'activation, l'apoptose ou l'anergie. La signalisation par un TCR ou un BCR présentent des points communs. Le plus souvent les deux voies d'activation sont hétérogènes dans les deux types lymphocytaires.

La signalisation intracellulaire, causée par la dimérisation et l'oligomérisation du récepteur, est initialement induite par l'activation de protéines tyrosine kinases (PTK) cytoplasmiques non-associées aux récepteurs. Les portions intracellulaires des molécules CD3 possèdent des ITAM ("immunoréceptor tyrosine-based activation motif"). Ces ITAM servent de substrat aux PTK, permettant le recrutement de molécules signalétiques supplémentaires via les domaines SH2 ("Src homology 2"). La protéine tyrosine phosphatase retrouvée sur la portion intracellulaire du CD45 peut réguler positivement les signaux d'activation en déphosphorylant les motifs inhibiteurs des PTK. Les PTK des familles Src (Lck et Fyn) et Syk/ZAP-70 sont impliquées dans la transduction de signaux par le TCR. Les PTK de la

La famille Src possède des domaines d'activation et d'inactivation régulés par phosphorylation et déphosphorylation. L'activation d'un lymphocyte nécessite environ 100 interactions TCR/co-récepteur-CMH avec une CPA. En absence de co-récepteur, 10 000 interactions sont nécessaires, représentant environ 10% des CMH à la surface d'une cellule. Donc, lors d'une liaison TCR/co-récepteur-peptide-CMH, Lck et Fyn phosphorylent les ITAM et ZAP-70 et est recruté par les ITAM phosphorylés. Ensuite ZAP-70 agit sur LAT (*linker activation in T cells*) et la protéine SLP-76. Par ses multiples résidus tyrosine, SLP-76 est capable de recruter d'autres protéines par leurs domaines SH2 ce qui poursuit le signal à des kinases, PLC- $\gamma$  (phospholipase C- $\gamma$ ) et Ras. PLC- $\gamma$  et Ras initient trois voies d'activation importantes qui aboutissent à l'activation de facteurs de transcription au noyau. NF $\kappa$ B, NFAT et AP-1, sont des facteurs de transcriptions qui génèrent la transcription de nouveaux gènes (Janeway et al. 2001).

La PLC- $\gamma$  a un rôle crucial dans l'amplification du signal. Cette enzyme sous forme active scinde les molécules de la membrane phospholipidique PIP2 (phosphatidylinositol biphosphate) en deux parties : IP3 (inositol triphosphate) et DAG (diacylglycerol). L'IP3, en interagissant avec son récepteur sur le réticulum endoplasmique, cause le relâchement d'ions calciques (Ca<sup>2+</sup>) en grande quantité. L'augmentation du calcium intracellulaire active la calmoduline qui, à son tour, active d'autres protéines et enzymes jusqu'à l'activation du facteur de transcription NFAT (Janeway et al. 2001).

Le DAG, pour sa part, reste associé à la surface interne de la membrane plasmique. Le DAG active les membres de la famille des protéines kinases C (PKC). Ces sérine-thréonine protéines kinases initient plusieurs voies d'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B (Janeway et al. 2001).



**Figure 12-** Vue d'ensemble de la transduction du signal au cours de l'activation des cellules T (d'après Goldsby et al.2000).

# Les cytokines hématopoïétiques

Le fonctionnement d'un organisme vivant est régi par un équilibre complexe hautement régulé entre les différentes cellules qui le constituent. Ainsi, le système immunitaire repose sur l'interaction entre les effecteurs cellulaires que sont les lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules naturelles tueuses ou NK (*Natural Killer*) et les CPA comme les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. La communication entre ces différentes cellules est assurée soit par contacts directs soit médiée par des facteurs protéiques solubles. Ces molécules transmettent leur signal via des protéines transmembranaires spécifiques, ou récepteurs. L'intégration de ces différents signaux génère un message qui aboutit à différents effets comme l'activation de la prolifération, la différenciation et la maturation fonctionnelles des cellules (induction d'activités cytotoxiques et phagocytaires, production d'anticorps, accroissement de l'hématopoïèse).

## **A .GÉNÉRALITÉS**

### **I. Les cytokines**

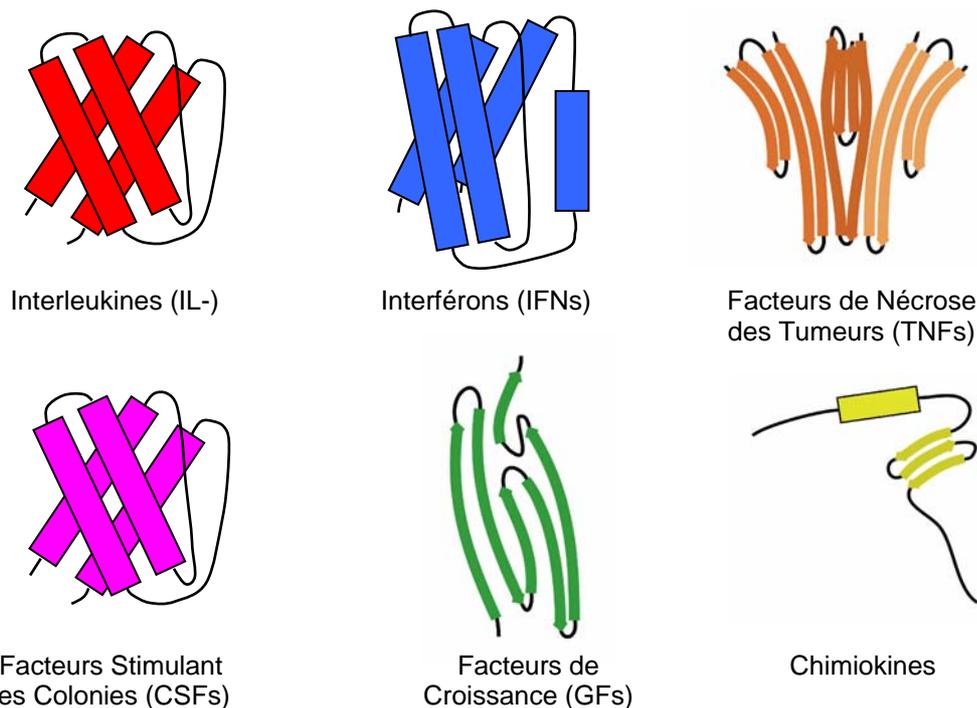
Afin d'assurer le bon fonctionnement d'un organisme multicellulaire, il est nécessaire que les cellules établissent des moyens de communication entre elles. Hormis les contacts cellulaires, les facteurs solubles jouent un rôle prépondérant dans la diffusion de l'information. Ces facteurs peuvent être différenciés en trois catégories distinctes : les hormones endocriniennes possédant une action systémique, les facteurs de croissance et les cytokines, agissant localement. Le terme de cytokine désigne un ensemble de glycoprotéines solubles ou membranaires de faibles poids moléculaires qui présentent peu ou pas de similitudes dans leur séquence en acides aminés (aa) et régulant un large spectre d'activités biologiques (prolifération, différenciation, réponses cellulaires).

Lorsqu'elles sont sécrétées, les cytokines peuvent agir à de très faibles concentrations sur les cellules avoisinantes (paracrinie) ou sur les cellules productrices elles-mêmes (autocrinie). Elles pourraient également agir à l'intérieur des cellules productrices sans être sécrétés (intracrinie). Les cytokines sont rarement produites de manière constitutive mais plutôt en réponse à une activation cellulaire qui elle-même a pu être induite en cascade par d'autres

cytokines. En effet, les cytokines peuvent réguler positivement ou négativement la production d'autres cytokines et dans certains cas réguler leur propre expression. Ce réseau de cytokines est également défini par le fait qu'une action simultanée de différentes cytokines peut aboutir à un effet additif, synergique ou antagoniste.

Les cytokines sont généralement regroupées selon leurs modes d'action et leurs fonctions biologiques. Ainsi les cytokines sont classées en six groupes ou familles (Figure 13):

- Les interleukines (IL-x)
- Les interférons (IFNs)
- Les facteurs de nécrose de tumeurs (TNFs, "Tumor Necrosis Factors")
- Les facteurs stimulant les colonies (CSFs, "Colony Stimulating Factors")
- Les facteurs de croissance (GFs, "Growth Factors")
- Les chimiokines



**Figure 13-** Groupes ou familles de cytokines. Les feuillettes représentés sous la forme rectangulaire et les hélices  $\alpha$  sous la forme de fines flèches. (Mortier E., Thèse de doctorat, 2005)

En réponse à un stimulus adéquat, la production de la cytokine qui résulte d'une synthèse *de novo* sera généralement, rapide, brève, intense et sa sécrétion sera immédiate. Hormis l'IL-1, les cytokines ne sont pas stockées à l'intérieur des cellules. Il existe cependant des cytokines qui sont exprimées de façon basale, comme celles qui sont produites par les cellules stromales du microenvironnement médullaire ou thymique. La majorité des cytokines sont des facteurs solubles sécrétés, cependant certaines peuvent se présenter sous deux formes, solubles et membranaires, toutes deux biologiquement actives.

De manière générale, l'expression des cytokines est régulée de manière transcriptionnelle. Cependant il existe des cas de régulation post-transcriptionnelle via la stabilisation d'ARNm (GM-CSF, IL-7, IL-15) ou post-translationnelle via un clivage protéolytique. Ce clivage peut être celui d'une pro-cytokine afin de libérer la cytokine mature, ou celui du domaine extra-cellulaire d'une forme membranaire permettant le relargage de la cytokine mature soluble.

Au fur et à mesure de la découverte de cytokines, de récepteurs, ou de nouveaux modes d'action et d'interaction, le réseau cytokinique apparaît de plus en plus complexe.

## ***II. Les récepteurs de cytokines***

Les cytokines exercent leur action par l'intermédiaire de récepteurs localisés à la surface des cellules. De façon similaire aux cytokines, les récepteurs membranaires peuvent être classés selon leurs homologues structurales et fonctionnelles. Ainsi les chaînes réceptrices des cytokines sont regroupées en neuf familles principales.

- **Les récepteurs des cytokines hématopoïétiques (récepteurs de classe I)** comme la chaîne gp130, la chaîne  $\beta$  commune ( $\beta_c$ ) et la chaîne  $\gamma$  commune ( $\gamma_c$ ).
- **Les récepteurs des cytokines des familles des IFNs et de l'IL-10 (récepteurs de classe II)** tels que les IFN-Rs, IL-10R, IL-30R, IL-22R, IL-28R.
- **Les récepteurs des cytokines de la superfamille des TNFs (récepteurs de classe III)** qui correspondent par exemple au TNF-R, NGF-R, Fas, CD27, CD40 et TRAIL-R.

- **Les récepteurs apparentés à la superfamille des immunoglobulines sans activité tyrosine kinase** comme les IL-1Rs et IL-18R.
- **Les récepteurs apparentés à la superfamille des immunoglobulines avec activité tyrosine kinase** qui correspondent entre autre aux M-CSF-R, EGF-R et PDGF-R.
- **Les récepteurs à activité sérine/thréonine kinase des cytokines de la famille du TGF $\beta$**  comprenant par exemple les TGF $\beta$ -R, Inh-R et Act-R.
- **Les récepteurs à domaine sushi** dont l'IL-2R $\alpha$  et l'IL-15R $\alpha$  sont les seuls membres.
- **Les récepteurs des cytokines de la famille des IL-17** (IL-17Rs).
- **Les récepteurs à sept domaines transmembranaires des chimiokines** comme le CXCR-1, les CCRs, les CX<sub>3</sub>CR-1.

### ***III. Les cytokines hématopoïétiques***

Ce travail de thèse s'est intéressé à l'étude du "système interleukine-2". L'IL-2 est une cytokine hématopoïétique à quatre hélices  $\alpha$  courtes, structurellement et fonctionnellement proche de l'IL-15 (Burton et al. 1994 ; Grabstein et al. 1994). Les récepteurs fonctionnels de l'IL-2 et de l'IL-15 partagent les chaînes transductrices IL-2R $\beta$  et  $\gamma_c$ , de la famille des récepteurs hématopoïétiques (Bamford et al ; 1994 ; Giri et al. 1994 ; Grabstein et al. 1994). Leur spécificité de réponse est conférée par leurs chaînes réceptrices spécifiques, l'IL-2R $\alpha$  et l'IL-15R $\alpha$ .

#### ***III.1. Caractéristiques de cytokines hématopoïétiques***

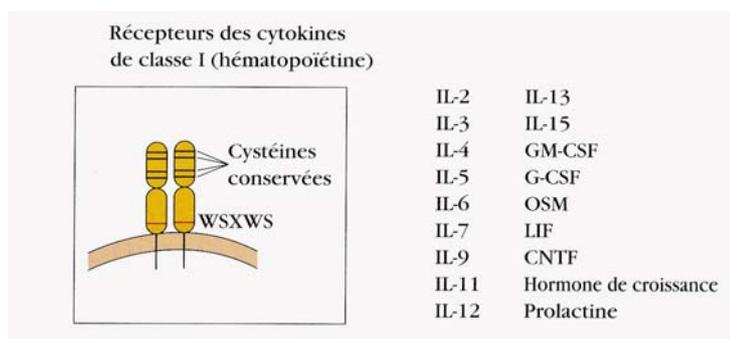
Les cytokines hématopoïétiques sont des protéines de faibles poids moléculaires impliquées dans la différenciation et l'expansion des cellules sanguines. Elles présentent généralement des N-glycosylations et O-glycosylations. La structure tertiaire de la plupart de ces glycoprotéines est assurée par des ponts dissulfures. L'organisation spatiale des structures secondaires donne une structure tertiaire globulaire aux cytokines à hélices  $\alpha$  courtes. Ces

cytokines se fixent généralement sous forme monomérique sur différentes chaînes réceptrices hématopoïétiques.

### III.2. Les récepteurs des cytokines hématopoïétiques

#### III.2.1. Structure des chaînes réceptrices

Les chaînes réceptrices de la famille des cytokines hématopoïétiques sont des glycoprotéines contenant une seule région transmembranaire à l'exception de la chaîne CNTF-R qui est ancrée dans la membrane par une liaison glycosyl-phosphatidylinositol (GPI). Les régions extracellulaires de ces chaînes réceptrices sont variables, mais présentent toutes un module de type "Cytokine Receptor Homology" (CRH), constitué par deux domaines hématopoïétiques et impliqué dans la liaison de la cytokine. Le premier domaine hématopoïétique, situé en NH<sub>2</sub>terminal, présente quatre cystéines conservées qui forment deux ponts disulfures intracaténaires successifs indispensables à la fonctionnalité du CRH (Yawata et al. 1993). Le second domaine hématopoïétique, plus proche de la membrane, possède un motif W-S-X-W-S conservé spécifique des récepteurs hématopoïétiques (Figure 14).



**Figure 14-** Structure des récepteurs des cytokines hématopoïétiques (d'après Goldsby et al., 2000).

Des domaines de type "immunoglobuline" (Ig) et/ou des domaines de type "fibronectine III" (FNIII) sont retrouvés dans les régions extracellulaires de certaines chaînes réceptrices de la famille des cytokines hématopoïétiques. Les domaines Ig peuvent également jouer un rôle dans la liaison de la cytokine (Layton et al. 2001 ; Bitard et al ; 2003) alors que les régions de

type FNIII peuvent permettre des interactions entre les chaînes réceptrices (Kurth et al. 2000 ; Timmermann et al. 2002).

Les parties intracellulaires des chaînes réceptrices hématopoïétiques sont de longueurs variables et ne présentent pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque. Deux motifs conservés, "box1" et "box2", sont retrouvés sur les domaines intracellulaires des chaînes réceptrices hématopoïétiques qui participent à la transduction du signal biologique. Le motif "box1" possède un site, riche en proline, essentiel à la transduction du signal en permettant l'ancrage de protéines tyrosines kinases cytoplasmiques de la famille des JAKs ("Janus-Associated Kinases"). Le motif "box2", moins conservé, augmenterait l'affinité des JAKs pour la région intracytoplasmique des chaînes transductrices (Bazan 1990).

### ***III.2.2. Les familles de récepteurs hématopoïétiques***

Afin de transduire un signal, les récepteurs hématopoïétiques fonctionnels induisent l'homodimérisation d'une chaîne spécifique ou l'association de deux ou trois chaînes réceptrices différentes. La spécificité d'interaction des complexes récepteurs multimériques avec la cytokine est conférée par la chaîne  $\alpha$ . Dans le cas des récepteurs trimériques, cette chaîne possède un domaine intracellulaire court et dépourvu, le plus souvent, d'activité transductrice. Elle s'associe, alors, dans le récepteur fonctionnel à un homo ou hétérodimère de chaînes transductrices. La liaison de la cytokine peut induire le rapprochement des chaînes transductrices pré-associées qui permettent le rapprochement des régions intracellulaires. Le rapprochement des parties intra-cytoplasmiques permet l'initiation de la transduction du signal intracellulaire en permettant aux JAKs constitutivement associées aux chaînes réceptrices d'interagir et de s'autoactiver.

Les chaînes transductrices peuvent être partagées par plusieurs cytokines. Cette propriété, à la base de la redondance fonctionnelle entre différentes cytokines, ainsi que la nature dimérique ou trimérique des récepteurs, permet de définir quatre groupes principaux de cytokines hématopoïétiques (Ozaki and Leonard 2002) :

- ***le groupe des cytokines hématopoïétiques à récepteurs homodimériques*** comprend les cytokines hématopoïétiques homodimérisant leur chaîne réceptrice unique qui est transductrice. Ce groupe comprend l'EPO, le TPO, le G-CSF, la GH, la PRL et la Leptine.

- **le groupe des cytokines hématopoïétiques à récepteurs hétérodimériques utilisant la chaîne transductrice  $\beta_c$ .** Les cytokines de ce groupe sont l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF. Chaque cytokine possède une chaîne réceptrice spécifique (chaîne  $\alpha$ ) qui, associée à la chaîne  $\beta_c$ , forme le complexe récepteur fonctionnel.

- **le groupe des cytokines hématopoïétiques à récepteurs hétérodimériques ou hétérodimériques utilisant la chaîne transductrice  $\gamma_c$ .** Ces cytokines sont l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21. La chaîne réceptrice spécifique de chaque cytokine est appelée chaîne réceptrice  $\alpha$ . L'IL-2 et l'IL-15 partagent, en plus de la chaîne  $\gamma_c$ , la chaîne transductrice IL-2R $\beta$ .

-**le groupe des cytokines à récepteurs multimériques** correspond à la famille IL-6/IL-12. La famille de l'IL-6 comprend, en plus de cette cytokine, l'IL-11, le CNTF, le LIF, l'OSM, la CT-1 et la CLC sécrétée uniquement si elle est complexée au "Cardiotrophin-Like Factor"(CLF-1) ou au CNTF-R. Deux homologues viraux de l'IL-6 sont connus : la "Kaposi Sarcoma associated human herpes Virus 8 interleukin-6" (Rm-IL-6). Toutes ces cytokines partagent la chaîne transductrice gp130 et certains partagent la chaîne transductrice gp190. La CT-1 posséderait une chaîne spécifique non déterminée qui serait ancrée à la membrane plasmique par une liaison GPI déjà décrite pour le CNTF-R membranaire (Pennica et al. 1996 ; Robledo et al. 1997).

---

## Le Système Interleukine-2

L'IL-2 est une cytokine appartenant à la même famille que l'IL-15. La découverte de son activité remonte à près de 30 ans lorsque Morgan, Ruscetti et Gallo ont montré que des surnageants de culture de lymphocytes périphériques activés par des mitogènes étaient capables de faire pousser à long terme des lymphocytes provenant de la moelle osseuse (Morgan et al. 1976). La découverte de ce facteur, sa purification, sa production en grande quantité par génie génétique et l'identification de ses récepteurs ont eu comme retombées technologiques majeures : (i) la possibilité de cultiver à long terme des lignées et des clones lymphocytaires T, ouvrant ainsi des voies de recherche encore inenvisageables jusqu'alors, en particulier dans le domaine de l'analyse du répertoire T ; (ii) la mise au point de protocole d'immunointervention en cancérologie, en prévention du rejet de greffe et dans les maladies autoimmunes.

### ***A .L'INTERLEUKINE 2***

#### ***I. Structure***

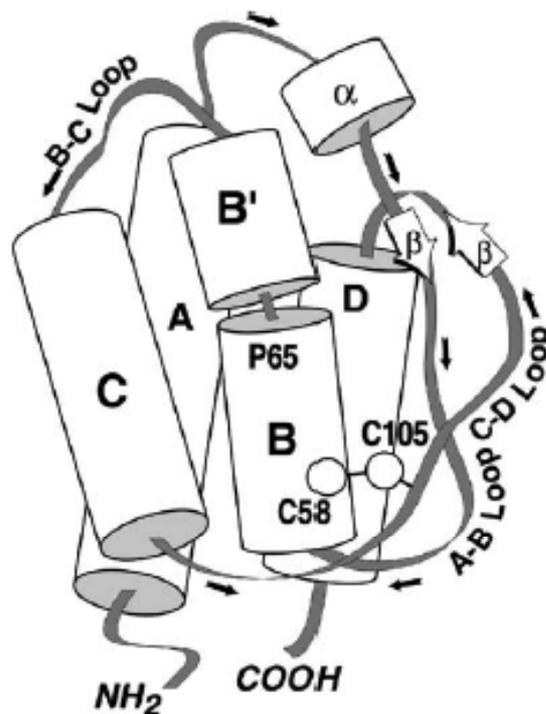
La connaissance structurale de l'interleukine 2 a été rendue possible grâce à deux types de lignées cellulaires. La première est la lignée cellulaire Jurkat (lignée cellulaire T humaine leucémique) qui, après stimulation, a permis l'obtention d'une grande quantité d'interleukine 2 et donc l'analyse de séquence après purification. Le deuxième type de lignée est constitué de lignées cellulaires stables dépendantes de l'interleukine 2 pour leur prolifération (type lignée CTLL2).

Le gène de l'IL-2 est situé sur le chromosome 4 humain en position q26-27, contient 4 exons qui codent pour un polypeptide précurseur de 153 aa dont les 20 premiers constituent le peptide signal. L'IL-2 humaine contient un seul site de O-glycosylation sur la thréonine en position 3. Sa masse moléculaire est de 15,5 kDa. La glycosylation en position 3 n'a pas d'effet sur l'activité biologique de la molécule, mais peut influencer ses propriétés pharmacocinétiques en augmentant sa demie-vie sérique. La séquence de l'IL-2 humaine mature présente 60 % d'homologie avec celle de la souris, incluant la conservation stricte de

trois résidus cystéine. L'IL-2 murine diffère de son homologue humaine en particulier par la présence d'une séquence de 12 résidus glutamine consécutifs dans sa partie N-terminale. Une autre particularité de l'IL-2 murine est son comportement dimérique en électrophorèse (masse moléculaire apparente de 30 kDa. Les études de cristallographie, consécutives à la production de l'interleukine 2, ont permis l'obtention d'une image tridimensionnelle de l'IL-2 humaine (Brandhuber et al ;1987). D'un point de vue structural, l'interleukine 2 est caractérisée par une succession de domaines structurés en hélice alpha (60% de la molécule). Quatre de ces hélices B/B', C, D et F organisées deux à deux de façon antiparallèle, forment un faisceau dont la cohésion est assurée par le pont disulfure 58-105, l'hélice A correspondant à l'extrémité NH<sub>2</sub> terminale (Figure 15).

Ces considérations sont d'un point de vue thérapeutique primordial. Elles permettent la formation d'anticorps réactifs vis-à-vis d'une seule conformation moléculaire, évitant ainsi toutes réactions de cross-réactivité avec d'autre cytokines.

Par ailleurs il a été démontré que la structure de cette cytokine était similaire à celle de l'IL-4 ainsi qu'à celle du GM-CSF ("Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor") (Smith KA, 1993 ).



**Figure 15-** Structure cristallographique de l'IL-2 humaine (Protein Data Bank (128), crystal structure at 1.99 Å resolution/Gaffen et al. 2004).

## ***II. Fonctions et rôles physiologiques de l'IL-2 dans le SI***

L'interleukine 2, cytokine majeure du système immunitaire, assure principalement l'expansion clonale des lymphocytes T activés par l'antigène en particulier la sous population exprimant le marqueur CD4 (*lymphocytes T Helper*), par lesquels elle est majoritairement sécrétée dans des conditions physiologiques normales. Il a été démontré cependant que la sous-population exprimant le marqueur CD8 pouvait être activée *in vivo* pour produire cette cytokine (Schwartz et al. 1990). On la retrouve également exprimée par certains lymphocytes B et les cellules dendritiques.

### ***II.1. Les lymphocytes T***

#### ***II.1.1. Le rôle de facteur de croissance de l'IL-2***

L'interleukine 2 exerce ses effets sur plusieurs types cellulaires en particulier les lymphocytes T. En effet, l'une des conséquences les plus rapides de l'activation lymphocytaire T est la synthèse *de novo* de l'IL-2. La production de cette cytokine est rapidement suivie par l'expression de son récepteur de haute affinité, assurant une rapide expansion des populations lymphocytaires T effecteurs activés par l'antigène (Lenardo et al., 1999). En conséquence, la fonction principale de l'IL-2 est de stimuler la prolifération des lymphocytes T.

L'IL-2 agit de manière autocrine sur les cellules auxiliaires (CD4+) de type Tho (précurseurs des lymphocytes T) et Th1 (participant à l'immunité cellulaire) et de manière paracrine sur les autres sous-populations T (Th2, participant à l'immunité humorale). L'IL-2 ne semble pas jouer de rôle fondamental sur le profil de différenciation (Th1 ou Th2) à partir des précurseurs Tho, à l'inverse de l'IL-4 et de l'IL-10 (Th2) et de l'IL-12 et IFN- $\gamma$  (Th1). Des clones Th1 ou Th2 prolifèrent de la même manière en présence d'IL-2 et conservent leurs profils de cytokines. Dans les cellules T cytotoxiques (majoritairement CD8+ $\alpha/\beta$ ), l'IL-2 augmente la synthèse de perforine et du granzyme B et participe donc à l'augmentation de l'activité cytotoxique de ces cellules. (Liu et al. 1990 ; Makrigiannis and Hoskin 1997 ; Smyth et al. 1990 ).

### ***II.1.2. L'activité anti-anergique de l'IL-2***

Parallèlement à son activité de facteur de croissance, l'IL-2 exerce également une activité anti-anergique : l'activation du TCR en l'absence de signal accessoire (CD28) induit un signal d'anergie cellulaire caractérisé par une absence de prolifération cellulaire et un état réfractaire vis à vis d'une nouvelle stimulation antigénique. Ce signal peut être contrecarré par l'addition d'IL-2 exogène lors de la première stimulation antigénique. Cet effet implique le domaine intracellulaire de la chaîne  $\gamma$  du IL-2R ainsi que la tyrosine kinase associée, Jak3 (Boussiotis et al. 1994).

### ***II.1.3. Induction de la mort programmée (apoptose)***

L'IL-2 semble induire la mort programmée de lymphocytes T lors de stimulation antigénique répétée. Cet effet régulateur pourrait ainsi participer aux mécanismes de tolérance extra-thymique (Lenardo et al., 1999).

En effet, il a été démontré que l'IL-2 activait des signaux pro-apoptotique en augmentant le taux d'expression de la molécule FasL exprimée par les cellules T (Refaeli et al., 1998 ; Van Parijs et al., 1998). Les cellules T exprimant les molécules Fas/CD95 peuvent donc conduire à la mort programmée des cellules T activées. Confirmant cette hypothèse, des études menées chez des souris déficientes pour les molécules Fas et FasL présentent un phénotype auto-immun (Hsu et al., 2001).

### ***II.1.4. La régulation du cycle cellulaire par l'IL-2***

Les signaux transmis par le TCR exprimé par les cellules T au repos (en phase G0) permet d'activer différentes voies métaboliques et génère des changements caractéristiques dans la taille des cellules et leur contenu en ARN, soulignant la progression du cycle cellulaire en phase G1. Quoi qu'il en soit, l'entrée en phase S, ne peut pas être observée en l'absence d'IL-2. En effet, des cellules dépourvues d'IL-2 sont caractérisées par un arrêt du cycle en phase G1 (Cantrell and Smith 1984). L'IL-2 induit également l'expression des proto-oncogènes c-myc et c-myb associée à la croissance cellulaire (Shibuya et al. 1992 ; Stern and

Smith 1986) et accélère l'entrée en phase S. Dans le système eucaryote, le cycle cellulaire est régulé par l'activation séquentielle des cyclines dépendantes des kinases (CDK). Or, les signaux transmis par le TCR stimulent la synthèse des CDKs et de protéines cyclines caractéristiques de la phase G1. Cela n'est pas suffisant pour générer des complexes CDK permettant la progression du cycle cellulaire en phase S (Karnitz and Abraham 1996). Les signaux transmis par le récepteur de l'IL-2 vont permettre l'expression de complexes cyclines/CDK actifs (Firpo et al. 1994). Le rôle de l'IL-2 dans la progression du cycle cellulaire a été démontré grâce à l'identification de molécules inhibitrices des cyclines G1/CDK, en particulier la molécule p27<sup>kip1</sup>, exprimée à de fortes concentrations par les cellules T au repos. Associée à la synthèse des protéines CDKs, dépendantes des signaux transmis par le TCR, l'IL-2 conduit à une baisse du taux de la molécule p27<sup>kip1</sup> (Firpo et al ; 1994). Cette dernière observation confirme le rôle joué par le récepteur de l'IL-2 dans la régulation du cycle cellulaire des lymphocytes .

L'étude des effets de l'IL-2, au cours du cycle cellulaire, a permis de souligner l'importance de cette molécule *in vivo* dans l'expansion clonale observée après activation des lymphocytes T par l'antigène. Cependant il est important de souligner les différents stades cellulaires observés au cours de la différenciation des lymphocytes T en cellules effectrices ainsi qu'au cours du processus d'homéostasie cellulaire. En fonction des conditions signalétiques, les signaux transduits par le récepteur de l'IL-2 peuvent donc limiter et même annuler les effets sur la progression cellulaire.

## ***II.2. Les lymphocytes T CD4+/CD25+(Treg)***

### ***II.2.5. Rôle des lymphocytes T CD4+/CD25+(Treg)***

Le thymus produit des lymphocytes T présentant un répertoire très large de spécificités pour les antigènes. Certains de ces lymphocytes T ont un rôle déterminant dans l'élimination spécifique des agents infectieux. D'autres, spécifiques d'antigènes du soi, seront éliminés par délétion clonale (sélection négative) ou leur fonction sera neutralisée ; dans ce dernier cas, on parle alors d'anergie. Toutefois, il persiste des lymphocytes T fonctionnels qui reconnaissent des antigènes du soi. Ces lymphocytes T auto-réactifs, s'ils sont activés, exposent au risque de maladies auto-immunes. Ce processus est contrôlé par les lymphocytes T dits régulateurs qui

empêchent l'action des lymphocytes T auto-réactifs potentiellement pathogènes, prévenant ainsi l'émergence de maladies auto-immunes (cf. chap. Tolérance immunitaire).

### ***II.2.6. IL-2 et lymphocytes T régulateurs : nouveau concept***

Le rôle de l'IL-2 dans la survie des cellules T reg in vivo reste un nouveau concept (Malek et al ; 2004). L'IL-2 semblerait aujourd'hui jouer un rôle plus important dans le mécanisme de tolérance immunitaire que dans le développement de la réponse T (Nelson et al. 2004). Ainsi, des souris déficientes pour l'IL-2 ou la chaîne réceptrice  $\alpha$ , décèdent non pas d'une lymphopénie mais de désordres auto-immuns et de lymphoprolifération. L'injection d'IL-2 à la naissance corrige ces anomalies (Almeida et al. 2002).

Le transfert adoptif de cellules T reg chez des souris déficientes pour l'IL-2 ne permet pas de retrouver des taux physiologiques de lymphocytes T reg (Almeida et al. 2002). Cependant, le transfert adoptif de lymphocytes T reg conduit à la survie cellulaire des lymphocytes T et à la suppression des pathologies auto-immunes (Malek et al. 2002).

Un déficit spécifique en lymphocytes T reg aggrave considérablement le diabète auto-immun des souris NOD (Non-Obese Diabetic) qui développent de façon spontanée cette maladie (Salomon et al. 2000).

### ***II.3. Les cellules NK (Natural Killer)***

Les cellules NK sont de gros lymphocytes granuleux ou LGL ("Large Granular Lymphocytes") qui jouent un rôle essentiel dans l'immunité innée. Les cellules NK possèdent une activité tueuse naturelle ou NK ("Natural Killing"), une fonction tueuse activée par les lymphokines ou LAK ("Lymphokine-Activated Killing") et une cytotoxicité dépendante des anticorps ou ADCC. En effet, les NK présentent une activité cytotoxique contre les cellules tumorales, les cellules infectées par les virus et différents agents pathogènes. La cytotoxicité des cellules NK ainsi que leur sécrétion cytokinique sont augmentées par l'IL-2.

L'IL-2 peut être considérée comme facteur de croissance des cellules NK tout, comme l'IL-15 (Carson et al., 1997). Parmi les trois types de lymphocytes activés par l'IL-2, les cellules NK sont uniques dans le sens où elles expriment constitutivement les chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  du récepteur de l'IL-2 (Hodges et al.2000). Ceci explique le fait qu'elles soient constamment réactives à l'IL-2.(Siegel et al, 1987 ; Caligiuri et al, 1990).

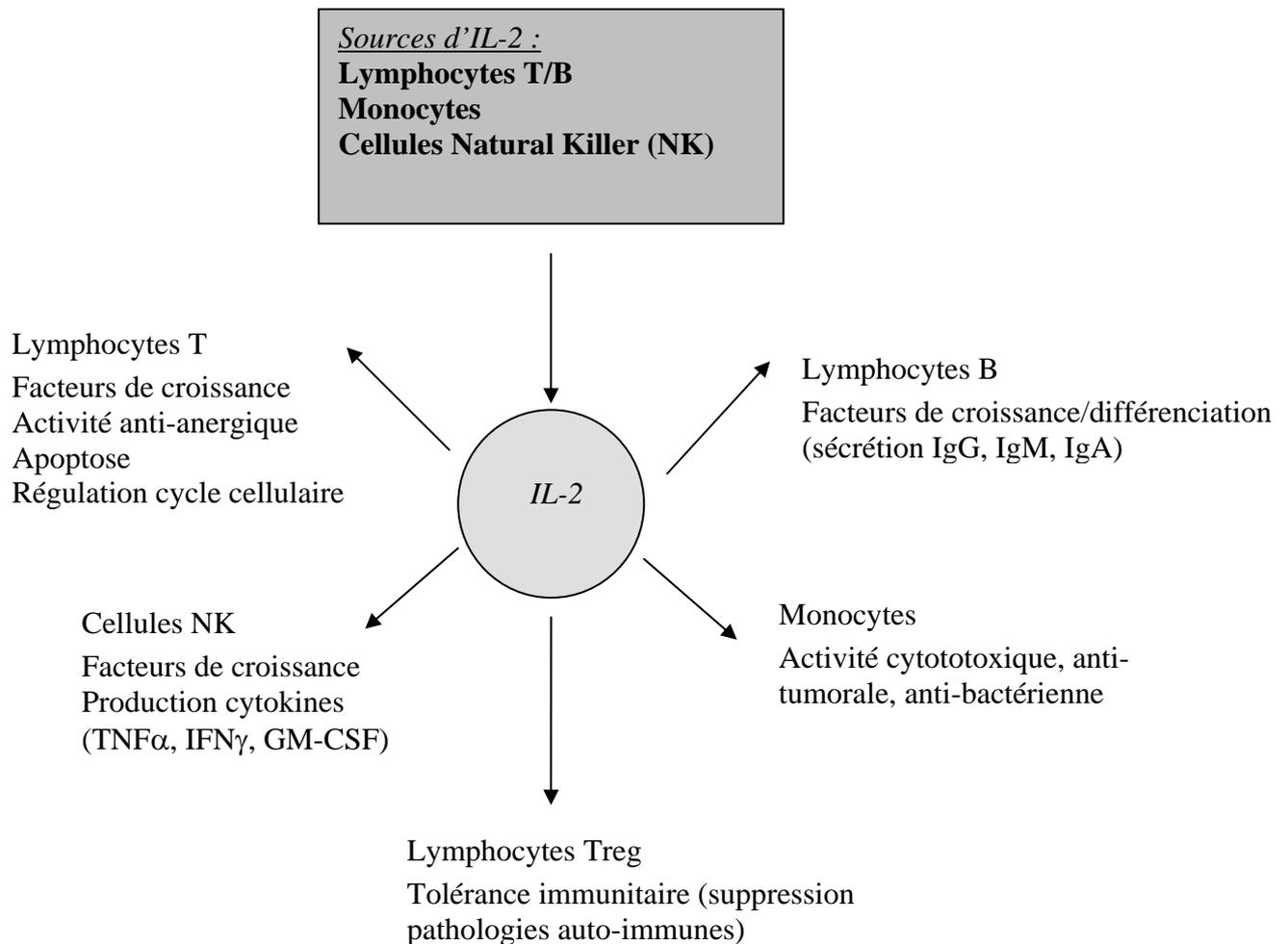
L'IL-2 stimule la production de cytokines dérivées des cellules NK comme le TNF  $\alpha$ , l'IFN  $\gamma$  et le GM-CSF.

#### ***II.4. Les lymphocytes B***

La majorité des lymphocytes B au repos ne répondent pas à l'IL-2, puisqu'ils n'expriment pas la chaîne  $\gamma$  e son récepteur. Cependant, une fraction d'entre eux porte la chaîne  $\beta$  (10%) et la chaîne  $\alpha$  (2%). L'expression de la chaîne  $\beta$  peut être augmentée par l'IL-2 elle-même et par l'IL-4. Ces lymphocytes peuvent proliférer en présence de fortes concentrations d'IL-2. La réponse optimale des lymphocytes B à l'IL-2 nécessite l'induction de la chaîne  $\alpha$ . Elle varie suivant le contexte d'activation des lymphocytes B. Tout d'abord l'IL-2, comme l'IL-4, induit la prolifération des lymphocytes B stimulés par l'antigène ou par des activateurs polyclonaux comme le LPS.L'IL-2, produite essentiellement par la population TH1, a un effet majeur sur la prolifération et la différenciation des lymphocytes B (cf.sécrétion des immunoglobulines IgM, IgG, et IgA). Cependant, ces effets sont seulement observés à court terme. Par ailleurs, elle agit en très forte synergie avec l'IL-10 pour induire la prolifération et la différenciation cellulaire à long terme. L'effet de l'IL-10 est d'augmenter la densité des récepteurs de haute affinité pour l'IL-2 (Fluckiger at al. 1993 ; Gaffen et al., 1996).

## II.5. Les monocytes

Les monocytes humains au repos expriment les chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  du récepteur de l'IL-2. Ainsi, par le biais de récepteurs d'affinité intermédiaire, l'IL-2 stimule leurs activités cytotoxiques, anti-tumorale et anti-bactérienne (Espinoza-Delgado et al. 1990). Ces effets sont accompagnés par la synthèse de peroxyde d'hydrogène, de prostaglandine E2 et de thromboxane B2, ainsi que de nombreuses cytokines dont le  $\text{TNF}\alpha$ , l'IFN  $\gamma$  ou le LPS qui induisent la synthèse de la chaîne  $\alpha$  du IL-2R.



**Figure 16**-Fonctions physiologiques de l'IL-2 dans le système immunitaire

### **III. Régulation de l'expression de l'IL-2**

#### **III.1. Les molécules de co-stimulation**

La reconnaissance de l'antigène par le TCR implique de nombreux signaux de co-stimulation qui permettent d'induire la synthèse de différents facteurs de transcription tels que Oct, NF-AT et AP-1 (Figure 17). Ces facteurs permettent d'assurer la transcription du gène de l'IL-2.

Les cellules T naïves peuvent vivre plusieurs années sans se diviser. Ces petites cellules au repos présentent une chromatine condensée et un cytoplasme très réduit. Elles synthétisent peu d'ARN et de protéines. Une fois activées, elles peuvent entrer dans le cycle cellulaire et se diviser rapidement pour produire un très grand nombre de descendants qui vont se différencier en cellules T effectrices armées. Ce phénomène de prolifération et de différenciation est contrôlé par l'IL-2, produite par la cellule T activée elle-même.

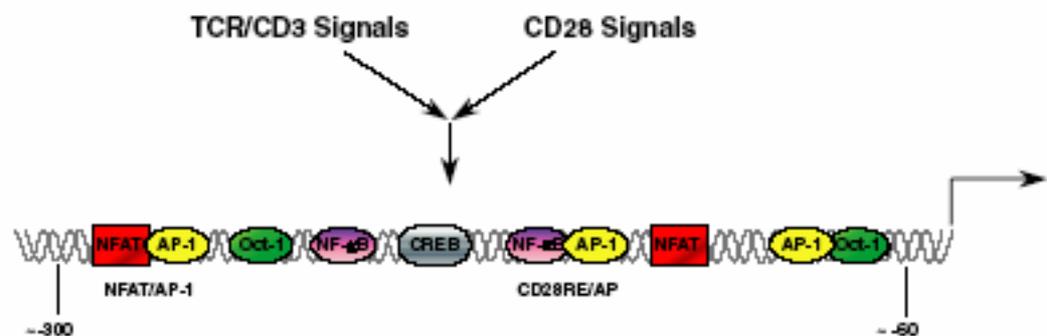
La production de l'interleukine 2 par les cellules T nécessite deux signaux d'activation distincts. Le premier est initié par le complexe TCR/CD3 qui engage la présentation de l'antigène associé aux molécules du de CMH de classe II par les CPA. L'affinité du TCR pour le complexe CMH-peptide est faible comparativement à celle de l'anticorps pour l'antigène. De nombreuses autres molécules interviennent pour créer une interaction productive entre le lymphocyte T et la CPA. Par ailleurs, afin d'assurer un taux satisfaisant d'IL-2, l'intervention de molécules de co-stimulation est indispensable. Le CD28 est l'acteur principal de cette voie d'activation. Il se lie aux molécules B7-1 et B7-2 (signal 1 et 2) exprimés par les CPA.

Les ARNm des cytokines ont une vie très courte à cause d'une séquence "d'instabilité" dans leur région 3' non traduite. Cette instabilité empêche une production et une libération soutenue de cytokines et permet de réguler finement l'activité de ces cytokines. La stabilisation de l'ARNm de l'IL-2 augmente la synthèse de l'IL-2 de 20 à 30 fois. Un autre effet de la liaison de CD28 est l'activation de facteurs de transcription (AP-1 et NFκB), ce qui augmente la transcription du gène de l'IL-2 d'environ 3 fois. Ces deux mécanismes permettent d'augmenter d'environ 100 fois la synthèse d'IL-2.

En l'absence de stimulation, le facteur NFκB est séquestré au niveau du cytoplasme par une molécule inhibitrice, le facteur IκB (*Inhibitor of NFκB*). Après phosphorylation de

l'I $\kappa$ B, NF $\kappa$ B est transloqué vers le noyau pour se fixer sur le promoteur du gène de l'IL-2. Ce mécanisme permet d'obtenir une mobilisation rapide des molécules effectrices.

Le promoteur du gène de l'IL-2 contient également deux sites de fixation pour les membres de la famille NFAT. NFATc1 et NFATc2, toutes les deux impliquées dans la régulation du gène de l'IL-2. (Crabtree et al. 2002). Ces facteurs sont situés au niveau du cytoplasme puis, après activation des lymphocytes T, ils sont transloqués vers le noyau par une voie de signalisation dépendante de la calcineurine, cible de nombreux immunosuppresseurs qui permettent d'inhiber par ce biais la sécrétion de l'IL-2.



**Figure 17-** Promoteur du gène de l'IL-2. Région 5' contenant les sites de fixation des facteurs de transcription Oct, AP-1 et NF $\kappa$ B (d'après Gaffen et al.2004).

## ***III.2. Les molécules endogènes inhibitrices et activatrices***

### ***III.2.7. Les molécules inhibitrices***

Il existe de nombreuses molécules endogènes inhibant la production de l'IL-2. Ces molécules vont inhiber le signal d'activation médié par le TCR. Par exemple, les cellules T activées vont augmenter l'expression de la molécule CTLA-4 qui va antagoniser l'action de la molécule CD28. Tout comme le CD28, la molécule CTLA-4 va se fixer aux marqueurs B7-1 et B7-2 (Dai et al., 1999).

Les glucocorticoïdes *adrénergiques* vont également réguler de façon négative la production de l'IL-2 en inhibant les facteurs NF $\kappa$ B et AP-1 (Auphan et al. 1995). Par ailleurs, il existe des molécules venant interagir de façon compétitive avec le récepteur de certaines

cytokines inhibant ainsi la transduction du signal. Dans le cas de l'IL-2, la chaîne  $\alpha$  de son récepteur soluble (sIL-2R) a été mise en évidence dans de nombreuses pathologies auto-immunes. (Keystone et al., 1988 ; Symons et al., 1988 ; Colver et al., 1989 ; McFarlane CG, 1991). Enfin, les molécules de la famille SOCS ("the Suppressors of Cytokine Signaling") exprimées après activation du récepteur à l'IL-2 vont inhiber la voie de signalisation JAK-STAT, qui sera présentée dans la partie évoquant le récepteur de l'IL-2

### ***III.2.8. Les molécules activatrices***

Mise à part l'activation des cellules T par le TCR, l'IL-2 active sa propre production en augmentant l'expression de la sous-unité  $\alpha$  du récepteur assurant un signal autocrine efficace. En outre, l'IL-2 et l'IL-5 vont également augmenter, au niveau des cellules B, l'expression de la sous-unité  $\alpha$ , sensibilisant ainsi les lymphocytes B aux taux physiologiques d'IL-2 (Gaffen et al., 1996).

## ***B .LE RÉCEPTEUR DE L'INTERLEUKINE 2***

Le récepteur de l'IL-2 est un complexe multimérique constitué de 3 sous-unités ayant des fonctions bien distinctes ( $\alpha,\beta,\gamma$ ). Il appartient à la famille des cytokines hématopoïétiques (ou récepteur de classe I) à laquelle on peut également associer tous les récepteurs possédant la chaîne  $\beta$  (comme l'IL-15) ou la chaîne  $\gamma$  (comme l'IL-4, 7, 9, 15 et 21). Il peut être aussi classé dans la famille des récepteurs à domaine Sushi, nouvelle classe de récepteur, apparue avec la découverte de ces domaines communs aux chaînes réceptrices du récepteur de l'IL-2 et de l'IL-15.

### ***I. Les trois formes du récepteur de l'IL-2***

L'expression des différents composants du récepteur génère la formation de différentes formes de récepteur de l'IL-2 ayant chacune une affinité différente pour l'IL-2.

Des études biochimiques ont montré que la première étape initiant la formation du complexe récepteur de l'IL-2 était l'interaction de l'IL-2 avec la sous-unité  $\alpha$  et  $\beta$  suivies par celles de la sous-unité  $\gamma$  (Rickert et al. 2004). Comme nous l'avons noté précédemment, la chaîne  $\alpha$  seule constitue le récepteur dit de basse affinité, avec une constante de dissociation (Kd) de 10 nM. L'expression concomitante des deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  permet de former un récepteur de "pseudo haute-affinité" avec un Kd de 1nM. Enfin, le complexe formé par les trois chaînes réceptrices  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  constitue le récepteur de haute affinité ayant un Kd d'environ 10 pM, exprimé par les cellules T activées (Waldmann et al ; 1991)

Parmi ces différentes combinaisons réceptrices, deux seulement semblent aptes à délivrer un signal intracellulaire. Par conséquent, le récepteur possédant une affinité intermédiaire ( $\beta/\gamma$ ), exprimé par les cellules NK, les macrophages, et les cellules T au repos, peut transmettre un signal en présence de fortes concentrations d'IL-2. Tandis que le récepteur de haute-affinité ( $\alpha/\beta/\gamma$ ) est exprimé sur les lymphocytes T activés et transmet un signal en présence de faibles concentrations d'IL-2. Bien que l'on puisse facilement mettre en évidence le signal transmis par les deux complexes récepteurs décrits in vitro, l'étude de souris *Knock out* pour le gène de la chaîne réceptrice  $\alpha$  a révélé un phénotype similaire à

celui de souris ne possédant pas le gène de l'IL-2 (Willerford et al. 1995). Cette observation souligne l'importance du complexe de haute affinité formé par les trois chaînes réceptrices dans la transmission du signal.

Le mécanisme par lequel l'IL-2 interagit avec son récepteur reste encore incertain. Cependant des études ont permis d'identifier deux mécanismes possibles. Tout d'abord, il semblerait que les chaînes réceptrices  $\alpha$  et  $\beta$  soient exprimées à la surface cellulaire en l'absence de ligand, de façon indépendante. Dans ce cadre, l'IL-2 se fixerait, en premier lieu, à la sous-unité  $\alpha$ , compte tenu de sa vitesse d'association supérieure à celles des deux autres sous-unités. Le complexe ainsi formé s'associerait ensuite avec la chaîne réceptrice  $\beta$  augmentant l'affinité de la structure pour son ligand, puis à la chaîne  $\gamma$ . La chaîne réceptrice  $\alpha$  permettrait ainsi d'augmenter le taux d'IL-2 à la membrane. La seconde hypothèse propose un modèle de "pré-assemblage" dans lequel les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont pré-associées en l'absence de ligand (Rickert et al. 2004).

## ***II. La structure du récepteur de l'IL-2***

Le récepteur de l'IL-2 est constitué de 3 chaînes polypeptidiques ( $\alpha\beta\gamma$ ). Chacun de leur gène a été cloné. Celui de l'IL-2R $\beta$  est exprimé constitutivement dans les cellules CD8+ mais non dans les CD4+. Le gène de l'IL-2 $\gamma$  est lui exprimé dans toutes les cellules lymphoïdes. Rappelons que les chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  appartiennent à la superfamille des récepteurs hématopoïétiques.

### ***II.1. La chaîne privée du récepteur de l'IL-2 : l'IL-2R $\alpha$ (Tac ; P55; CD25)***

#### ***II.1.1. Mise en évidence***

L'utilisation d'anticorps monoclonaux ainsi que des molécules d'IL-2 radiomarquées a permis de caractériser chimiquement les différentes sous-unités du récepteur. L'analyse de la structure, de la fonction et l'expression du récepteur à l'IL-2 a été facilitée par la production d'un anticorps monoclonal dirigé contre les cellule T activées (anti-Tac) par Uchiyama et al. (Uchiyama T et al.1981). On a démontré que l'anti-Tac était capable de reconnaître le

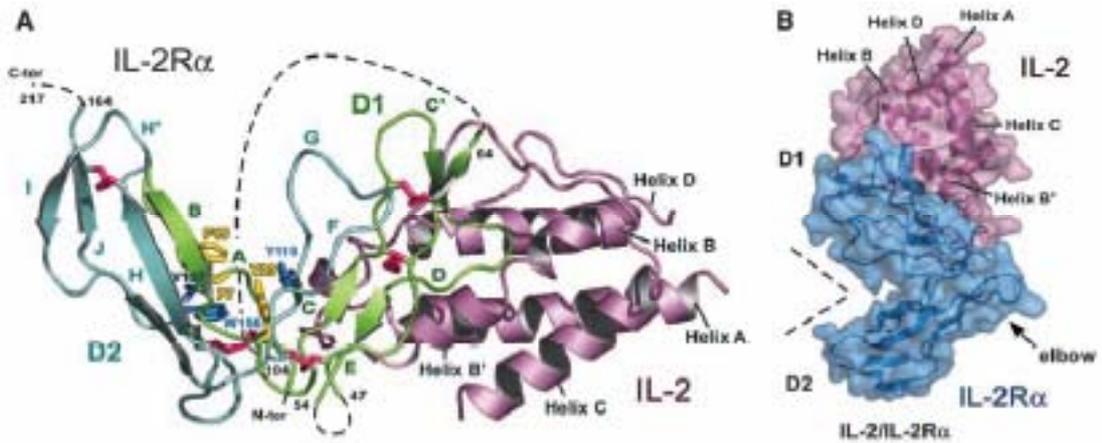
récepteur humain à l'IL-2 en bloquant la liaison de l'IL-2 radiomarquée à son récepteur, stoppant ainsi la prolifération des lymphocytes induite par l'IL-2 (Leonard WJ et al., 1982 et 1983 ; Miyawaki T et al. 1982 ; Robb RJ, 1983).

### ***II.1.2. Constitution***

La sous-unité  $\alpha$ , caractéristique du récepteur à l'IL-2 est une molécule possédant une structure glycosylée ayant un poids moléculaire de 55 KDa (Waldmann et al., 1984). Elle possède des homologies structurales avec la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-15.

Cette sous-unité est constituée de 251 aa dont l'extrémité N-terminal (21 aa) constitue le peptide signal clivé *in vivo*. Les 219 aa terminaux forment un domaine extracellulaire contenant deux sites potentiels de N-glycosylation. Un second domaine de 19 aa contient une région hydrophobe située à côté de l'extrémité C-terminal correspondant à la région transmembranaire. La région intra-cytoplasmique est constituée d'une séquence de 13 aa trop courte pour porter une quelconque activité tyrosine kinase ou sérine/thréonine kinase.

Le domaine extracellulaire possède deux motifs caractéristiques impliqués dans la liaison des protéines. Ces domaines portent le nom de domaines Sushi, encore appelé Src ("Short consensus repeat") ou GP-1 (glycoprotein-1) (Giri et al. 1995). Le domaine Sushi a été initialement mis en évidence au niveau de protéines du complément (C1s, C1r, facteurs B et H) ou de facteurs de coagulation (facteur XIII et C4BP) (Davie et al. 1986, Perkins et al. 1988). Les deux domaines Sushi forment un angle de 90° rejoignant les extrémités N- et C-terminal (D1 et D2) permettant l'interaction du complexe récepteur avec l'IL-2 au niveau du domaine D1. La surface de liaison de l'IL-2 est constituée par les hélices A', B' et en partie par la boucle AB. (Figure 19). Les motifs D1 (résidus 1 à 64) et D2 (résidus 104 à 165) forment une structure globulaire formée par deux ponts dissulfures intracaténaux entre les cystéines 3 et 46 pour le domaine D1 et entre les cystéines 147 et 104 pour le domaine D2. Malgré une structure similaire à l'IL-15R $\alpha$ , l'IL-2R $\alpha$  ne possède qu'un seul domaine Sushi. Ces deux chaînes forment ainsi une nouvelle famille de récepteurs grâce à leur domaine Sushi (Rickert et al. 2005).



**Figure 18**-Structure du complexe IL-2/IL-2R $\alpha$ ..**A**.Vue détaillée de la fixation de la chaîne  $\alpha$  dans le sillon constitué des hélices AB et B' de l'IL-2. Le domaine D1 de la chaîne  $\alpha$  est vert, le domaine D2 est bleu, et l'IL-2 est violette. Les ponts dissulfures sont représentés par des motifs rouges, les résidus hydrophobes situés entre D1 et D2 en jaune et bleu. **B**. Mode d'interaction entre l'IL-2 et son récepteur. D'après Rickert et al.2005.

### II.1.3. Rôle physiologique

Bien que la chaîne réceptrice  $\alpha$  soit incapable de délivrer des signaux intracellulaires, son rôle physiologique ne doit pas être négligé (Hatakeyama et al., 1986). Des souris ayant des délétions ciblées pour cette chaîne  $\alpha$  ont clairement démontré que l'absence d'expression de la sous-unité  $\alpha$  était équivalente à l'absence d'expression d'IL-2 (Willerford et al., 1995 ;). Par conséquent, les concentrations physiologiques d'IL-2 ne sont pas suffisantes pour pouvoir se fixer au complexe formé par les deux autres sous-unités  $\beta/\gamma$ . C'est pourquoi, l'expression de la sous-unité  $\alpha$  est étroitement régulée par de nombreux types cellulaires spécifiques de la réaction immunitaire, et peut être induite par l'IL-2 (Depper et al. 1985), mais aussi par l'IL-4 (Froussard et al., 1991), l'IL-5 (Gaffen et al. 1996), l'IL-10 (Fluckiger et al. 1993), les cytokines pro-inflammatoires (Plaetinck et al., 1990) et les infections virales (Ballard et al. 1988).

## ***II.2. La chaîne réceptrice de l'IL-2 commune au récepteur de l'IL-15 : l'IL-2R $\beta$ (p75 ; CD122)***

### ***II.2.1. Mise en évidence***

Ce n'est que peu de temps après la découverte de la sous-unité  $\alpha$  que des études ont démontré l'existence d'une seconde chaîne dans la constitution du récepteur à l'IL-2 commune à celle de l'IL-15. Des cellules répondaient à de hautes concentrations en IL-2 en présence de l'anti-Tac (Trinchieri et al., 1984), d'autres, comme la lignée YT de type NK (Natural Killer), fixaient l'IL-2 avec une affinité intermédiaire en l'absence d'interaction avec l'anti-Tac. Ces analyses ont abouti à la mise en évidence d'une chaîne dont le poids moléculaire est proche de 70-75kDa. Un anticorps monoclonal anti p75, fabriqué à partir des cellules YT (le Mik  $\beta$ .1) (Tsudo et al., 1989), a permis le criblage d'une banque d'expression d'ADNc de YT, l'obtention de l'ADNc codant pour la protéine p75 (Hatakeyama et al ; 1989a), le clonage et la localisation du gène sur le chromosome 22.

### ***II.2.2. Constitution***

L'excision des 26 AA formant le peptide signal donne une protéine mature de 525 aa ayant une masse moléculaire de 58 kDa. Son gène est localisé sur le chromosome 22 humain en position q12-13 et est organisé en 10 exons et 9 introns . La partie extracellulaire est composée de 214 AA et comprends 8 cystéines ainsi que 4 sites potentiels de N-glycosylation. Cette zone est donc en taille sensiblement équivalente à celle de la chaîne  $\alpha$  (219 aa). Les autres régions sont représentées par les 25 aa hydrophobes de la partie transmembranaire et le domaine intracellulaire. Ce dernier, formé par une longue chaîne polypeptidique de 286 aa, est riche en proline (42 résidus) et en sérine (30 résidus) indispensables à la transmission du signal mais ne possède pas la séquence consensus des tyrosines kinase Glycine-X-Glycine-X-X-Glycine et contient 6 tyrosines (Hanks et al., 1988). Cela laisse donc supposer que le récepteur à l'IL-2 utilise un autre système pour effectuer la transduction du signal.

L'existence d'une forme soluble de la chaîne IL-2 $\beta$  (p75) produite de manière endogène, 20 à 25 kDa plus petite que la forme totale, a également été mise en évidence (Honda et al., 1990). La génération du sIL-2R $\beta$  est indépendante de l'activation cellulaire et est médiée par clivage protéolytique de la forme membranaire.

## ***II.3. La sous-unité $\gamma$ (Common $\gamma$ , p64, CD132)***

### ***II.3.1. Constitution***

La chaîne  $\gamma$ c est partagée par de nombreux récepteurs de cytokines (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15 et IL-21). Il s'agit d'une glycoprotéine membranaire de type I de 64 kDa. Elle est codée par un gène situé sur le chromosome X, en position q13.1 (Takeshita et al., 1992). C'est une molécule qui totalise 369 aa, la protéine mature comporte 347 aa et le peptide signal 22 aa. La partie extra-cellulaire de la chaîne est composée de 233 aa. Dans ce domaine, on retrouve 6 sites potentiels de glycosylation. Le domaine transmembranaire de la molécule comporte 21 aa. Aucune séquence consensus permettant d'exprimer une activité tyrosine kinase n'a été identifiée dans la partie intra-cytoplasmique de 86 aa. Cependant, une séquence de type SH2 a été identifiée. Elle permet à la chaîne  $\gamma$ c de se lier, par l'intermédiaire de phosphotyrosines, à des protéines de signalisation et ainsi d'induire la transduction du signal.

### ***II.3.2. Rôle physiologique***

La chaîne  $\gamma$ c seule est inapte à transmettre le signal, il est nécessaire qu'elle soit associée à une autre chaîne, la chaîne  $\beta$ . La chaîne  $\gamma$ c est d'autant plus importante qu'elle est partagée par de nombreux récepteurs de cytokines et qu'un défaut d'expression provoque une immunodéficience combinée sévère ou X-SCID ("human X-linked Severe Combined ImmunoDeficiency") (Noguchi et al ;1993).

Des travaux sur la chaîne  $\gamma$ c ont permis d'identifier différentes caractéristiques de cette chaîne. Des études ont montré que les lymphocytes T CD4 + présentent un pool important de chaîne  $\gamma$ c intracellulaire, mais sa translocation à la membrane plasmique ne se fait qu'après l'activation cellulaire et l'induction des gènes IL-2R $\alpha$  et IL-2R $\beta$  (Bani et al. 1997). Il a également été identifié un isoforme de la chaîne  $\gamma$ c (64), la p74 de la chaîne  $\gamma$ c qui semble remplacer la p64 dans la lignée TF-1 $\beta$ 2 (TF-1 transfectées pour exprimer IL-2R $\beta$  et cultivées en IL-2) (Monson et al. 2001). Deux transcrits de la chaîne  $\gamma$ c ont été caractérisés par la présence ( $\gamma$ c-long) ou l'absence du site SH2 ( $\gamma$ c-short) en C-terminal de la protéine (Shi et al. 1997) dans les lymphocytes périphériques humains. Ces deux formes suggèrent une

activation différentielle de voies de signalisation et pourrait jouer un rôle important dans la réponse cellulaire aux différentes cytokines  $\gamma$ c dépendant.

Une forme soluble de la chaîne  $\gamma$ c murine, qui résulte d'un clivage protéolytique de la forme membranaire, a été découverte dans les surnageants de culture de cellules T, B, NK et macrophages après activation (Meissner et al. 2001). La  $\gamma$ c soluble possède comme propriété physiologique d'inhiber la prolifération des cellules dépendantes de cytokines  $\gamma$ c dépendantes. Elle jouerait donc un rôle de régulation négative des cytokines exprimant la  $\gamma$ c membranaire en entrant en compétition avec cette dernière.

La chaîne  $\gamma$ c peut également entrer dans la composition d'un récepteur fonctionnel pour le GM-CSF (Giron-Michel et al. 2003). En effet, le GM-CSF inhibe la liaison de l'IL-2 sur le récepteur fonctionnel de l'IL-2 (Kankura et al.1993) dans la lignée promégacaryocytaire MO7e.

### ***III. Le récepteur soluble de l'IL-2 (sIL-2R $\alpha$ ) : propriétés et implications dans les pathologies***

Des corrélations entre le niveau d'expression sérique de certains récepteurs solubles (notamment le sIL-2R $\alpha$ , sIL-6R $\alpha$ , et le TNF $\alpha$ ) dans certaines pathologies ont été observées. Leur niveau d'expression peut être utilisé à des fins diagnostiques ou comme marqueur pronostique dans différentes conditions cliniques.

Les stimulations antigénique ou mitogénique des lymphocytes B et T n'entraînent pas seulement l'induction de la sous-unité  $\alpha$  membranaire mais également la génération et la sécrétion de chaînes tronquées (Rubin et al.1985 ; Osawa et al. 1986 ; Wagner et al.1986). Ces récepteurs solubles, sIL-2R $\alpha$ , sont approximativement 10 à 15 kDa plus légers que la forme membranaire, tout en conservant les propriétés de liaison à l'IL-2 (Josimovic-Alasevic et al.1988). L'affinité de liaison du sIL-2R $\alpha$  pour l'IL-2 est similaire à celle retrouvée pour la chaîne membranaire isolée, mais environ 1000 fois inférieure au complexe trimérique  $\alpha\beta\gamma$  (Jacques et al.1987). Cela explique la relative inefficacité du sIL-2R $\alpha$  à bloquer la liaison de l'IL-2 au récepteur IL-2R $\alpha$  biologiquement actif sur les cellules. Il a néanmoins été montré, *in vitro*, que l'activité et la liaison de l'IL-2 sont inhibées en utilisant de fortes concentrations de

sIL-2R $\alpha$  (Treiger et al.1986 ; Kondo et al.1988). Plusieurs études ont mis en évidence l'existence d'un sIL-2R $\alpha$  endogène, potentiellement responsable d'une activité inhibitrice des fonctions de la cellule T, dans les sérums et liquides biologiques dans des conditions pathologiques, comme la polyarthrite rhumatoïde (Symons et al.1988) et la leishmaniose viscérale humaine (Barral-Netto et al.1991).

La génération du sIL-2R $\alpha$  est médiée par le clivage protéolytique de la forme liée à la membrane. Un seul type d'ARN messenger code pour la chaîne totale membranaire, sIL-2R $\alpha$ . Des expériences de transfection de cellules avec de l'ADNc codant pour la forme membranaire conduisaient non seulement à l'expression de la chaîne à la surface des cellules mais également à la présence d'une forme soluble dans le surnageant de culture (Rubin et Nelson 1990). Les cellules néoplasiques et infectées par le HTLV-1, dans lesquelles l'expression de l'IL-2R $\alpha$  est constitutive, produisent aussi de grandes quantités de sIL-2R $\alpha$ . L'identité des protéases responsables de la génération du sIL-2R $\alpha$  est encore imprécise. Cependant une étude a montré que le clivage protéolytique de la forme membranaire de sIL-2R $\alpha$ , à la surface des lymphocytes T, peut être induit par des MMPs (MMP-2 et MMP-9) dérivées de tumeurs et ainsi supprime la capacité proliférative des cellules T (Sheu et al.2001). Il a également été montré que Der p1, un allergène à activité cystéine protéase, est capable de couper l'IL-2R $\alpha$  de la surface des cellules T du sang périphérique, ce qui a pour conséquence d'inhiber la propagation des cellules Th1 et de favoriser le développement d'une réponse Th2 associée à un environnement allergique.

De faibles concentrations de sIL-2R $\alpha$  sont retrouvées dans le sérum et l'urine d'individus sains, témoignant d'un niveau basal d'activation immunologique (Rubin et al.1985). L'augmentation d'expression de sIL-2R $\alpha$  dans le sérum a été observée dans diverses conditions cliniques, comme les maladies infectieuses et autoimmunes. Le niveau d'expression de sIL-2R $\alpha$  a été validé comme un bon indicateur de l'activité pathologique et/ou de la progression de ces maladies, et a un impact direct sur le pronostic de la maladie. Dans le cas de néoplasies hématologiques, comme les pathologies associées à l'infection de HTLV-1, les leucémies à tricholeucocytes et le lymphome de Hodgkin, le taux sérique de sIL-2R $\alpha$  reflète la charge tumorale totale et son accroissement est associé à la progression de la maladie (Richards et al.1990 ; Ambrosetti et al.1993 ; Kamihira et al.1994). De plus, une augmentation de la moyenne des taux de sIL-2R $\alpha$ , corrélé avec la progression naturelle de la maladie, a été observée chez des patients atteints du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Prince et al.1988 ; Honda et al.1989). Dans les maladies auto-immunes comme la

polyarthrite rhumatoïde ou le lupus érythémateux, les taux de sIL-2R $\alpha$  sont corrélés avec une forme active de la maladie (Semenzato et al.1988; Symonset al.1988; Tokano et al.1989). Des taux élevés de sIL-2R $\alpha$  ont aussi été observés dans de nombreux types d'infections virales, bactériennes et parasitiques, probablement reflétant l'état d'activation immunologique (Josimovic-Alasevic et al.1988 ; Brown et al.1989 ; Muller et al.1989). Enfin des taux élevés de sIL-2R $\alpha$  servent au pronostic de rejet dans des cas de transplantation (Perkins et al. 1989 ; Bock et al.1994).

En conclusion, la mesure des taux d'expression de sIL-2R $\alpha$  dans les sérums et/ou dans les liquides biologiques représente un outil relativement simple et non invasif. Il permet ainsi l'observation de l'activité, associée à une activation immunologique, de différentes maladies, de leurs réponses aux traitements et leurs pronostics.

#### ***IV. Signalisation intra-cellulaire par le système IL-2***

L'un des aspects les plus fascinants des signaux transmis par les cytokines hématopoïétiques est le fait que la simple dimérisation de leurs chaînes réceptrices puisse entraîner une cascade de signaux intracellulaires permettant la prolifération et la différenciation des cellules sanguines. Dans le cas du récepteur de l'IL-2, l'hétérodimérisation des domaines intracytoplasmiques  $\beta$  et  $\gamma$ c peut déclencher de nombreuses réponses physiologiques au sein des cellules T, telles que la prolifération cellulaire, l'activation des fonctions effectrices et la sensibilisation aux signaux de mort cellulaire. Comme les autres membres de la superfamille des récepteurs de cytokines hématopoïétiques, le récepteur de l'IL-2 ne possède pas de fonction catalytique intrinsèque, mais reste associé à une activité tyrosine-kinase, en particulier celui des Janus tyrosine kinase (Jaks).

L'interaction de l'IL-2 avec son récepteur induit l'activation catalytique des Jaks et autres kinases associées, initiant une cascade de phosphorylation intracellulaire ainsi que la formation d'un complexe multimérique de signalisation du côté interne de la membrane cellulaire. Plusieurs facteurs de transcription sont alors recrutés par le complexe, dont Stat3 et Stat5, la protéine adaptatrice Shc et la kinase lipidique PI3Kinase, chacune de ces molécules possédant une cible unique génétique situées au niveau du noyau cellulaire.

## ***IV.1. Les domaines cytoplasmiques des sous-unités $\beta$ et $\gamma$***

Un complexe multimérique se forme rapidement autour des domaines cytoplasmiques IL-2 et  $\gamma$ c après fixation de l'IL-2 sur son récepteur. La formation de ce complexe dépend de l'activité catalytique intracellulaire de protéines kinases, en particulier celle du système Jaks, qui permet la phosphorylation des résidus tyrosine sur les deux chaînes IL-2 $\beta$  et  $\gamma$ c. (Asao et al. 1990).

Ces phosphotyrosines permettent de former des sites d'arrimage pour des protéines cytoplasmiques possédant des domaines SH2 ou PTB ( phosphotyrosine-binding) (Pawson 1995).

### ***IV.1.1. La chaîne réceptrice $\beta$***

Le domaine cytoplasmique de la sous-unité  $\beta$  a été initialement divisé en trois régions par Taniguchi et ses collègues sur la base de la séquence en aa et l'utilisation d'enzymes de restriction appropriées (Hatakeyama et al. 1989). La région membranaire proximale de la chaîne réceptrice  $\beta$  contient les motifs "box1"et "box2"communs aux récepteurs des cytokines hématopoïétiques. Ces motifs sont constitués de sites de liaison pour les Janus tyrosine kinases, en particulier Jak1, dans le cas de la sous-unité  $\beta$  (Tanaka et al. 1994). La région comprenant le motif "box2"est surnommée "région S", compte tenu de la richesse en résidus sérine. Des délétions réalisées au niveau de cette région annulent l'activation de Jak1 et Jak3 ainsi que l'ensemble des signaux qui en dépendent (Miyazaki et al. 1995). Par ailleurs, la région délimitée par les aa 313 et 382 correspond à la région A. Cette région, chez l'homme, contient 4 résidus tyrosine (Y338, Y355, Y358 et Y361) ainsi que des sites de liaison pour les kinases de la famille src (Lck, Fyn, et Lyn)(Minami et al. 1993), les molécules adaptatrices Shc (Friedmann et al. 1996) et dans certaines cellules les facteurs de transcription Stat. La région distale de la chaîne réceptrice  $\beta$  est surnommée région H, étant constituée de la moitié du domaine cytoplasmique. Elle contient également 2 résidus tyrosine (Y392 et Y510) impliquées dans l'activation des facteurs de transcription (Gaffen et al. 1996).

### ***IV.1.2. La chaîne réceptrice $\gamma$***

Tout comme la sous-unité  $\beta$ , la séquence en aa de la chaîne réceptrice  $\gamma$  peut être subdivisée en trois régions distinctes. Le premier clonage de cette sous-unité réalisé par l'équipe de *Sugamara* a permis d'identifier des séquences homologues entre la région membranaire proximale (aa 284-321) et les domaines de type "Src-Homology 2" SH2 (Takeshita et al. 1992a). Cependant, la chaîne  $\gamma$  reste courte et ne contient aucun résidu permettant une liaison aux phosphotyrosines. Surnommé "région PROX", elle contient le motif "box1", essentiel pour l'activation de la tyrosine kinase Jak3, responsable de la prolifération (Nelson et al. 1997).

## ***IV.2. Les différentes voies de transduction du système IL-2***

### ***IV.2.1. Les tyrosine-kinases Jak1 et Jak3***

La stimulation des récepteurs de cytokines hématopoïétiques induit la phosphorylation rapide de résidus tyrosine situés sur des substrats intracytoplasmiques, bien que ces récepteurs ne possèdent pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque. La découverte de la famille des Jaks kinase a permis de clarifier ce processus. Associées aux domaines cytoplasmiques de ces chaînes réceptrices, les Jaks kinases sont rapidement activées après oligomérisation du récepteur. La famille des Jaks comporte quatre membres : JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2. Ces protéines cytoplasmiques de 120 à 140 kDa sont constituées de 7 domaines "Janus Homology domains" (JH) présentant de fortes similitudes au sein de cette famille. La partie NH2 des Jaks comprend un domaine de type "Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin" (FERM) qui est indispensable à l'association de ces kinases avec les régions intracytoplasmiques des récepteurs de classe I et II au niveau des motifs "box1" et "box 2". En effet, suite à leur activation par phosphorylation mutuelle sur tyrosines, les Jaks vont phosphoryler les chaînes réceptrices au niveau de leurs tyrosines. Ces phosphotyrosines sont des sites d'ancrage pour des protéines cytoplasmiques comportant des domaines d'interaction de type SH2 qui interviennent dans la propagation du signal intracellulaire (Ihle et al. 1995).

Dans le cas du récepteur de l'IL-2, l'activation des deux kinases Jak1 et Jak3, est induite rapidement après fixation de l'IL-2 sur son récepteur. Des études ont démontré que la protéine Jak1 s'associait préférentiellement à la chaîne réceptrice  $\beta$ , et la protéine Jak3,

préférentiellement à la sous-unité  $\gamma$ c. (Tanaka et al. 1994). La molécule Jak interagit avec la région proximale cytoplasmique de la chaîne réceptrice, en particulier au niveau des domaines "box1" et "box2".(Nelson et al. 1996). Après dimérisation du récepteur, la phosphorylation et l'activation de Jak3 induit la phosphorylation et l'activation de Jak1 (Nelson et al. 1997). Par ailleurs, il a été démontré que la chaîne réceptrice  $\gamma$ c favorise l'expression du gène anti-apoptotique bcl-2 par une voie dépendante de Jak3. Des études réalisées sur des lignées lymphocytaires B humaines ont montré que la molécule Jak3 était nécessaire à la phosphorylation des résidus tyrosine de la sous-unité  $\beta$  du récepteur de l'IL-2, de Jak1 et de la molécule Stat5. Quoiqu'il en soit, Jak1 et Jak3 semble participer à des évènements biochimiques communs au sein de ce groupe de récepteurs.

Cette première étape de recrutement de molécules de signalisation peut conduire à l'engagement des trois principales voies d'activation des cytokines hématopoïétiques :

La voie des "Signal Transducers and Activators of Transcription" (STATs)

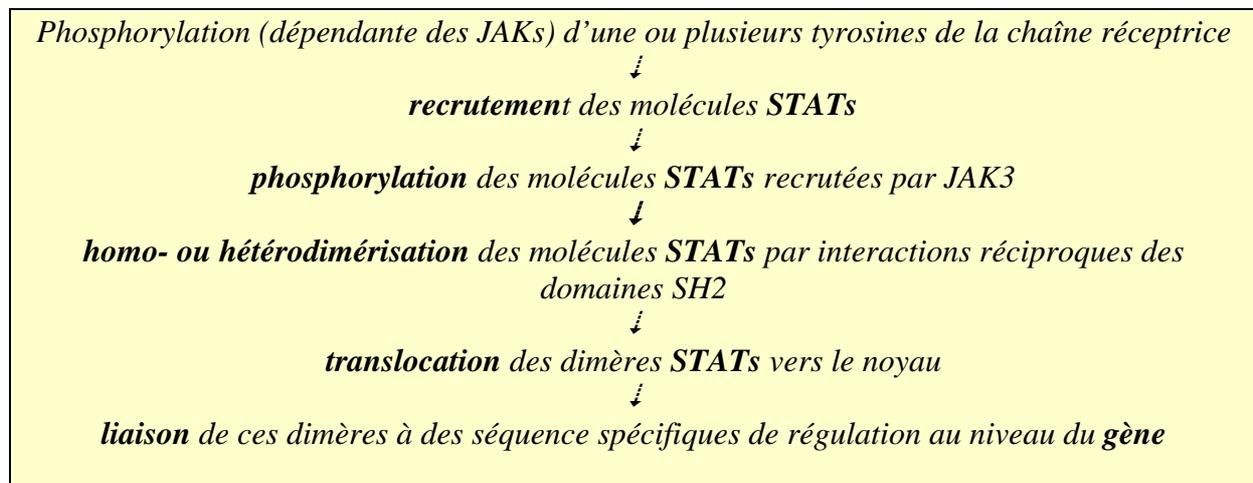
La voie des "Mitogen-Activated Protein Kinases" (MAPKs)

La voie de la "Phosphatidyl Inositol 3-kinase" (PI3-K)et du "cellular homolog of the v-akt oncogene" (Akt ou PKB pour "Protein Kinase B")

#### ***IV.2.2. Les facteurs de transcription cytoplasmiques STATs***

Les facteurs de transcription STATs sont au nombre de sept : STAT1 $\alpha/\beta$ , STAT2, STAT3  $\alpha/\beta$ , STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6. Ces glycoprotéines de 84 à 113 kDa possèdent un domaine SH2 et un résidu tyrosine nécessaires à leur activation. Le domaine SH2 des STATs permet leur ancrage sur les phosphotyrosines des récepteurs où elles sont phosphorylées par les JAKs. Les STATs phosphorylées se détachent des récepteurs et se dimérisent par interactions croisées des domaines SH2 et des phosphotyrosines. Les formes actives des STATs sont, soit des homodimères, soit des hétérodimères. Le complexe récepteur de l'IL-2 est capable d'activer les deux isoformes de la molécule STAT5, et dans de nombreux types cellulaires, dont les cellules T naïves, il peut également activer la molécule STAT3. L'activation des protéines STATs par l'IL-2 implique la molécule Jak3, et non JAK1, et la présence des résidus tyrosines 392 ou 510 de la chaîne réceptrice  $\beta$ .

L'IL-2 va induire, par une suite d'évènements caractéristiques des récepteurs de cytokines, l'activation de signaux nucléaires par le biais des facteurs STATs. :



#### IV.2.3. Les sérine/thréonine kinases MAPKs

Le complexe récepteur de l'IL-2 active la protéine Ras ainsi que l'ensemble des molécules situées en amont et appartenant à la voie des MAPKs. Dans ce cadre, nous pouvons citer la molécule Raf, MEK, la MAP kinase p42/44. Les MAP kinases sont régulées par de nombreux facteurs. Les récepteurs membranaires phosphorylés par les JAKs recrutent d'abord la protéine adaptatrice "Growth factor receptor-bound protein 2" (Grb-2). Cette interaction peut faire intervenir les protéines adaptatrices "SH2-containing collagen-related protein (Shc) ou "SH2-containing phosphatase 2 (SHP2) qui se fixent aux phosphotyrosines des récepteurs où elles sont phosphorylées par les JAKs activées. La protéine Grb-2 se complexe avec le facteur d'échange "Son of sevenless" (Sos), le recrutement de ce complexe Grb-2/ Sos au niveau de la région intracytoplasmique des récepteurs permet à Sos d'activer la protéine Ras ancrée à la membrane plasmique. La protéine Ras passe alors de la forme associée au GDP à la forme associée au GTP, et la forme Ras-GTP s'associe avec la sérine/thréonine kinase Raf qui est alors phosphorylée. La kinase Raf activée phosphoryle une "MAPK/ERK Kinase" (MEK) qui à son tour active les MAPKs. Les MEKs sont donc des "MAPK kinase" (MAPKK) et Raf est une MAPK Kinase Kinase" (MAPKKK) ou une MEK Kinase (MEKK). Les MAPKs phosphorylées migrent vers le noyau où leur activité kinase va activer différents facteurs de transcription (FT) qui sont impliqués dans la régulation de nombreux gènes cibles (Kishimoto et al. 1994).

L'activité catalytique de JAK3 et la région A de la chaîne réceptrice  $\beta$  semble être essentiel pour la phosphorylation des résidus tyrosines de la protéine Shc. La région A de la chaîne réceptrice permet également la phosphorylation ou l'activation des protéine Shc, Ras, et de la MAP Kinase p42/44. Elle active également plusieurs proto-oncogènes comme c-fos et c-jun. Enfin, le recrutement et la phosphorylation de résidus tyrosine conduit à la différenciation préférentielle des lymphocytes T CD4 + aux dépends des lymphocytes T CD8 + (Sharp et al. 1997).

#### IV.2.4. La kinase PI3-K

La kinase PI3-K est une enzyme hétérodimérique d'environ 200 kDa composée d'une sous-unité régulatrice (p85) et d'une sous-unité catalytique (p110). Parmi ces différentes régions d'interaction avec de nombreux facteurs impliqués dans la transduction du signal, la sous-unité adaptatrice p85 possèdent deux domaines SH2 et un domaine "Src-Homology 3" (SH3) reconnaissant des motifs riches en prolines. La sous-unité fonctionnelle p110 est caractérisée par une activité sérine/théronine kinase. Le recrutement et l'activation de la PI3-K peuvent mettre en jeu les Jaks, SHP2, et les kinases Lck et Fyn de la famille Src. La PI3-K peut également s'associer avec SHP2, le "Grb associated binder 2" (Gab2 ou p98) et les complexes Grb-2/Sos pour activer la voie Ras/Raf/MAPKK/MAPK. La PI3-K activée permet la phosphorylation du "phosphatidyl inositol 4,5-biphosphate" (PIP<sub>2</sub>) en "phosphatidyl inositol 3,4,5-biphosphate" (PIP<sub>3</sub>) au niveau de la membrane plasmique (Wymann et Pirola 1998). Le PIP<sub>3</sub> interagit avec les domaines "Pleckstrin Homology " (PH) de la "3-Phosphatidyl inositol-Dependent protein Kinase 1" (PDK1) et de la sérine/thréonine kinase Akt. Le PIP<sub>3</sub> permet l'ancrage membranaire de PDK1 et d'Akt et induit un changement de conformation d'Akt nécessaire à son activation par la kinase PDK1 (Hill et Hemmings 2002).

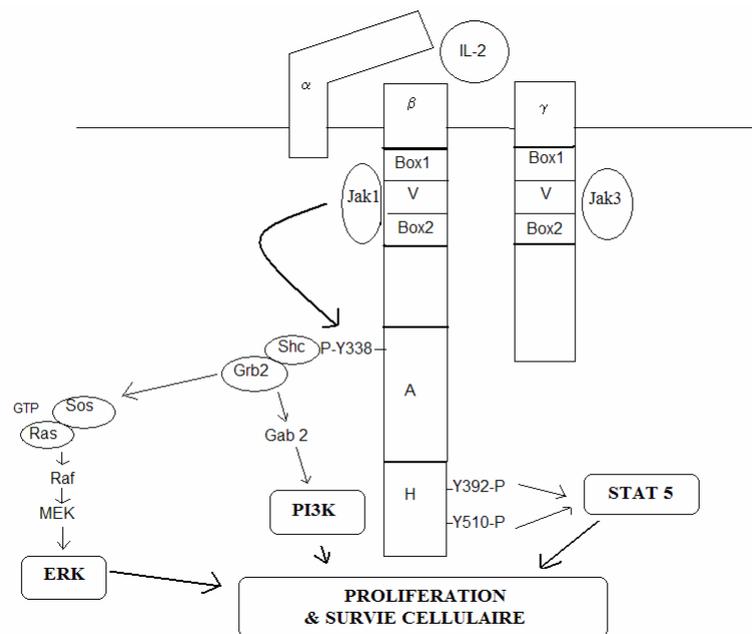
La kinase Akt activée devient cytosolique et peut alors avoir trois effets principaux :

- une augmentation de l'activité transcriptionnelle impliquant l'activation du "Nuclear Factor kappa B" (NF $\kappa$ B),
- une augmentation de la traduction protéique sur la "*small subunit ribosomal protein S6 Kinase*" (p70<sup>S6K</sup>),
- une augmentation de la survie cellulaire en induisant l'effet anti-apoptotique de la "*B cell leukaemia x Large form protein*" (Bcl-x<sub>L</sub>).

L'Akt est en effet, capable d'induire la séparation des protéines I $\kappa$ B et NF $\kappa$ B suite à l'activation de l'enzyme "I-Kappa-B Kinase" (IKK). L'inhibiteur I $\kappa$ B est dégradé et le facteur NF $\kappa$ B actif migre vers le noyau où il induit une activation génique.

Par ailleurs, la kinase Akt peut agir sur le "mammalian Target Of Rapamycin" (mTOR) qui est un activateur de la p70<sup>S6K</sup>. Cette kinase phosphoryle la protéine ribosomale S6 mise en jeu dans les mécanismes d'initiation de la traduction protéique (Reif et al 1997).

Enfin, Akt peut entraîner la séquestration cytosolique de "Bcl-x<sub>L</sub> /Bcl-2 associated death promoter" (Bad) en induisant la formation de complexes protéiques. Le facteur cytosolique Bad, qui n'est plus associé à Bcl-x<sub>L</sub> au niveau de la membrane externe des mitochondries, ne bloque plus Bcl-x<sub>L</sub> qui peut alors inhiber le relargage du cytochrome c par les mitochondries. Le cytochrome c cytosolique est un facteur pro-apoptotique qui joue un rôle dans la voie des "Cystéine protéases with aspartate specificity" (Caspases) (Datta et al. 1997).



**Figure 19**-Schéma des voies transduction auxquelles participent le système IL-2.

Le complexe récepteur de l'IL-2 est donc impliqué dans plusieurs voies de signalisation, ceci justifiant la pléiotropie de ces effets. L'idée de perturber celles-ci, a fait l'objet de nombreuses études, ayant donné lieu à la production d'anticorps monoclonaux ciblant certaines molécules clés, ceci dans le cadre de thérapie contre le cancer ou la prévention du rejet de greffe.

# Ciblage du récepteur de l'IL-2 dans la prévention du rejet de greffe

## **A . MECANISMES IMMUNOLOGIQUES DU REJET DE GREFFE**

Les mécanismes immunologiques complexes du rejet d'une allogreffe fait intervenir les différents éléments du système immunitaire qui concourent au rejet du non-soi par deux processus complémentaires : l'immunité cellulaire, dépendant principalement des cellules T et des cytokines, et l'immunité humorale, médiée par les anticorps produits par les cellules B. Le système immunitaire, dont le rôle est de protéger l'individu contre toute substance étrangère, est caractérisé par sa spécificité pour l'antigène, sa capacité à distinguer les antigènes du soi et du non-soi et enfin par sa mémoire pour permettre une réponse anamnétique plus forte lors de la réintroduction de l'antigène initial. Parmi les nombreuses substances antigéniques faisant l'objet d'un polymorphisme au sein de l'espèce (allotypes), la principale cible du rejet de greffe est l'ensemble des antigènes tissulaires, codés par des gènes exprimés à la surface des membranes cellulaires, définissant les systèmes d'histocompatibilité. Trois principaux systèmes interviennent dans le rejet de greffe:

- 1) le système des groupes sanguins ABO et Lewis correspond à des molécules tissulaires très fortement antigéniques ;
- 2) le système HLA (Human Leucocyte Antigen) code pour l'identité du soi (HLA classe I) et le contrôle du rejet du non-soi (HLA classe II);
- 3) un ensemble d'autres systèmes d'histocompatibilité appelés mineurs qui codent pour des antigènes de transplantation présentés sous forme de peptides en association avec les produits du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du donneur ou du receveur.

L'expression clinique du rejet d'allogreffe est étroitement liée à la nature de l'organe greffé, à l'intensité du rejet (suraigu, aigu ou chronique) et aux possibilités de manipuler la réponse immunologique du receveur afin d'éviter la réaction de rejet par le receveur en cas de greffe d'organe, ou par le greffon lui-même vis-à-vis de son hôte en cas de greffe de moelle.

Quelques définitions permettant de mieux cerner le sujet sont présentées dans le tableau 1

Définitions
<b>Autogreffe</b> : greffe d'organe ou de tissus lorsque donneur et receveur sont le même individu.
<b>Greffe syngénique</b> : greffe d'organe ou de tissus d'un donneur à un receveur génétiquement identiques (jumeaux homozygotes).
<b>Allogreffe</b> : greffe d'organe ou de tissus d'un donneur à un receveur génétiquement différent au sein d'une même espèce.
<b>Xéngreffe ou hétérogreffe</b> : greffe d'organe ou de tissus d'un donneur à un receveur appartenant à deux espèces animales différentes.

Tableau 1- Définitions

## ***I. Antigènes exprimés par les cellules du greffon***

Trois antigènes exprimés en abondance à la surface des membranes cellulaires sont impliqués dans les mécanismes immunologiques du rejet de greffe.

### ***I.1. Antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH ou HLA)***

Les gènes codant les antigènes d'histocompatibilité, qui interviennent dans l'identité du soi (HLA classe I) et le contrôle du rejet du non soi ou régulation de la réponse immune (HLA classe II), Les antigènes HLA A et B sont les principaux antigènes HLA de classe I et correspondent aux produits des 2 locus majeurs de classe I du CMH : HLA A et HLA B. Il existe un troisième locus de classe I, HLA C, situé entre HLA A et B. Les antigènes HLA C sont moins immunogènes et, en pratique, ont une importance moindre dans les typages tissulaires réalisés. Les antigènes HLA de classe I sont exprimés par toutes les cellules nucléées de l'organisme. Les cellules lymphoïdes expriment beaucoup plus d'antigènes HLA de classe I que les cellules parenchymateuses. A ce jour, plus de 120 allèles de HLA classe I ont été mis en évidence. De nouveaux gènes appartenant au système HLA classe I ont été récemment mis en évidence : E, F, G, H, J et pourraient avoir un rôle dans le rejet de greffe. Les antigènes HLA de classe II sont des glycoprotéines transmembranaires, hétérodimériques comportant une chaîne  $\alpha$  et une chaîne  $\beta$  associées de manière non covalente. La région du

CMH codant les antigènes de classe II, appelée HLA D, est subdivisée en 3 sous-régions: HLA DP, DQ et DR. Les antigènes HLA de classe II sont exprimés par certains types cellulaires seulement : lymphocytes B, macrophages, cellules endothéliales et cellules dendritiques. A ce jour, plus de 150 allèles ont été mis en évidence. L'expression des antigènes HLA, notamment de classe II, est augmentée pendant le rejet. Les infections virales associées à un rejet jouent le rôle d'inducteur puissant pour l'expression des antigènes HLA par l'intermédiaire d'une sécrétion d'IFN gamma.

## ***1.2. Les antigènes des groupes sanguins***

### ***1.2.1. Le système ABO***

Les antigènes de groupes sanguins érythrocytaires ABO sont de puissants antigènes de transplantation. Le locus ABO possède 3 allèles A, B et O : gènes A et B codominants, gène O récessif avec 4 génotypes possibles (A, B, AB, O). Les antigènes A et B sont présents sur les hématies, mais aussi sur certaines cellules épithéliales et endothéliales. Des anticorps anti-A ou anti-B immuns, encore appelés allo-anticorps, peuvent apparaître à la suite d'une immunisation (grossesse, transfusions). La compatibilité dans le système ABO doit être rigoureusement respectée pour toute transplantation d'organe.

### ***1.2.2. Autres systèmes antigéniques des groupes sanguins***

De nombreux autres alloantigènes sont portés par les globules rouges notamment antigènes Rhésus, antigènes des groupes Kell, Duffy et Kidd. A la différence des antigènes A et B, il n'existe pas d'anticorps naturels contre ces autres systèmes antigéniques érythrocytaires, qui peuvent être néanmoins responsables d'allo-immunisation. En pratique, la compatibilité dans tous ces autres systèmes antigéniques des groupes sanguins n'est pas requise pour réaliser une transplantation d'organe.

### ***I.3. Les antigènes mineurs d'histocompatibilité***

Le rôle de certains antigènes indépendants du CMH et du système ABO dans le rejet des greffes est démontré par la survenue de rejet chez des receveurs d'allogreffe HLA identiques. La nature des antigènes mineurs d'histocompatibilité est encore mal connue. Il s'agit principalement d'antigènes exprimés par les cellules endothéliales vasculaires et par les monocytes du donneur. Les cellules endothéliales qui expriment les antigènes de classe I et II, les antigènes du système ABO sont des cibles privilégiées des réactions de rejet. Le rôle des antigènes mineurs d'histocompatibilité est variable selon l'organe greffé. L'antigène érythrocytaire Lewis et des antigènes mâles, codés par le chromosome Y, pourraient être impliqués dans le rejet de greffe d'organe mais aussi, dans la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD ou *Graft versus host Disease*).

## ***II. Les aspects du rejet de greffe***

La greffe pour remplacer des organes malades est désormais un traitement médical important. Dans la plupart des cas, les réponses immunitaires adaptatives contre les tissus greffés représentent le principal obstacle à la réussite d'une greffe. Le rejet est provoqué par des réponses immunes contre des alloantigènes portés par le greffon (principalement, les molécules du CMH) qui sont des protéines qui varient d'un individu à l'autre dans une même espèce et donc perçues comme étrangères par le receveur.

### ***II.1. La présentation directe***

La majorité des tissus greffés contiennent des leucocytes passagers. Ces leucocytes sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) exprimant les CMH du donneur. Suite à la greffe, ces CPA migrent aux nœuds lymphatiques ou autres organes lymphoïdes secondaires, où elles activeront les cellules T CD4+ *helper* (TH) du receveur. Ces CPA, appartenant au greffon fournissent les signaux de co-stimulation nécessaires à l'activation des lymphocytes. Les TH ont un rôle prédominant dans l'orchestration et l'amplification d'une réponse allogénique. Les cellules dendritiques du greffon sont les actrices principales dans la présentation directe. Il est suggéré que les myoblastes peuvent servir de CPA pour activer

directement le système immunitaire suite à leur transplantation (Goebels et al. 1992; Garlepp et al. 1995; Curnow et al. 2001). Cependant aucune évidence de leur migration au niveau des organes lymphoïdes secondaires ou de leur rôle dans l'activation des lymphocytes *in vivo* n'a été démontré.

## ***II.2. La présentation indirecte***

Lors d'une greffe de tissus ou de cellules, des débris tissulaires accompagnent l'implantation du greffon, ce qui entraîne la phagocytose de protéines allogéniques par les CPA du receveur. Ces CPA vont ensuite migrer aux organes lymphoïdes secondaires pour les présenter aux cellules T et les activer. Cette situation immunogénique correspond à une situation classique de présentation d'un peptide du non soi dans le contexte du CMH du soi. Elle implique moins de lymphocytes et l'ampleur de la réponse est moindre comparativement à la présentation directe allogénique.

## ***III. Mécanismes impliqués dans le rejet de greffe***

Le processus de rejet du greffon est causé essentiellement par une réponse immunitaire à médiation cellulaire. Les réactions d'hypersensibilité retardée et les réactions de cytotoxicité à médiation cellulaire ont été toutes deux mises en cause. On peut distinguer deux étapes dans ce processus : une phase de sensibilisation, dans laquelle les lymphocytes du receveur réactifs aux antigènes prolifèrent en réponse aux alloantigènes du greffon et, une étape effectrice, dans laquelle prend place la destruction immunitaire du greffon.

### ***III.1. Phase de sensibilisation***

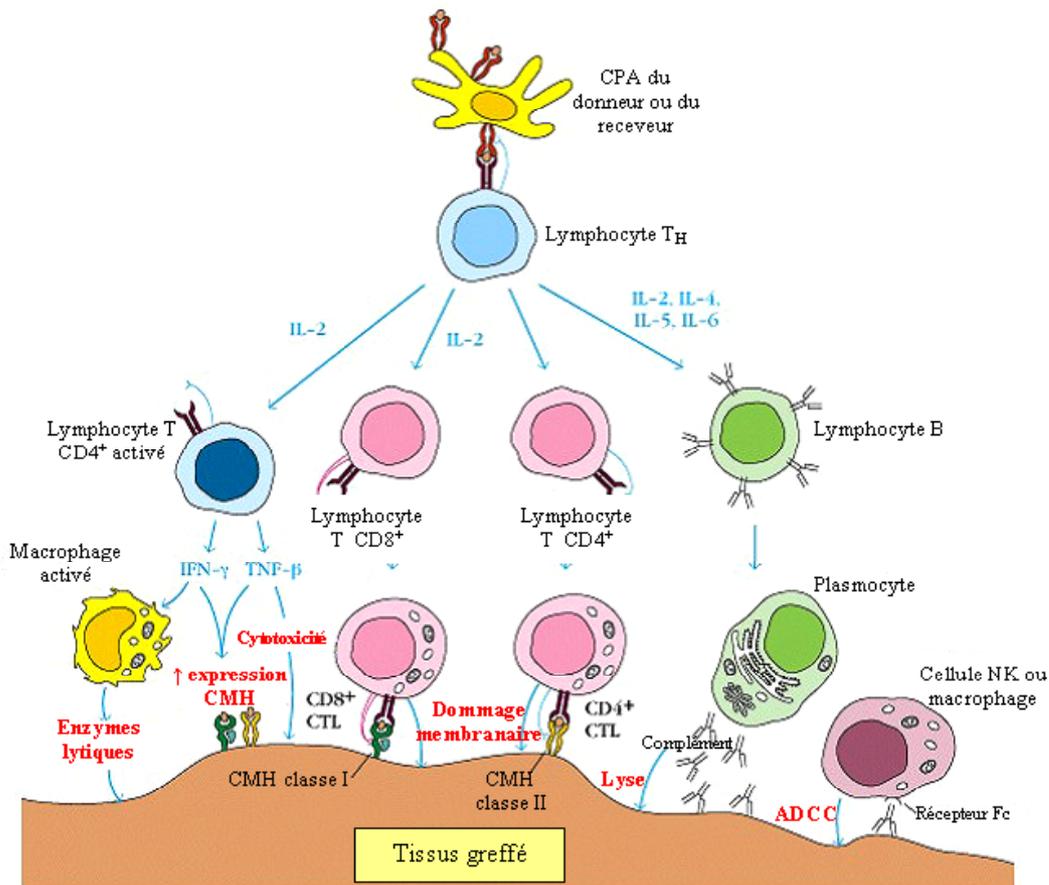
Pendant la phase de sensibilisation, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> s'activent et prolifèrent suite à la présentation des antigènes allogéniques. Les antigènes d'histocompatibilité majeurs et mineurs sont impliqués. En règle générale, la réponse immunitaire à des antigènes mineurs est plus faible. La présentation des alloantigènes peut s'effectuer par les cellules du donneur et/ou les cellules de l'hôte, déterminant une présentation directe ou indirecte respectivement (Goldsby et al. 2000).

### ***III.2. La phase effectrice***

Une variété de mécanismes est impliquée lors de la phase effectrice du rejet. Les réactions cellulaires les plus communes comprennent les réactions d'hypersensibilité retardée ("delayed-type hypersensitivity") et la cytotoxicité induite par les CTL (Figure 4.1). Les réactions d'hypersensibilité retardée sont causées par la sécrétion de certaines cytokines par les TH qui induisent une forte réaction inflammatoire localisée. Cette réaction est caractérisée par un influx massif de cellules inflammatoires, dont les macrophages sont les principaux intervenants, provoquant donc le dommage au tissu greffé. Les CTL sont, pour leur part, principalement des cellules T CD8+, restreintes aux CMH de classe I, mais parfois aussi des cellules T CD4+, restreintes aux CMH de classe II.

Suite à leur activation spécifique par les CPA du donneur ou du receveur, ainsi que par les TH, les CTL prolifèrent et migrent dans la circulation pour trouver leur cible. Lorsqu'un CTL reconnaît sa cible sur les cellules du greffon, il détruit cette dernière soit en induisant l'apoptose par Fas, soit en relâchant des enzymes (perforine et granzyme) qui percent la membrane et fragmentent l'ADN. La présence de lymphocytes infiltrants est recherchée en histochimie pour caractériser le processus de rejet sur une biopsie du greffon.

Des mécanismes moins communs de la phase effectrice de rejet sont la lyse par le complexe anticorps-complément par un phénomène de CDC (*Complement Dependant Cytotoxicity*) et l'ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*). Certains lymphocytes B produisent des anticorps spécifiques des protéines allogéniques du greffon. Les anticorps fixés à la surface des cellules du donneur peuvent, selon leur isotype, activer la cascade du complément, menant à la lyse de la cellule cible. Lors de l'ADCC, les anticorps liés à leur cible activent certaines cellules cytotoxiques via leur récepteur de la région Fc des immunoglobulines. Les cellules possédant ce récepteur sont les cellules NK, les macrophages, les monocytes, les neutrophiles et les éosinophiles. La majorité de ces cellules lysent leur cible en relâchant des enzymes cytolytiques ou en sécrétant le TNF (*Tumor necrosis factor*).



**Figure 20-**Représentation schématique des mécanismes de rejet de greffes

Parmi ceux-ci, notons les réactions d'hypersensibilité retardée (« delayed-type hypersensitivity »), la cytotoxicité induite par les CTL, la lyse par le complexe anticorps-complément et l'ADCC (« antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity ») (d'après Goldsby et al. 2000).

## ***IV. Manifestations cliniques du rejet du greffon***

On distingue trois types de rejet immunitaire suite à une greffe : le rejet hyperaigu, aigu et chronique.

### ***IV.1. Le rejet hyperaigu***

Le rejet hyperaigu est généralement causé par la fixation d'anticorps circulants et préformés (anticorps réagissant contre les antigènes du greffon) sur le tissu transplanté, causant ainsi une forte réaction inflammatoire et une forte coagulation du sang en quelques minutes à quelques heures suivant la transplantation, empêchant la vascularisation du greffon (Schwartz 1994). Les complexes antigènes-anticorps qui se forment activent le système du complément. Ce type de rejet se produit lors de transplantations d'organes solides. Les antigènes causant ce type de réaction sont les antigènes des groupes sanguins et les CMH qui ont déjà été mis en présence du système immunitaire du receveur pendant une grossesse, une transfusion ou une greffe antérieure. Les tests préventifs sont aujourd'hui le meilleur moyen pour contrer ce type de rejet. Les xénogreffes génèrent aussi un rejet hyperaigu, causé par la présence d'anticorps circulants naturels dirigés contre les antigènes provenant d'autres espèces.

### ***IV.2. Le rejet aigu***

Le rejet aigu est causé par le développement de réponses cellulaires et humorales spécifiques qui surviennent environ une semaine suivant la transplantation. C'est durant cette période que l'emploi d'immunosuppresseurs devient essentiel pour permettre la survie du greffon. En absence d'immunosuppression, le tissu greffé est infiltré de lymphocytes T CD4+ et CD8+, ainsi que d'autres leucocytes, et on détecte aussi la présence d'alloanticorps circulants. Ces phénomènes mènent à la destruction du tissu greffé.

### ***IV.3. Le rejet chronique***

Si le tissu greffé survit au rejet hyperaigu et aigu, une période de quiétude s'installe. Cette période peut durer plusieurs années pendant lesquelles les fonctions du greffon apparaissent normales. C'est pendant cette période que le rejet chronique peut survenir. Il n'existe aucun médicament à ce jour permettant de contrer ce phénomène qui se produit chez 50% des patients transplantés. Le rejet chronique est caractérisé par une occlusion lente et constante des artères, des veines et des autres structures tubulaires du tissu greffé. Durant une certaine période, cette occlusion est compensée par d'autres phénomènes physiologiques, dont le développement ne peut être décelé. Cependant, l'occlusion vasculaire atteint un point critique, causant ainsi une ischémie menant à la nécrose et la fibrose tissulaire. Les causes du rejet chronique ne sont pas encore connues, mais il existe un lien entre le développement d'un rejet aigu et le rejet chronique.

### ***IV.4. GVHD (graft-versus-host disease ).***

Dans le cas de greffe de moelle osseuse, la situation inverse peut se produire. C'est-à-dire que ce n'est pas l'hôte qui rejette le greffon, mais le greffon qui rejette l'hôte. En effet, la présence de lymphocyte T matures contaminant les cellules de moelle osseuse d'un donneur peuvent s'activer contre les CMH du receveur et engendrer des sévères réactions inflammatoires, appelées GVHD. Les effets se reflètent par des éruptions cutanées, des diarrhées et des inflammations pulmonaires. Ces réactions peuvent se produire non seulement en cas de disparité des CMH de classe I et II, mais aussi des antigènes mineurs. Les GVHD sont une complication commune des situations de greffe de moelle osseuse, et elles peuvent être contrôlées par élimination préalable des lymphocytes T des cellules de moelle greffée et par administration d'immunosuppresseurs pendant une courte période suivant la greffe de moelle (Janeway et al. 2001).

## ***B . IMPLICATION POUR LA TRANSPLANTATION***

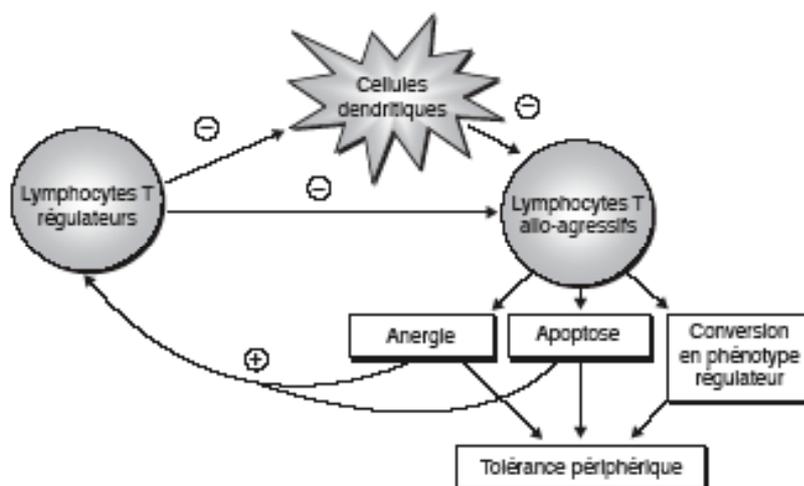
### ***I. Les Aspects expérimentaux***

De nombreux protocoles sont capables chez le petit animal, mais aussi chez le porc ou le primate, d'induire une tolérance de greffe d'organe ou de peau. Certains de ces protocoles impliquent principalement l'induction d'une tolérance centrale par sélection thymique et permettent l'établissement d'un macrochimérisme chez un animal, par ailleurs déplété en lymphocytes T matures périphériques. Bien que ces expérimentations ne soient pas transposables à l'homme, elles permettent de comprendre les mécanismes de tolérisation. Ainsi l'injection intrathymique d'alloantigènes induit une tolérance chez le rongeur mais plus difficilement chez le gros animal et surtout, des protocoles utilisant l'infusion de cellules souches hématopoïétiques allogéniques (Sykes et al. 2001). D'autres protocoles impliquent l'établissement d'une tolérance périphérique par des anticorps anti-CD3 non mitogéniques (Chatenoud et al. 2003), ou des anticorps anti-corécepteurs CD4 et CD8 non déplétants (Graca et al.2003), ou le blocage des signaux de co-stimulation par CTLA4-Ig (Larsen et al. 1996), anti-CD40 L (Kirk et al. 1999), anti-IcoS (Ozkaynak et al. 2001), anti-OX40. Néanmoins, les lymphocytes T CD4+ semblent plus sensibles que les lymphocytes T CD8+ au blocage de ces signaux de costimulation, ce qui implique, soit l'utilisation d'anticorps déplétant anti-CD8, soit le blocage d'autres voies de co-stimulation. Les mécanismes impliqués dans cette tolérance associent à des degrés divers, anergie, apoptose et suppression par des T régulateurs (Li et al. 2001). Il faut noter que dans ces protocoles, l'administration concomitante d'immunosuppresseurs, comme les inhibiteurs de calcineurine (comme la ciclosporine et le tacrolimus ou FK506) ou les corticoïdes empêchent la survie prolongée ou la tolérance du greffon (Li et al. 2000). Or l'anergie induite par le blocage de la co-stimulation nécessite la déphosphorylation et la translocation nucléaire de NF-AT, principale cible des anticalcineuriques. D'autre part, l'apoptose induite par l'activation (AICD pour *Activation-induced Cell Death*) nécessite la production d'IL-2, l'expression membranaire de la chaîne  $\alpha$  CD25 de son récepteur, et l'expression membranaire de Fas-L, trois évènements inhibés par les anticalcineuriques. Ces éléments soulignent la difficulté d'associer des molécules immunosuppressives dans ces protocoles d'induction de tolérance. En effet, l'effet n'est souvent pas additif ou synergique, comme cela a été le cas ces dernières années dans les

stratégies visant à inhiber le rejet aigu cellulaire, mais au contraire antagoniste. En plus des mécanismes d'anergie et d'apoptose des T allo-réactifs nécessaires à l'induction de tolérance, le maintien à long terme du greffon nécessite le développement de T régulateurs .

## II. Anergie, apoptose et régulation

Ces mécanismes ne sont pas indépendants. Nous avons vu que les cellules T apoptotiques favorisaient l'émergence de T régulateurs. IL existe, d'autre part, des liens très clairs entre l'anergie clonale et l'activité suppressive La plupart des LT régulateurs sont anergiques. Par ailleurs, les LT anergiques semblent inhiber la fonction présentatrice des cellules dendritiques sans que les mécanismes n'apparaissent très clairs (Lombardi et al. 1994). Sur le plan physiologique, on peut envisager que le pool des lymphocytes T régulateurs puisse contrôler les LT agressifs lors de l'état d'équilibre ou d'une réponse immunitaire déclenchée par un stimulus "faible" comme un autoantigène. Par contre, l'anergie empêche la prolifération de ces lymphocytes T régulateurs lors d'une réponse immunitaire à un antigène puissant comme un antigène infectieux, permettant la prolifération de lymphocytes T agressifs et l'élimination de ce stimulus. La plupart des lymphocytes T "agressifs" vont alors mourir d'apoptose par AICD, les LT restants, mémoires, étant contrôlés par les LT régulateurs.



**Figure 21-** La coopération entre anergie, apoptose et régulation. (d'après Lebranchu Y. 2004).

Ainsi, on peut considérer la tolérance comme la résultante d'un équilibre entre le pool des lymphocytes agressifs et celui des lymphocytes T régulateurs (Li et al. 2001). L'induction d'une tolérance durable en transplantation peut donc résulter d'un contrôle ou d'une délétion des lymphocytes T régulateurs, par exemple en interférant avec la présentation de l'antigène par les cellules dendritiques .

### ***III. Les perspectives***

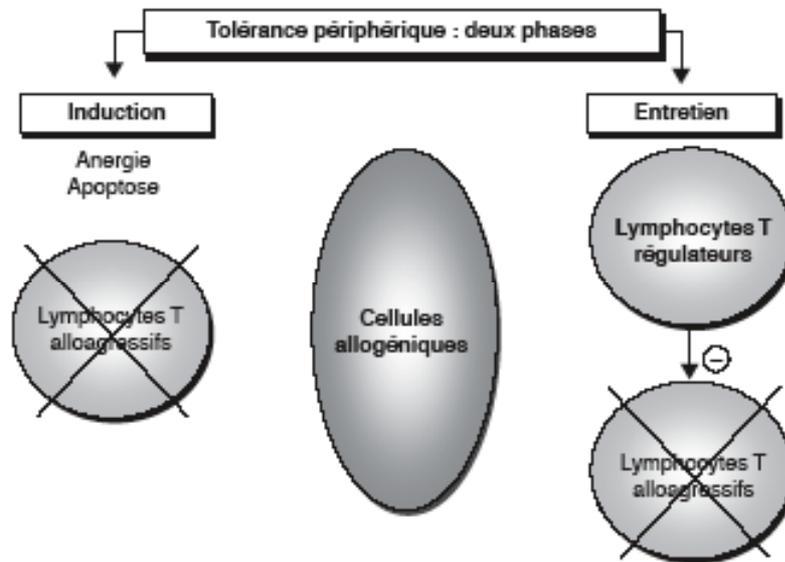
Un protocole séduisant de tolérance de greffe vient d'être récemment décrit par l'équipe de *T. Strom*, associant d'une part, un blocage de la prolifération des LT alloréactifs par l'utilisation de la rapamycine et d'une protéine de fusion IL-15 –Fc antagoniste, inhibant la fixation de l'IL-15 sur son récepteur. IL associe d'autre part, une apoptose de ces lymphocytes alloréactifs par une protéine de fusion IL-2-Fc agoniste favorisant l'AICD tout en respectant l'émergence de lymphocytes T régulateurs (Zheng et al. 2003).

Chez l'homme, il existe des signes encourageants permettant d'espérer l'induction de tolérance. Des protocoles de greffes combinées de rein et de cellules souches hématopoïétiques avec ou sans myéloablation ont été testés avec succès dans le myélome permettant l'établissement d'un chimérisme mixte et, malgré l'absence de tout traitement immunosuppresseur ultérieur, une survie à moyen terme des patients sans signe de rejet ni de récurrence de la maladie.

Des protocoles sont actuellement en cours utilisant une molécule CTLA4-Ig de seconde génération (LEA 29 Y) ou des anticorps anti-CD3 non mitogéniques. D'autres protocoles ont pour objectif de diminuer l'immunosuppression en long cours ("prope tolerance") par l'utilisation initiale d'anticorps monoclonaux Campath 1H, anti-Campath 3 ou d'anticorps polyclonaux anti-T. Des résultats encourageants ont d'ores et déjà été observés, permettant dans certains cas d'arrêter l'immunosuppression. D'autre part, sont en gestation des essais de thérapie cellulaire par infusion de cellules dendritiques immatures et/ou rendues tolérogènes *ex vivo* par des inhibiteurs de NF- $\kappa$ B tels que la dihydroxyvitamine D3, la désoxyspergualine, la N -acétylcystéine, ou par l'acide mycophénolique (Jonuleit et al. 2003). L'étude des paramètres immunologiques des patients tolérant leur greffon, soit spontanément après arrêt de leur traitement immunosuppresseur, soit après protocole d'induction de

tolérance, suscite de réels espoirs pour l'identification de paramètres spécifiques de la tolérance, comme une restriction V $\beta$  du répertoire T de leurs lymphocytes sanguins.

La caractérisation d'un tel "profil de tolérance" chez les greffés permettrait d'une part, d'identifier les patients chez qui des protocoles de baisse ou d'arrêt de l'immunosuppression pourraient être menés et d'autre part, d'identifier les stratégies thérapeutiques susceptibles d'induire ce profil. Ainsi pourrait se dessiner dans un avenir proche des modifications de ces stratégies.



**Figure 22-** Les deux phases d'induction et de maintien de la tolérance périphérique (D'après Lebranchu Y. 2004)

## ***C .IMMUNOSUPPRESSION ET IL-2***

L'emploi d'immunosuppresseurs permet aujourd'hui la survie de milliers de patients greffés à travers le monde. Malgré le développement de nouvelles formulations chimiques d'immunosuppresseurs de plus en plus efficaces pour contrôler le rejet cellulaire, leur usage s'accompagne indéniablement d'effets secondaires néfastes. En effet, les patients sous traitement immunosuppresseur sont plus sujets aux infections et au développement de cancers, puisque tout leur système de défense est déprimé, en raison de l'action non-spécifique de ces drogues. De plus, l'emploi de certains immunosuppresseurs peut être néphrotoxique et neurotoxique.

Dans le but d'augmenter la spécificité de l'immunosuppression, certains anticorps monoclonaux ou polyclonaux ont été développés. La plupart sont dirigés contre des récepteurs exprimés par les lymphocytes. Les anticorps polyclonaux sont dirigés contre des lymphocytes humains, comme l'ATGAM (antithymocyte globulin) et la thymoglobine. Après leur administration, ces anticorps provoquent la chute du nombre de lymphocytes totaux, mais particulièrement des lymphocytes T. Ces anticorps sont surtout utilisés lors d'épisodes de rejet aigu. Par contre, leur emploi est associé à des effets secondaires importants comme des réactions allergiques et un risque élevé d'infections.

Les anticorps monoclonaux ont été initialement testés en utilisant des anticorps complets de souris. Le plus répandu est l'OKT3 (anti-CD3). Après injection, la quantité de lymphocytes circulants chute sous les 5%. Cet anticorps est aussi surtout utilisé lors d'épisodes de rejet aigu, lorsque les patients deviennent résistants aux immunosuppresseurs stéroïdiens. Cet anticorps ne reste que quelques jours en circulation, puisque le patient produit des anticorps contre les immunoglobulines de souris. Son utilisation est aussi associée aux effets indésirables de l'immunosuppression (risque d'infection et de développement de cancer) et aux effets indésirables dus à sa nature (fièvre, frissons, œdème pulmonaire et néphrotoxicité).

Une seconde catégorie d'anticorps monoclonaux est dirigé contre le récepteur à l'IL-2 (IL-2R). Ces anticorps ont la particularité d'être humanisés, ce qui diminue leur immunogénicité. A partir d'un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'IL-2R humain, seules les parties liant l'antigène (CDR) sont préservées et insérées dans un gène produisant un anticorps humain. Cette humanisation permet à l'anticorps de perdurer plusieurs mois dans

un organisme humain. Deux anti-IL-2R humanisés ont été développés : daclizumab et basiliximab. Ces agents induisent une immunosuppression et sont efficaces pour réduire l'incidence de rejet aigu. Leur utilisation offre l'avantage de ne pas causer d'effets indésirables dus à leur structure moléculaire. D'autres anticorps monoclonaux humanisés sont en essais cliniques et pourraient être appliqués à la prévention du rejet de greffe : CAMPATH 1H et CAMPATH 3 (anti-CD52), anti-LFA-1 (bloque l'interaction LFA-1:ICAM-1), CTLA4-Ig (seconde génération), hu5C8 et IDEC131 (anti-CD154), anti-CD45RB, et h1F1 (anti-B7.1; CD80) et h3D1 (anti-B7.2; CD86).

Un fait important à noter est l'échec d'essais cliniques de l'utilisation du hu5C8 (anti-CD154) par la compagnie Biogen après qu'un patient soit décédé de complications thromboemboliques. De plus, l'utilisation du hu5C8 n'a pas démontré une immunosuppression efficace (5 patients sur 7 ont eu des épisodes de rejet).

## ***I. Les inhibiteurs de l'IL-2***

On trouve dans le plasma au cours de diverses maladies d'origine tumorale, immunologique ou infectieuse (bactérienne, virale, parasitaire) des récepteurs de l'IL-2, solubles, dont la fonction reste obscure mais qui pourraient réduire l'activité de l'IL-2 en la fixant. Cela permet d'imaginer qu'ils puissent intervenir dans le rejet du greffon en bloquant l'IL-2 circulante.

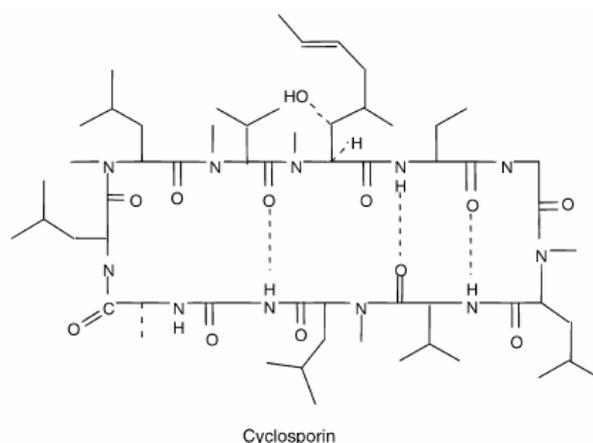
Rappelons également que l'IL-2 a des effets de type autocrine et paracrine. Elle active des récepteurs situés sur la membrane de diverses cellules telles que lymphocytes T, les cellules NK et les lymphocytes B activés.

L'IL-2 est sécrétée essentiellement par les lymphocytes T de type CD4<sup>+</sup> stimulés par les antigènes présentés par les CPA et par l'IL-1. L'interaction entre un CPA porteur d'un antigène présenté par les molécules HLA de classe II et le récepteur d'un lymphocyte T Helper, provoque au niveau du lymphocyte T la stimulation de la phospholipase C qui hydrolyse le Phosphatidylinositol (PIP<sub>2</sub>) en Inositoltriphosphate (IP<sub>3</sub>) et en diacylglycérol (DAG). L'IP<sub>3</sub> libère du calcium qui active la calmoduline, laquelle s'unit à la calcineurine. Le complexe calmoduline-calcineurine déphosphoryle le NF-AT (nuclear factor of activated T cell) qui est présent dans les cellules lymphoïdes quiescentes à l'état phosphorylé. Le NF-AT déphosphorylé pénètre dans le noyau et active la synthèse d'IL-2.

Les inhibiteurs de la calcineurine constituent la pierre angulaire du traitement immunosuppresseur des patients transplantés. Deux drogues sont actuellement disponibles : la cyclosporine A (CsA) et le tacrolimus. Ces deux molécules pénètrent dans le cytoplasme des lymphocytes de type CD4<sup>+</sup> où ils inhibent la transduction du signal conduisant à la synthèse d'IL-2.

### ***1.1. La cyclosporine A (CsA - Néoral® ; Sandimmun®)***

La ciclosporine (dénommée initialement cyclosporine A) extraite du champignon *Tolypocladium inflatum*. Il s'agit d'un peptide neutre, riche en acides aminés hydrophobes, insoluble dans l'eau mais soluble dans les solvants organiques (Figure 23). Elle a de puissantes propriétés immunomodulatrices résultant de l'inhibition spécifique des lymphocytes T et la suppression concomitante de la production de cytokines, principalement celle de l'IL-2, mais également celle de l'IL-3, d'IL-4, de TNF  $\alpha$ , d'IFN  $\gamma$  et du GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*).



**Figure 23**-Structure chimique de la ciclosporine

La cyclosporine est un médicament majeur, découvert et utilisé en thérapeutique avant que l'on ne connaisse son mécanisme d'action au niveau moléculaire. Elle a été sélectionnée parce qu'elle inhibait le rejet de greffe chez l'animal. Par la suite elle s'est montrée efficace en thérapeutique dans la même indication.

Le mécanisme d'action de la cyclosporine privilégié actuellement est l'inhibition de la synthèse de certaines cytokines, en particulier celle de l'IL-2 par les lymphocytes T Helper. Cette inhibition s'opère selon les mécanismes suivants :

1- la ciclosporine pénètre dans le cytoplasme des lymphocytes T Helper où elle se lie à une immunophiline, la cyclophiline, qui est une enzyme, la peptidyl-prolyl-cis-trans-isomérase ou rotamase.

2- le complexe cyclophiline-ciclosporine se lie à la calcineurine et inhibe son activité phosphatase, ce qui conduit à l'accumulation de phosphoprotéines parmi lesquelles le NF-AT (nuclear factor of activated T cell) sous forme phosphorylée qui ne pénètre pas dans le noyau et n'induit pas la synthèse d'IL-2.

En bloquant l'expression de l'IL-2, la ciclosporine bloque au stade quiescent les lymphocytes en phase G0 ou G1 du cycle cellulaire. Les conséquences sont :

- l'inhibition de la prolifération des lymphocytes CD4
- le blocage de l'activation des lymphocytes cytotoxiques
- l'inhibition de la production d'IFN $\gamma$

L'action moléculaire de la ciclosporine est spécifique et réversible. Contrairement aux agents cytostatiques, la ciclosporine ne déprime pas l'hématopoïèse (elle respecte en particulier les polynucléaires) et ne modifie pas la fonction de phagocytose.

La ciclosporine inhibe, outre la synthèse d'IL-2, celle d'IL-3 et d'IL-4, du GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*) et du TNF, cytokines intervenant notamment dans le rejet de greffes.

Un autre mécanisme d'action a été proposé récemment : la ciclosporine augmenterait la synthèse de TGF- $\beta$  qui a des propriétés immunosuppressives.

Sur le plan pharmacocinétique, la ciclosporine est métabolisée dans l'organisme par le cytochrome P-450 en plusieurs métabolites oxygénés dont certains possèdent une activité pharmacologique. Son métabolisme peut être modifié, soit accéléré, soit ralenti, par d'autres médicaments :

\* accéléré par les inducteurs enzymatiques comme la rifampicine, la carbamazépine, le phénobarbital, qui diminuent sa concentration plasmatique

\* ralenti par les inhibiteurs du cytochrome P-450 comme l'érythromycine et le kétoconazole qui entraînent une élévation de sa concentration plasmatique.

La molécule est lipophile et quoique de nature polypeptidique elle passe la barrière intestinale. Sa distribution dans le sang est particulière puisque sa répartition sanguine est d'environ 33 à 47% dans le plasma, 10 à 20% dans les leucocytes, et 41 à 56% dans les hématies. Ainsi, compte tenu de l'équilibre instable entre les différents compartiments sanguins, qu'il est nécessaire de doser la ciclosporine sur un échantillon de sang total.

La ciclosporine dont la prescription doit être initiée à l'hôpital a plusieurs indications :

**la transplantation d'organe et la greffe de moelle osseuse** où elle est utilisée dans la prévention du rejet du greffon et le traitement du rejet lorsqu'il survient ;

**en néphrologie**, le traitement de deuxième intention des syndromes néphrotiques avec lésions glomérulaires ;

**en dermatologie**, les formes étendues et graves du psoriasis résistant aux autres traitements et de la dermatite atopique de l'adulte ;

**en rhumatologie**, le traitement des formes très actives et graves de la polyarthrite rhumatoïde, en cas d'inefficacité des autres traitements ;

**en ophtalmologie**, le traitement de certaines uvéites ;

**En hématologie**, le traitement des aplasies médullaires acquises sévères.

L'indication essentielle de la ciclosporine reste **la transplantation d'organe** qui s'est développée grâce à son efficacité.

La molécule originale présente des caractéristiques physico-chimiques qui influencent négativement la plupart des paramètres cinétiques (biodisponibilité orale, surface sous la courbe, fluctuations des concentrations plasmatiques, grande variabilité inter-individuelle). Compte tenu de ces éléments, l'industrie pharmaceutique a développé une seconde formulation (Néoral®) qui consiste à incorporer la substance dans une micro-émulsion à base de surfactant, de solvants lipophiles et hydrophiles ainsi que d'éthanol. Administrée à des volontaires sains ou à des transplantés rénaux stables, la ciclosporine dispersée dans cette micro-émulsion a été effectivement absorbée de manière plus consistante (C<sub>max</sub> et AUC augmentés) et sans interférence alimentaire. Il y a de surcroît une corrélation linéaire entre la biodisponibilité et la dose administrée *per os*, ce qui n'est pas le cas pour la préparation conventionnelle.



Ce macrolide immunosuppresseur inhibe l'activation des lymphocytes T et la prolifération des lymphocytes B dépendants des lymphocytes T auxiliaires (CD4). Il diminue la production des lymphokines, et en particulier l'IL-2 et l'IL-3, ainsi que l'IFN  $\gamma$ . Il diminue également l'expression du récepteur de l'IL-2.

Le tacrolimus a le même mécanisme d'action que la ciclosporine, mais au lieu de se fixer à la cyclophylline, il se fixe à une protéine appelée FKBP12 (FK binding protein). Le complexe tacrolimus-FKBP inhibe l'activité phosphatasique de la calcineurine responsable de la déphosphorylation du NF-AT-P. Comme seul le NF-AT (non phosphorylé) est susceptible de pénétrer dans le noyau et de stimuler la production d'IL-2, l'inhibition de la déphosphorylation du NF-AT-P, l'inactive.

Les indications du tacrolimus sont *la prévention et le traitement du rejet de greffe* après transplantation rénale et hépatique. En application locale, le tacrolimus s'est montré efficace dans le traitement de **la dermatite atopique**.

Sa biodisponibilité chez l'homme est très variable, elle varie entre 20 et 25% chez les transplantés rénaux ou hépatiques. Après administration orale, l'état d'équilibre est atteint en 3 jours (avec une  $C_{max}$  entre 40 et 75 ng/ml chez l'adulte). Le tacrolimus est fortement lié aux protéines plasmatiques (>98%), il est également fortement lié aux érythrocytes. Le rapport sang total sur plasma est d'environ 20. Comme la ciclosporine A, le tacrolimus doit être dosé dans le sang total.

Parmi ses effets indésirables, on peut citer des troubles métaboliques (hyperkaliémie, hyperglycémie, insuffisance rénale), des manifestations neuropsychiatriques (tremblements, céphalées, paresthésies, troubles visuels, troubles du comportement), une hypertension artérielle, des troubles digestifs, un risque majoré d'infections ou de lymphomes.

Le tacrolimus inhibe le cytochrome P-450 de type 3A4, responsable de la métabolisation de divers autres médicaments tels que les inhibiteurs calciques, macrolides, ciclosporine et glucocorticoïdes ; diverses interactions pharmacocinétiques étant possibles. Le tacrolimus étant tératogène chez certaines espèces animales, son utilisation pendant la grossesse est contre-indiquée.

## II. Les anti-métabolites

### II.1. Le mycophénolate mofétil (Cellcept®)

C'est l'ester morpholinoéthyl (mofétil) de l'acide mycophénolique (MPA), inhibiteur compétitif et réversible de l'enzyme inosine-monophosphate-déshydrogénase (IMPDH), impliquée dans la synthèse *de novo* des purines (nucléotides dérivés de la guanine). Le blocage de cette synthèse *de novo* entraîne une diminution des réplifications d'ADN dans les lymphocytes B et T ainsi qu'une diminution de synthèse d'anticorps par les cellules B.

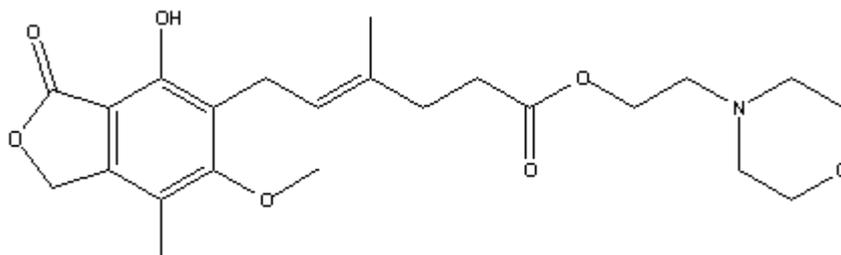


Figure 25- Structure chimique du mycophénolate mofétil

Il inhibe ainsi la prolifération lymphocytaire et la production d'immunoglobulines, mais pas la production d'IL-1, IL-2 ou IL-2R. En synergie avec la ciclosporine, le mycophénolate inhibe le rejet aigu d'allogreffe et préviendrait le rejet chronique. Il inhiberait également le rejet xénogénique. Sa toxicité s'exerce essentiellement sur la moelle osseuse et le système lymphocytaire (anémie et lymphopénie). Des doses de 400 mg à 5 g/j ont été utilisées dans le traitement de la polyarthrite. Aucun effet secondaire notable n'est survenu jusqu'à 2 g/j. Au-delà, fièvre, rash cutané, vomissements, myalgies, arthralgies ont été notés.

L'effet anti-prolifératif du MMF s'apparente à celui de l'azathioprine (Imurel®), qui inhibe aussi, par d'autres mécanismes, la synthèse des purines. Les effets secondaires principaux du mofétil sont la leucopénie et la diarrhée. Ainsi, la dose de mofétil a du être réduite chez près de 25% des patients pour leucopénie.

Cependant et de façon notable, le mofétil est dépourvu des effets secondaires provoqués par les ICNs, le sirolimus (SRL) ou les stéroïdes, tels l'hypertension, l'hyperlipidémie, le diabète, la néphrotoxicité, ou les complications osseuses. Trois grands

essais cliniques ont évalué, durant la première année de la transplantation rénale, le mofétil en association avec de la CsA et des stéroïdes.

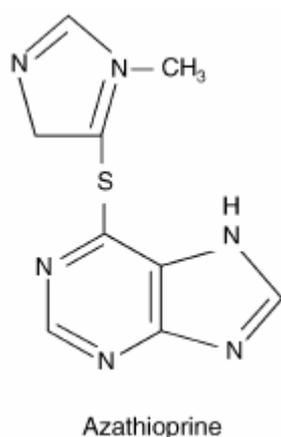
Le 10 octobre 2003 une autorisation de mise sur le marché a été octroyée au laboratoire NOVARTIS Pharma SAS sur la spécialité Myfortic®. Le principe actif de Myfortic® est le mycophénolate sodique, sel de sodium de l'acide mycophénolique.

Myfortic® est indiqué, en association avec la ciclosporine et les corticoïdes pour la prévention du rejet aigu d'organe chez les patients adultes ayant bénéficié d'une allogreffe rénale.

Le mycophénolate sodique est présenté sous une formulation gastro-résistante. Le but initial recherché était de diminuer les effets indésirables, notamment gastro-intestinaux, observés avec le mycophénolate mofétil, prodrogue du MPA (Cellcept®). L'efficacité thérapeutique ainsi que la pharmacocinétique de ces deux spécialités sont équivalentes.

## ***II.2. L'azathioprine (Imurel®; Imuran®)***

Analogue des bases puriques, l'azathioprine ou 6-[(1-méthyl-4-nitro-1h-imidazol-5-yl)thio]-1H-purine, est un précurseur de la 6-mercaptopurine (6-MP) (Figure 25). Son activité immunosuppressive repose, après transformation en 6-Mp, sur l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques. La 6-MP est d'abord transformée, sous l'influence de l'hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transférase, en un ribonucléode, l'acide thio-inosinique (T-IMP). Le T-IMP inhibe la synthèse des purines de novo, l'interconversion purine-nucléotides et la synthèse des acides nucléiques. L'action de l'azathioprine sur la réponse immune *in vitro* prédomine sur les cellules T dont elle inhibe la prolifération. Elle diminue également la production d'IL-2, le pool de cellules cytotoxiques NK et de monocytes. *In vivo*, aux doses thérapeutiques, elle prolonge la survie des allogreffes sans modification des populations lymphocytaires, des tests fonctionnels *in vitro* ou des concentrations d'anticorps préformés.



**Figure 26-**Structure chimique de l'azathioprine

La toxicité médullaire nécessite une surveillance régulière de l'hémogramme ; leucopénie, thrombopénie, anémie mégalo-blastique ou aplasie de la lignée rouge peuvent apparaître 7 à 14 jours après le début du traitement. L'azathioprine, par son effet carcinogène direct (altérations chromosomiques) et indirect (réplication de virus oncogènes), augmente l'incidence des cancers. L'hépatotoxicité reste controversée.

L'association azathioprine-allopurinol expose au risque de pancytopénie, voire d'agranulocytose, puisque l'allopurinol inhibe la xanthine-oxydase et diminue l'élimination de la mercaptopurine. L'azathioprine augmente la synthèse et/ou l'activation de la prothrombine et donc les besoins en warfarine (anti-vitamine K) lors d'un traitement.

L'azathioprine, par voie intraveineuse (Imuran®) puis *per os* (Imurel®), est associée aux corticoïdes en prophylaxie du rejet après transplantation. Il existe une synergie d'action avec la ciclosporine. La posologie de 1 à 3mg/kg/j est adaptée à la tolérance hématologique et le traitement est interrompu si les globules blancs sont inférieurs à 3500/mm<sup>3</sup> ou les plaquettes à 80000/mm<sup>3</sup>.

### **III. Les corticostéroïdes**

L'introduction des corticostéroïdes en tant que traitement immunosuppresseur dans les années 1960 a été un élément clé de la thérapie après transplantation d'organes. Les

principaux représentants utilisés dans ce contexte sont la prednisone (Solupred®) (Figure 26) et la méthylprednisolone (Medrol®). Ces molécules agissent par une diminution de l'expression des gènes codant pour certaines cytokines, interrompant ainsi l'activation des LT et l'atteinte tissulaire médiée par les macrophages. En effet, les corticoïdes se lient au récepteur protéique intracellulaire NF- $\kappa$ B, régulateur du système immunitaire et de l'expression des gènes de l'inflammation. L'activation du NF- $\kappa$ B (et la formation concomitante de cytokines) implique la dégradation de son inhibiteur cytoplasmique (I $\kappa$ B) et la translocation du NF- $\kappa$ B vers le noyau. En présence de prednisone, la transcription du gène d'I $\kappa$ B est stimulée. La protéine I $\kappa$ B nouvellement synthétisée favorise la réassociation du complexe NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B et en empêchant la translocation du facteur nucléaire vers le noyau, diminue substantiellement la sécrétion de cytokines et la réaction immunitaire. Les corticostéroïdes produisent également des effets anti-inflammatoires non spécifiques et des effets anti-adhésion pouvant contribuer à l'immunosuppression.

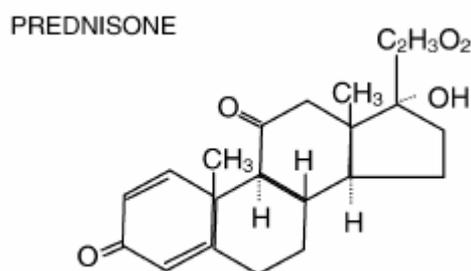


Figure 27-Structure chimique de la prednisone

#### IV. Les inhibiteurs de la mTOR (mammalian target of rapamycine)

##### IV.1. Le sirolimus (Rapamune®)

Le premier représentant de cette catégorie est la rapamycine. Il s'agit d'un macrolide cyclique (Figure 27) issu d'un micro-organisme tellurique (*Streptomyces hygroscopicus*). Il a été isolé pour la première fois au début des années 1970 dans le cadre de la recherche de nouveaux agents antifongiques. Cette molécule a tout d'abord montré une activité particulièrement puissante chez l'animal contre la levure *Candida albicans*, ainsi qu'une activité immunosuppressive dans des modèles de maladies auto-immunes chez le rat. Ce n'est

que bien plus tard que son activité pour la prévention du rejet de greffe a été investiguée, après qu'un composé structurellement similaire, le tacrolimus, ait démontré une activité immunosuppressive puissante. En 1995, la rapamycine prend le nom de sirolimus (Rapamune®). L'élucidation de son activité immunosuppressive puissante ainsi que l'identification d'un important synergisme pharmacologique avec d'autres immunosuppresseurs, amènent la FDA à approuver son utilisation lors de greffes rénales en 1999.

#### ***IV.2. L'éverolimus (Certican®)***

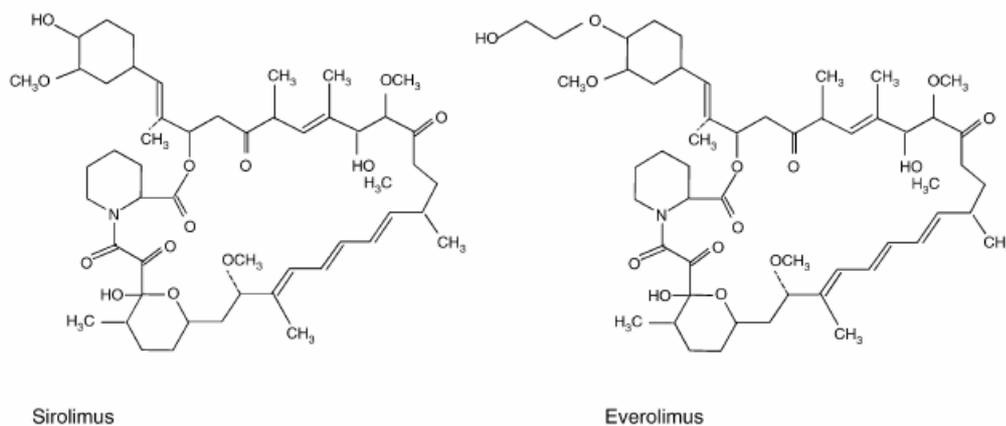
Le deuxième inhibiteur de la mTOR est l'éverolimus qui est également connu sous le nom de SDZ-RAD. Il s'agit du dérivé 40-O-(2-hydroxyethyl) du sirolimus. Il a été admis sur le marché suisse depuis le 21 avril 2005 dans la prophylaxie du rejet d'organe chez les patients adultes avec un risque immunologique faible à modéré ayant reçu un greffon allogène de rein ou de cœur.

- \* Il devrait être administré en combinaison avec le Neoral® et des corticostéroïdes
- \* Il constitue également un nouveau inhibiteur du signal de prolifération (inhibiteur mTOR) qui inhibe la prolifération des cellules T, des cellules musculaires lisses vasculaires et des cellules endothéliales (Swiss Compendium of Drugs – [www.documed.ch](http://www.documed.ch)).
- \* Il permet une diminution significative de la vasculopathie du greffon et des rejets aigus en comparaison avec l'Azathioprine dans la transplantation cardiaque.
- \* Il est le seul inhibiteur du signal de prolifération admis dans la transplantation cardiaque (Swiss Compendium of Drugs – [www.documed.ch](http://www.documed.ch)).
- \* Il permet une réduction de la micro-émulsion de ciclosporine dans le but d'améliorer la fonction rénale tout en maintenant la même efficacité chez les transplantés rénaux (Eisen et al. 2003).

Alors que les inhibiteurs de la calcineurine bloquent la libération d'IL-2 par les LT, les inhibiteurs de la mTOR se fixent, comme le tacrolimus, sur l'immunophiline FK-PB12. En revanche, leur mode d'action est très différent. Leurs cibles apparaissent être deux kinases TOR-1 et -2 (targets of rapamycine), associées à la progression G1-S du cycle cellulaire. La liaison des inhibiteurs de la mTOR à FK-BP 12, inhibe une S6 protéine kinase (p70S6K) essentielle à la phosphorylation ribosomale et à la dissociation de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27 du complexe cdk/cykline D. Cette inhibition n'est pas spécifique des

lymphocytes T car ces immunosuppresseurs inhibent aussi la prolifération des lymphocytes B, des mastocytes, des cellules musculaires lisses, des fibroblastes et des cellules endothéliales.

Ces molécules ne semblent pas néphrotoxiques. Les principaux effets secondaires sont la survenue d'une thrombopénie et d'une hyperlipidémie qui apparaissent sensibles à la réduction de la posologie.



**Figure 28-**Structure chimique des inhibiteurs de la mTOR.

## V. Les anticorps antilymphocytaires

### V.1. OKT3 et ATG

Commercialisé en 1981, l'OKT3 ou murumonab-CD3 (OKT3 Orthoclone®) est un anticorps monoclonal de souris dirigé contre le complexe CD3, une série de protéines associées au récepteur à l'antigène des LT. Les préparations polyclonales d'ATG (pour *anti-thymocyte globulins*) sont obtenus en immunisant des lapins ou des chevaux à l'aide de lymphocytes humains. Elles contiennent des anticorps dirigés contre de nombreux antigènes membranaires dont certains sont représentés uniquement sur les cellules T, tels CD3, CD4 ou CD8, alors que d'autres, telles les molécules d'adhésion CD11b et CD18 se retrouvent aussi sur d'autres cellules circulantes (Bourdage et al. 1995). Ceci explique probablement la leucopénie et la thrombopénie se produisant lors du traitement à l'ATG. Le mécanisme d'action principal de l'OKT3 et de l'ATG consiste en une déplétion du sang circulant en lymphocytes T. L'OKT3 et l'ATG entraînent un syndrome de relargage de cytokines après la

première dose (Abramowicz et al. 1989 ; Chatenoud et al. 1989). En outre, tant l'OKT3 que l'ATG peuvent entraîner une sensibilisation chez le receveur, avec comme conséquence possible une neutralisation avec perte d'efficacité en ce qui concerne l'OKT3, et une maladie sérique en ce qui concerne l'ATG. L'efficacité de l'OKT3 et de l'ATG dans le traitement du rejet aigu conduit à leur utilisation pendant une à deux semaines durant la période post-opératoire immédiate, une stratégie appelée "induction", ayant comme objectif d'utiliser les immunosuppresseurs les plus puissants au moment où le risque de rejet est le plus grand, c'est-à-dire durant les premières semaines de greffe.

Des données provenant d'études prospectives, randomisées ainsi que des registres indiquent (Opelz et al. 1995) que l'induction à l'OKT3 ou à l'ATG permet non seulement de réduire considérablement l'incidence de rejet, mais aussi d'augmenter la survie du greffon à long terme de  $\pm 5\%$  par rapport aux patients recevant CsA Sandimmun® + AZA + stéroïdes. Chez les groupes à plus haut risque immunologique tels les enfants, les patients de race noire ou les patients présentant des taux élevés d'anticorps anti-HLA, le bénéfice était encore bien plus considérable, atteignant parfois 20% d'amélioration de survie du greffon après 3 à 5 ans.

Même avec l'utilisation des nouveaux immunosuppresseurs, l'adjonction d'ATG ou d'OKT3 permet une diminution supplémentaire des taux de rejet. Ainsi, l'incidence de rejet s'élève à 32% chez les patients traités par tacrolimus + AZA+ stéroïdes, versus 18 si l'on y associe une induction à l'ATG (Charpentier et al. 1998). Toutefois, il est clair que dans cette indication – prévenir au mieux le rejet aigu - les anticorps anti-IL-2R semblent tout aussi efficaces et moins toxiques (Vincenti et al., 1999).

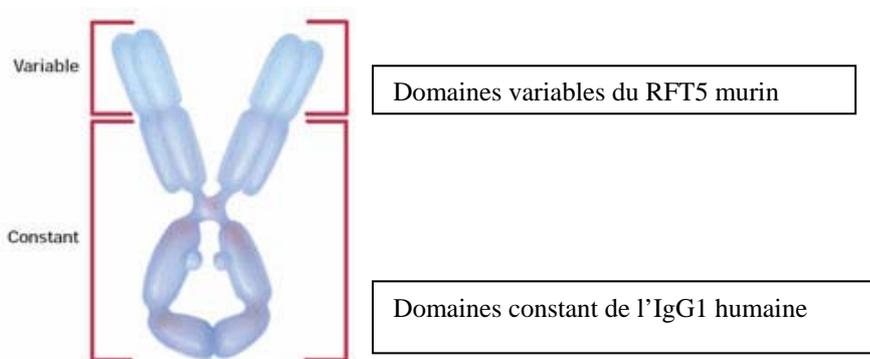
Il faut néanmoins garder à l'esprit que les patients à haut risque immunologique, tels ceux ayant perdu un ou plusieurs greffons préalables ou ceux hautement sensibilisés contre les antigènes HLA, n'ont pas été inclus dans les essais cliniques évaluant les anticorps anti-IL-2R et OKT3/ATG chez ces patients. Dans l'attente, l'induction à l'ATG ou l'OKT3 constitue les stratégies de choix dans cette indication, en association avec un inhibiteur de la calcineurine, du MMF et des stéroïdes.

## V.2. Les antagonistes du récepteur de l'IL-2

### V.2.1. Le Basiliximab (Simulect®)

Le Basiliximab est un anticorps monoclonal chimérique (murin/humain) constitué des parties variables d'un anticorps anti-Tac (anti-CD25) (RFT5) et des régions constantes de la chaîne lourde d'une IgG1 humaine et de la chaîne kappa ( $\kappa$ ) (Amlot et al. 1995).

RFT5 se fixe spécifiquement et avec une forte affinité ( $K_d = 10^{-10}$  M) à la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 exprimée par les cellules T activées. Il prévient ainsi la fixation de l'IL-2 sur les LT et inhibe la réponse proliférative. Les cellules T au repos ne sont pas affectées par le Simulect® (Amlot et al. 1995).



**Figure 29**-Structure du basiliximab. (Laboratoire Roche)

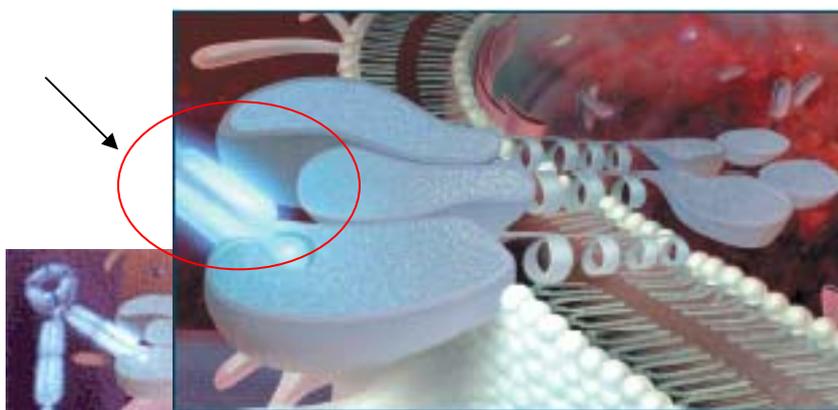
Simulect® associe la spécificité d'un anticorps murin aux caractéristiques fonctionnelles d'une IgG1 humaine. La substitution du fragment Fc murin (constant) par des régions humaines homologues permet de diminuer la réponse HAMA (Human anti-mouse antibody) de manière significative. Les anticorps anti-idiotypes dirigés contre le Simulect® ne sont que rarement observés. L'incidence n'est que de 1,2%, plus faible que celle observée pour le Daclizumab qui est de 8,4% (Laboratoires Roche, 1997 ; Laboratoires Novartis 1998). Une inhibition de la fixation de l'IL-2 est observée à partir de 1  $\mu$ g/ml. Une dose totale de 40 mg de Simulect® peut être suffisante pour obtenir 30 à 45 jours d'immunosuppression après transplantation (20 mg sont d'abord administrés 2 heures avant l'intervention et une dose de 20 mg est administrée ensuite 4 jours après la transplantation).

Une diminution de l'incidence (de 29% versus placebo) des épisodes de rejet aigu, 6 mois après la greffe a été observée .

La demi-vie du Basiliximab est de 7 jours, qui semble être plus longue que les autres anticorps chimériques existants tels que l'anti-CD7, dont la demie-vie varie de 2 à 5 jours et des autres anticorps monoclonaux murins dont la demie-vie est approximativement 1 jour.

En association avec la ciclosporine et la prednisolone, il réduit l'incidence et la sévérité des épisodes de réjection aiguë. La fréquence des infections et des cancers ne serait pas augmentée.

Commercialisé depuis mars 2003 (Simulect®) par les Laboratoires NOVARTIS PHARMA S.A.S, il permet d'adapter la posologie à l'enfant de moins de 35 kg, suite à une demande de la Commission de la Transparence (avis du 20 février 2002).



**Figure 30-**Représentation schématique de la fixation du Basiliximab sur la chaîne réceptrice alpha du complexe récepteur de l'IL-2 (représentation partielle à gauche) (Laboratoire Roche)

### **V.2.2. Le daclizumab (Zenapax®)**

Le daclizumab est un anticorps monoclonal produit par génie génétique. La solution stérile contient un anticorps monoclonal humanisé recombinant d'isotype IgG1. Les gènes recombinants qui codent pour le daclizumab sont composés de séquences d'anticorps humains (90%) et murins (10%). Les séquences humaines proviennent des régions constantes de l'IgG1 humaine et les régions structurales variables de l'anticorps Eu de myélome. Les séquences murines proviennent des régions CDR (déterminant la complémentarité) de l'anticorps anti-Tac murin. Le poids moléculaire prévu d'après le séquençage de l'ADN est

de 144Kd. Zénapax® est purifié à partir du surnageant de cultures cellulaires à l'aide de la chromatographie par échange d'ions et de la chromatographie par gel-filtration.

Le daclizumab se fixe avec une forte affinité à la sous-unité  $\alpha$  (Tac) du complexe récepteur de haute affinité de l'IL-2 (IL-2R $\alpha$ ), inhibant la liaison et l'activité biologique de l'IL-2. L'affinité du daclizumab est très spécifique pour le Tac, qui est exprimé sur les lymphocytes activés et non sur les lymphocytes au repos. L'administration du daclizumab inhibe l'activation des lymphocytes médiée par l'IL-2, état critique de la réaction immunitaire à médiation cellulaire intervenant dans le rejet des allogreffes.

Le daclizumab sature le site récepteur Tac pendant environ 120 jours à la posologie recommandée. Aucune modification significative du nombre de lymphocytes circulants et de phénotypes cellulaires n'a été observée lors de l'analyse au moyen d'un trieur de cellules activé par fluorescence. Les données ne permettent pas de tirer une conclusion définitive sur l'apparition d'un syndrome de libération de cytokines après l'administration de Zenapax®.

Le mode d'action précis associé à l'anticorps anti-Tac humanisé (HAT) n'a pas complètement été élucidé. Il est certain que la saturation de l'IL-2R $\alpha$  et l'inhibition de la prolifération cellulaire dépendant de l'IL-2 sont essentielles aux effets immunosuppresseurs globaux du daclizumab, mais on ignore si ces facteurs sont suffisants ou les seuls en cause.

Les données *in vitro* et *in vivo* semblent indiquer qu'une concentration sérique de 5 à 10  $\mu\text{g/ml}$  est nécessaire pour saturer le récepteur Tac afin d'inhiber les réponses des LT activés.

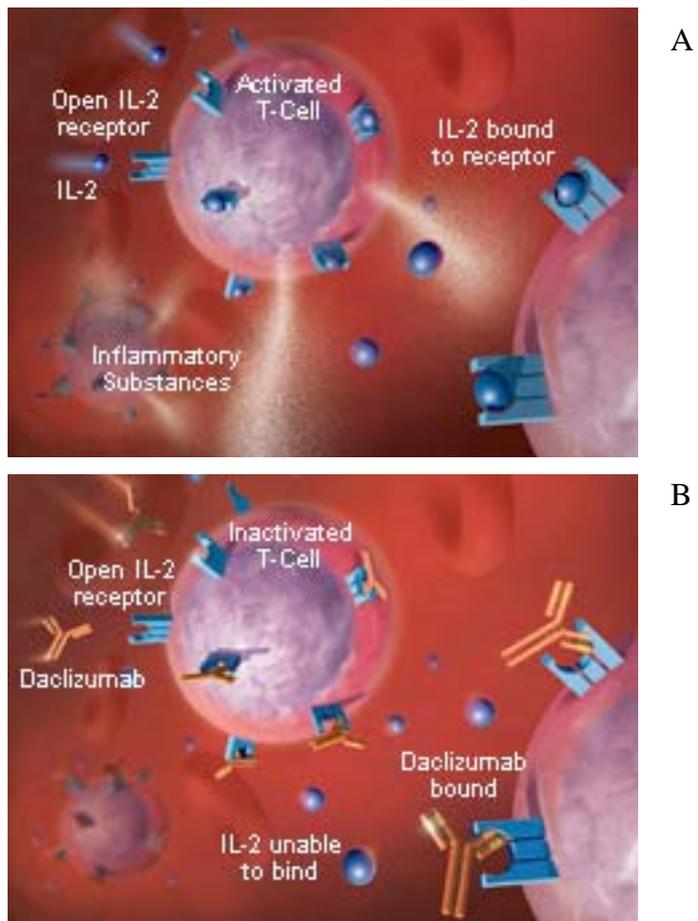
La demi-vie d'élimination terminale pour un sujet de référence (blanc, 45 ans, 80 kg et exempt de protéinurie) a été de 20 jours, ce qui équivaut à la demi-vie d'élimination terminale de l'IgG humaine (18-23 jours). L'influence du poids corporel sur la clairance totale de Zénapax® justifie une posologie en fonction du poids (mg/kg). On maintient ainsi l'exposition au médicament à l'intérieur de 30% de la valeur de référence dans les cas présentant un large éventail de paramètres démographiques. Aucune modification de la posologie en fonction des autres covariables identifiées (âge, sexe, protéinurie, race) n'est nécessaire chez les patients qui reçoivent une allogreffe rénale. Les effets du sexe, de la race, du poids et de la présence d'une atteinte rénale ou d'une atteinte hépatique n'ont pas fait l'objet d'études complètes et indépendantes. Par ailleurs, aucune donnée pharmacocinétique complètes sur les enfants qui ont reçu une allogreffe rénale sont disponibles.

D'autre part, Il est important de noter que les patients soumis à un traitement immunosuppresseur après une transplantation sont davantage exposé au risque de lymphomes et d'infections opportunistes. En revanche, bien que le Zénapax® soit un immunosuppresseur, l'incidence de lymphomes ou d'infections opportunistes n'a pas augmenté chez les patients qui ont reçu cet anticorps au cours des essais cliniques.

Par ailleurs, dans les études sur l'administration de trithérapies et de bithérapies, des anticorps ont été décelés chez respectivement 12 et 18% des sujets, mais ces anticorps n'ont pas influencé l'efficacité, l'innocuité, le taux sérique de daclizumab ou tout autre paramètre cliniquement pertinent mesuré.

Ayant obtenu l'AMM en février 1999, le daclizumab commercialisé par les Laboratoires ROCHE est indiqué comme adjuvant pour la prophylaxie du rejet aigu chez les receveurs de greffe rénale. Dans les études cliniques, la majorité des sujets ont reçu Zénapax® en association avec la ciclosporine, des corticoïdes et l'azathioprine.

Des réactions anaphylactiques peuvent survenir après l'administration de protéines. Dans de rares cas, des réactions d'hypersensibilité sévères et aiguës (apparaissent dans les 24 heures) ont été signalées après l'administration initiale ou subséquente de Zénapax®.



**Figure 31-** Mécanisme d'action du daclizumab : liaison spécifique à la chaîne réceptrice alpha du complexe récepteur de l'IL-2. A. Avant fixation. B. Après fixation.

(laboratoires Roche)

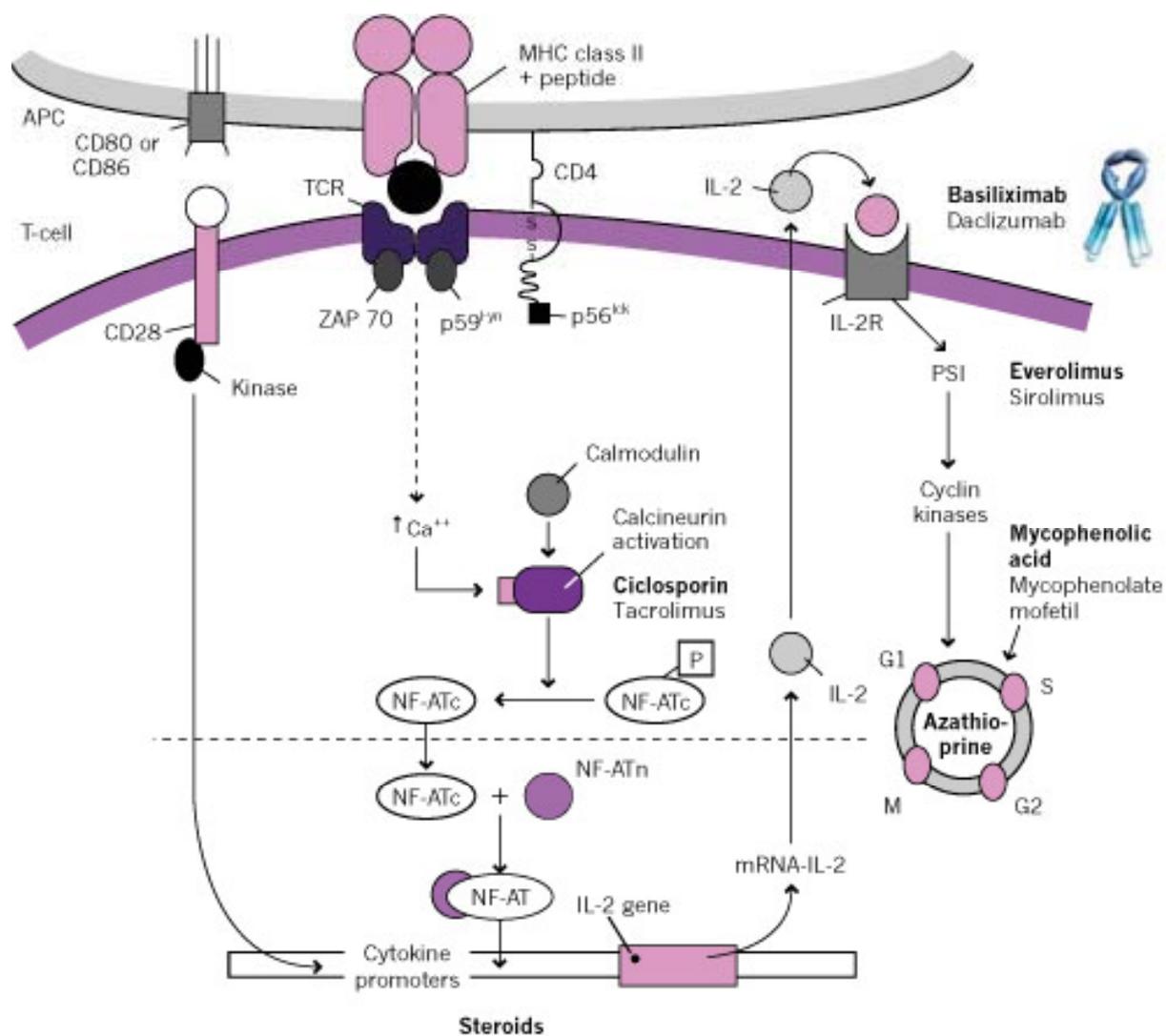


Figure 32- Mécanisme d'action des immunosuppresseurs

# Ciblage du récepteur de l'IL-2 en cancérologie

## **A .INTRODUCTION**

### **I. Le traitement du cancer**

#### **I.1. Les traitements classiques**

Parmi les traitements classiques pratiqués actuellement en routine, on peut distinguer : les traitements locaux (chirurgie, radiothérapie externe) et les traitements systémiques (chimiothérapie). Dans la plupart des cas, les différentes approches thérapeutiques sont utilisées en association, en alternance ou en concomitance afin de potentialiser les réponses anti-tumorales. Dans la majorité des cas de tumeurs solides, le traitement de référence le plus efficace reste l'ablation de la tumeur par intervention chirurgicale. Ce traitement peut conduire à la guérison si la tumeur est localisée et s'il n'y a pas de processus d'envahissement des autres organes. En présence de métastases, la chirurgie est souvent nécessaire en première intention et des traitements complémentaires sont utilisés pour éliminer les cellules métastatiques.

La radiothérapie externe est, après la chirurgie, le traitement local le plus courant. Elle utilise des sources d'irradiation externe à l'organisme (rayons gamma ou X). Cependant, l'administration de doses élevées localisées entraîne des effets secondaires importants le long du trajet des rayons notamment au niveau de la peau et au niveau des tissus sains environnant la tumeur. Il est donc important de fractionner la dose et de l'étaler dans le temps pour permettre d'augmenter l'effet anti-tumoral sans dépasser le seuil de tolérance des tissus sains.

La troisième "arme thérapeutique" classique est la chimiothérapie. Ce traitement systémique utilise différentes molécules toxiques, ciblant les cellules en prolifération et bloquant leur capacité de multiplication. Selon leur mécanisme d'action, on distingue :

-les anti-métabolites, qui inhibent de façon compétitive la synthèse de l'ADN et la prolifération cellulaire (exemple : methotrexate)

- les alkylants, qui modifient les bases de l'ADN (exemple : Melphalan)
- les poisons du fuseau, qui bloquent le cycle cellulaire (exemple : paclitaxel, vinorelbine)
- les inhibiteurs de topoisomrases I ( exemple : Irinotécan) et II (exemple : Doxorubicine)
- et les agents intercalants de l'ADN (exemple : iadarubicine).

Ces molécules peuvent être administrées isolément ou dans des protocoles de polychimiothérapie combinant des molécules qui induisent des effets cellulaires différents. Dans le traitement curatif des tumeurs solides, la chimiothérapie est en général adjuvante à la chirurgie ou à la radiothérapie. L'efficacité de ce traitement est souvent accompagnée d'effets secondaires importants liés à son action sur les cellules saines en prolifération (cellules de la moelle osseuse, muqueuses, peau).

## ***1.2. Les associations thérapeutiques***

Pour améliorer l'efficacité des traitements des tumeurs malignes, la combinaison de différentes thérapies est une approche séduisante. Les associations, entre la chirurgie et la radiothérapie externe, ou entre la chirurgie et la chimiothérapie constituent des traitements standards dans certaines indications. De même, la radiothérapie est souvent associée à la chimiothérapie. En effet, certaines molécules, comme la gemcitabine (Azria et al. 2004a ; Lawrence et al. 2001) et le paclitaxel (Milas et al. 1994) sont connues pour leurs propriétés sensibilisantes et peuvent donc potentialiser les effets toxiques de la radiothérapie concomitante par rapport à la radiothérapie (rayons  $\gamma/X$ ) sur les cellules tumorales. L'efficacité supérieure de la chimio-radiothérapie concomitante par rapport à la radiothérapie seule a été démontré dans des études cliniques randomisées (Jeremic et al. 2005). Les mécanismes de complémentarité des deux thérapies ne sont pas encore précisément compris mais l'augmentation de la mortalité cellulaire semble passer par l'apoptose, le cycle cellulaire, et l'oxygénation des tumeurs.

Malgré les progrès incontestables, le taux de mortalité des patients reste élevé pour de nombreux types de cancers. L'avènement de la biologie moléculaire et la connaissance des voies de signalisation intracellulaire ont permis le développement des thérapies systémiques ciblant de plus en plus spécifiquement les tissus néoplasiques.

### ***1.3. Les thérapies expérimentales***

#### ***1.3.1. Le ciblage des néo-vaisseaux tumoraux***

Une approche thérapeutique récente consiste à cibler spécifiquement les cellules des néo-vaisseaux tumoraux pour entraîner la mort des cellules cancéreuses et éviter la dissémination des cellules tumorales. Une des voies de signalisation jouant un rôle majeur dans le processus d'angiogénèse normal et pathologique est la voie du VEGF/récepteur-VEGF. Par cette implication dans l'angiogénèse tumorale, de nombreuses études ont été menées et ont donné des résultats encourageants (Hicklin and Ellis, 2005). Deux approches thérapeutiques sont principalement développées dans le ciblage des néo-vaisseaux tumoraux. La première utilise des agents anti-angiogéniques pour inhiber le développement de la vascularisation tumorale (inhibiteurs de la matrix-métallo-protéases, inhibiteurs de la croissance des cellules endothéliales...). La seconde approche cible les vaisseaux tumoraux déjà en place en essayant d'exploiter des différences d'expression de marqueurs vasculaires entre les cellules endothéliales normales et les cellules de la néo-vascularisation tumorale (utilisation d'anticorps, thérapie génique).

#### ***1.3.2. Les inhibiteurs de tyrosine kinase***

Récemment ont été développés des traitements ciblant les enzymes tyrosines kinases qui interviennent à la fois dans la prolifération et la cancérogénèse. Plusieurs anticorps ou petites molécules inhibant l'activité tyrosine kinase de différents récepteurs sont en cours de développement clinique (Shawver et al. 2002). L'Herceptin® a été la première thérapie anti-kinase développée (trastuzumab). Cet anticorps humanisé cible le récepteur Her2/neu, qui appartient à la famille des RTKs (Récepteur Tyrosine Kinase), exprimé à la surface des cellules tumorales. La fixation de l'Herceptin® au récepteur Her2/neu induit une internalisation du récepteur et inhibe la progression du cycle cellulaire. Le gène codant pour HER2/neu est surexprimé dans 30% des cancers du sein et dans d'autres cancers, comme le cancer pulmonaire non à petites cellules, le cancer ovarien et le cancer de la prostate. Cette expression constitue un mauvais pronostic. L'efficacité de cet anticorps en monothérapie a été démontrée dans des études cliniques de phase II (Cobleigh et al. 1999) admis également dans

des essais de phase III randomisés, lorsque l'Herceptin® est associé avec une première ligne de chimiothérapie (Slamon et al.2001).

### ***1.3.3. Les anticorps couplés à de petites molécules toxiques***

L'utilisation d'anticorps, comme le trastuzumab ou le rituximab (anti-CD20), dans le traitements de certaines pathologies comme le cancer du sein, montre une efficacité liée aux effets directs de l'anticorps nu. Afin d'augmenter le potentiel anti-tumoral des anticorps, ils peuvent être directement couplés à des toxines. Le couplage des anticorps avec des molécules de chimiothérapie a largement été étudié (Farah et al.1998) mais n'a pas montré d'efficacité dans les études cliniques de phase II (Ajani et al. 2000). L'utilisation de molécules toxiques comme la calicheamicine (DiJoseph et al. 2004 ; Sievers et al. 2001) ou la Maytansinoïde (Liu et al. 1996) a augmenté de 100 à 1000 fois le potentiel toxique des anticorps couplés, par rapport aux anticorps couplés à des molécules de chimiothérapie. L'internalisation de l'anticorps fixé à la surface des cellules ciblées permet de délivrer la molécule toxique à l'intérieur des cellules potentialisant ainsi l'efficacité anti-tumorale tout en diminuant significativement l'exposition des tissus sains à l'agent toxique.

### ***1.3.4. La radioimmunothérapie***

#### ***1.3.4.1. Généralités***

La radioimmunothérapie (RIT) est une forme de radiothérapie interne utilisant comme agent de vectorisation un anticorps monoclonal reconnaissant les antigènes exprimés par les cellules tumorales. Cette approche constitue une avancée par rapport au protocole d'irradiation externe en permettant d'obtenir de fortes irradiations localisées sur les tumeurs ou de cibler les cellules cancéreuses disséminées dans l'organisme tout en préservant les tissus sains. L'efficacité et la toxicité de la RIT dépendent du choix de l'anticorps, du radioélément, de l'antigène et des caractéristiques de la tumeur. Ces facteurs conditionnent la dose absorbée et l'homogénéité du dépôt d'énergie.

L'optimisation de cette approche thérapeutique implique en premier lieu d'améliorer la spécificité des anticorps pour les cellules tumorales, et d'élargir les possibilités de ciblage

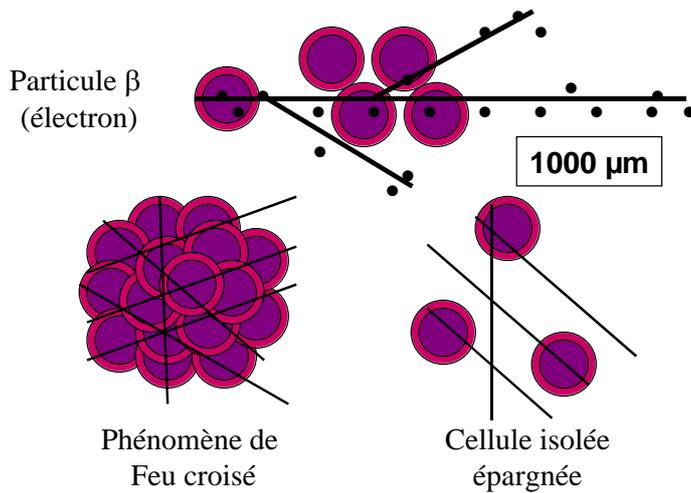
de tumeur d'origine histologique variée. En second lieu, il est nécessaire d'optimiser l'irradiation en adaptant le choix des radioéléments aux caractéristiques des tumeurs ciblées.

La majorité des protocoles mis en place actuellement utilise des émetteurs bêta tels l'Iode 131 ou l'Yttrium 90. Les rayonnements bêta présentent un faible transfert d'énergie linéique (TEL) c'est-à-dire que les dépôts d'énergie provoqués par les particules bêta sont sporadiques et s'effectuent sur des trajets longs (de l'ordre de 1000  $\mu\text{m}$ ) (Figure 32). Ces rayonnements sont donc particulièrement bien adaptés au ciblage de tumeurs localisées ayant un diamètre de l'ordre du centimètre. La fixation d'un nombre important de radioéléments dans le volume de la tumeur entraîne localement une forte irradiation liée au « feu croisé » des radiations dont les effets s'additionnent. Les tissus sains qui expriment une moindre densité d'antigène et ne présentent pas d'organisation en amas cellulaire reçoivent des doses sublétales compatibles avec leur survie. Les approches thérapeutiques de radio-immunothérapie des cancers hématologiques diffus sont donc peu accessibles à la radio-immunothérapie bêta. Actuellement les limites de cette approche sont liées à la toxicité du traitement et en particulier à la myélotoxicité. D'autre part, la taille et la structure de la tumeur doivent être compatibles avec la pénétration des anticorps radiomarqués afin qu'une accumulation de dose permette sa destruction.

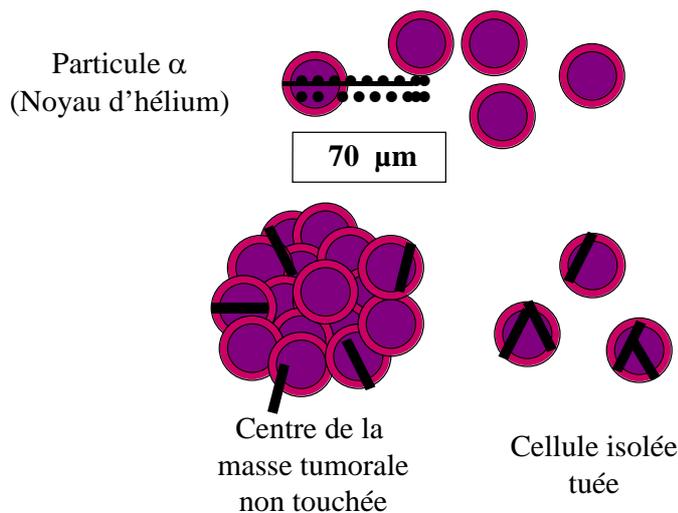
Récemment, de nouvelles approches de radio-immunothérapie utilisant des rayonnements alpha se sont développées. Ces rayonnements, contrairement aux émissions bêta, présentent un fort transfert d'énergie linéique c'est-à-dire que le dépôt d'énergie lié à l'émission d'une particule alpha est élevé et s'effectue sur un trajet court de l'ordre de quelques dizaines de  $\mu\text{m}$  (Poujet et al. 2001, Mulford et al., 200, Van den Bulcke et al; 2003) (Figure 33). Ce type d'émission permet donc, d'effectuer des irradiations très localisées tout en préservant les tissus environnants et, d'obtenir une toxicité cellulaire avec seulement quelques désintégrations à la surface cellulaire (Mc Devitt et al. 2001). Contrairement aux émetteurs bêta, les émetteurs alpha, en raison de leur court rayon d'action, semblent mieux adaptés au traitement de cancers diffus ou de micrométastases en complément de l'ablation d'une tumeur primaire (Allen et al.1999 ; Zalutsky et al ; 1996 ; Vaidyanathan et al ;1996, Bethge et al, 2004). Le faible nombre de radioéléments nécessaires à la destruction cellulaire impose en contrepartie d'effectuer un ciblage très spécifique des cellules tumorales.

L'utilisation de radioélément alpha en radio immunothérapie permet d'envisager à moyen terme, la mise en place de protocoles thérapeutiques pour des cancers qui ne sont pas accessibles à la radio immunothérapie bêta. Les cancers disséminés tels que les leucémies B et T, ou le traitement des micrométastases constituent les champs d'application privilégiés de la

radio-immunothérapie alpha. Cependant ces développements sont assujettis à l'identification de marqueurs spécifiques de tumeurs et à la disponibilité d'anticorps monoclonaux permettant de les cibler. Le ciblage du récepteur à l'IL-2 constitue une approche innovante qui permet d'envisager le ciblage par radio-immunothérapie alpha de tumeurs jusqu'à présent inaccessibles par manque de marqueurs spécifiques.



**Figure 33-** Parcours et dépôts d'énergie des particules bêta (Faible TEL) sur des cellules isolées ou regroupées en amas.



**Figure 34-** Parcours et dépôts d'énergie des particules alpha (Fort TEL) sur des cellules isolées ou regroupées en amas.

	Période physique (h)	Emission thérapeutique	Energie maximale (KeV)	Parcours maximal (mm)
<b>Iode 131</b>	193	$\beta$	610	2,9
<b>Yttrium 90</b>	64	$\beta$	2280	12
<b>Lutétium 177</b>	161	$\beta$	496	1,5
<b>Cuivre 67</b>	62	$\beta$	577	1,8
<b>Rhénium 186</b>	91	$\beta$	1080	5
<b>Rhénium 188</b>	17	$\beta$	2120	11
<b>Bismuth 212</b>	1	$\alpha$	> 6000	0,09
<b>Bismuth 213</b>	0,77	$\alpha$	> 6000	0,084
<b>Astate 211</b>	7,2	$\alpha$	> 6000	0,08
<b>Actinium 225</b>	240	$\alpha$	6000-8400*	40-80*

**Tableau 2-** Radioéléments et utilisés dans les protocoles de RIT.

\*L'actinium 225 est un générateur qui produit 4 particules alpha différentes.

D'après Goldenberg., 2002.

#### ***1.3.4.2. Le ciblage du récepteur à l'IL-2 en radio-immunothérapie***

L'efficacité, limitée de l'anticorps nu anti-Tac, a permis d'envisager une approche alternative, consistant à coupler l'anticorps à un radio-élément, permettant d'augmenter la toxicité du traitement.

Bien que des résultats encourageants aient été obtenus dans le traitement du lymphome en utilisant des anticorps couplés à des émetteurs de particules  $\beta$ - comme l'yttrium 90 (Y-90), des études complémentaires ont été réalisées pour déterminer le radioélément idéal pour traiter ce type de pathologie. En effet, 7 rémissions partielles ainsi que 2 rémissions complètes

ont été observées chez 16 patients atteints d'une leucémie T de l'adulte (Waldmann et al. 1995). L'utilisation du bismuth 212, dans les mêmes conditions, est restée relativement peu efficace, probablement compte tenu de sa courte demi-vie. Possédant une plus longue demi-vie, l'astate 211 a donc été privilégié.

L'utilisation des anticorps couplés à des radioéléments reste cependant limitée par des paramètres importants à considérer avant chaque protocole. Le ratio tumeur/tissu sain n'est pas toujours suffisant pour pouvoir détruire la totalité des cellules ciblées. L'exposition de la moelle osseuse aux rayonnements reste également très toxique. La technique de pré-ciblage permet de diminuer cette toxicité. Plusieurs systèmes ont été développés. (ADEPT pour Antibody-Dependant Enzyme-Mediated Prodrug Therapy, AES pour Affinity Enhancement System). La technique AES reste le stade le plus avancé du développement clinique. Elle associe un anticorps bispécifique anti-antigène de tumeur/anti-haptène, et un haptène bivalent radiomarqué de bas poids moléculaire. L'utilisation d'un système en deux temps permet ainsi de limiter la fixation de l'élément radioactif sur les cellules saines. De plus, l'haptène étant de petite taille, la fraction non fixée aux anticorps bispécifiques déjà à la surface des cellules tumorales, va être rapidement éliminé, évitant ainsi une trop forte irradiation des tissus sains. Cette technique peut être utilisée en imagerie comme en thérapie. Cette approche reste à l'heure actuelle seulement expérimentale, dans le cadre du ciblage de la chaîne réceptrice  $\alpha$ . (Zhang et al. 2002).

### ***1.3.5. L'immunothérapie***

L'immunothérapie regroupe les traitements stimulants le système immunitaire afin de déclencher une réponse immune contre les cellules tumorales. Actuellement, souvent dans le cadre d'études cliniques, ces thérapies sont administrées en association avec les traitements classiques. Il existe deux types d'immunothérapie :

*-l'immunothérapie cellulaire passive ou adoptive*, qui consiste à amplifier *in vitro* des cellules immunitaires réactives, ou à produire des anticorps spécifiques d'antigènes tumoraux afin de les injecter au patient,

-*l'immunothérapie active*, renvoie à une immunisation directe du patient contre un ou plusieurs antigènes présents sur les cellules tumorales, afin de déclencher une réponse immunitaire anti-tumorale *in situ*.

## ***II. Les Cancers***

Les paragraphes suivants présentent les principales hémopathies malignes exprimant le récepteur à l'IL-2, cible thérapeutique potentielle faisant l'objet actuellement protocoles expérimentaux.

### ***II.1. La maladie de Hodgkin***

Il semble que l'immunité à médiation cellulaire soit la plus touchée au cours de cette maladie. Les LT d'un sujet hodgkinien sont plus sensibles aux LT suppresseurs que ceux d'un sujet normal. Ces modifications persistent durant la rémission. Le mécanisme de cette sensibilité des cellules effectrices T aux cellules suppressives n'est pas connu. Il est possible qu'il corresponde à un déficit en IL-2 soit par diminution de production, soit par excès de récepteurs solubles circulants pour l'IL-2. Il est possible que la multiplication des cellules T soit altérée durablement au cours de la maladie de Hodgkin puisque les anomalies persistent avec le temps. Par ailleurs, les marqueurs des cellules lymphoïdes immatures ne sont pas toujours exprimés, par contre d'autres caractéristiques de l'activation des lymphocytes sont constamment observés, comme le récepteur de l'IL-2 (CD25) et les antigènes du CMH de classe II (HLA-DR) (Andrieu et al., 1991), permettant de suggérer ainsi de nouvelles cibles thérapeutiques.

La maladie de Hodgkin, aussi appelée lymphogranulomatose maligne, est caractérisée cliniquement par la tuméfaction des ganglions superficiels et profonds (les premiers atteints étant généralement les ganglions cervicaux), une splénomégalie, une fièvre rémittente ou (le plus souvent) à rechutes, parfois périodiques, des lésions cutanées prurigènes et enfin une éosinophilie sanguine. Elle est spontanément mortelle en quelques années. La radiothérapie

intensive, associée à la chimiothérapie, surtout lorsque la maladie est localisée, donne de bons résultats et souvent des guérisons (75% des cas environ).

Depuis le symposium d'Ann Arbor en 1971, on classe les cas de cette maladie, en vue de l'établissement du pronostic et d'un traitement, en 4 stades selon le nombre des territoires ganglionnaires et des organes non lymphoïdes atteints (les stades I et II, où ne sont touchés qu'un ou deux territoires, comportent un taux de survie supérieure à 70% au bout de 5 ans). Au chiffre du stade (I, II, III, IV) on ajoute les lettres A-selon l'absence-ou B-selon la présence de certains symptômes (fièvre, sueurs nocturnes, amaigrissement) et, en cas de biopsie, d'autres lettres désignent l'organe examiné.

La structure ganglionnaire est bouleversée par une double prolifération lymphoïde et réticulo-endothéliale (cellules de Reed-Sternberg), associée à la sclérose. La cellule de Reed-Sternberg est une cellule de grande taille (25 à 50 µm), à noyaux multiples et volumineux, contenue dans les ganglions hypertrophiés des sujets atteints de la maladie de Hodgkin et considérée comme caractéristique de cette maladie.

L'étiopathogénie de cette pathologie est inconnue. La responsabilité d'un virus potentiellement oncogène, le virus d'Epstein-Barr (ou EBV), est l'hypothèse la plus étudiée actuellement.

Le schéma thérapeutique actuel repose sur une chimiothérapie première (le protocole de référence est dit ABVD : Adriamycine, Bléomycine, Vinblastine, DTIC) complétée par une irradiation de 36 grays des gîtes initialement envahis.

La tendance actuelle est de réduire l'intensité des traitements pour les formes standard et de renforcer les schémas pour les formes à risque et les rechutes (autogreffes de cellules souches hématopoïétiques).

Tous stades confondus, on parvient actuellement à guérir plus de 75% des patients. Ces excellents résultats, pour une maladie qui était encore régulièrement mortelle il y a moins d'un demi-siècle, sont malheureusement grevés d'un certain nombre de risques de séquelles :

- la toxicité des chimiothérapies (cardiaque pour l'Adriamycine, pulmonaire pour la Bléomycine, neurologique pour la Vinblastine) et de l'irradiation médiastinale (cœur, poumon).

- la stérilité : fréquente chez l'homme, plus rare chez la femme.

-la tumorigénèse : essentiellement risque élevé de leucémie aigue secondaire dans les 5 à 10 ans suivant le traitement.

Il est nécessaire d'envisager des traitements alternatifs, tels que le ciblage du système IL-2, compte tenu de la toxicité des traitements actuels.

## ***II.2. Les lymphomes malins non hodgkiniens (LMNH ou lymphosarcome)***

Des taux élevés du récepteur soluble de l'IL-2 ont été observés chez des patients atteints de LMNH. La forme soluble de ce récepteur constitue ainsi un marqueur de choix pour dépister les formes agressives du LMNH (Niitsu et al 2001). Par ailleurs, il a été démontré que les taux de cellules Treg CD4+/CD25+ dans le sang périphérique de patients atteints de LMNH type B, était significativement plus élevés que chez le donneur sain, justifiant l'immunosuppression des patients atteints (Shi et al 2004). Ces dernières observations permettent d'envisager le ciblage de ce récepteur dans le cadre de nouveaux protocoles thérapeutiques.

Par rapport à la Maladie de Hodgkin, les LMNH constituent un groupe de tumeurs beaucoup plus disparates, tant en ce qui concerne leur aspect histologique, leur présentation clinique et leur pronostic qui, d'une façon générale, est beaucoup moins bon que celui de la Maladie de Hodgkin. Leur étiologie reste inconnue même si dans un petit nombre de cas on peut incriminer l'intervention d'une infection virale (EBV, VIH, HTLV-1, VHC).

Il s'agit de tumeurs malignes se développant à partir des cellules lymphoïdes à l'exclusion de la maladie de Hodgkin qui est un lymphome malin particulier. La différence entre un Hodgkin et un non Hodgkinien se fait sur l'histologie.

Les LMNH appartiennent aux lignées B ou T. Ils font partie des syndromes lymphoprolifératifs et doivent donc être distingués des autres entités leucémiques aiguës ou chroniques par des critères quantitatifs et qualitatifs qui définissent ces maladies. Certains types cellulaires peuvent donner soit un LMNH soit une leucémie. En outre, il existe des formes frontières et des formes de passage ce qui rend le classement nosologique parfois arbitraire. Les LMNH sont représentés par une très grande diversité de tumeurs de pronostic très différent. Aujourd'hui, l'analyse approfondie des cellules malignes permet de prévoir le

comportement clinique de la maladie et conduit à des indications thérapeutiques adaptées (*JJ Sotto, Faculté de médecine de Grenoble*).

La classification histologique actuellement en vigueur (classification 2001 de l'OMS) distingue schématiquement les LMNH selon leur immuno-phénotype B (85% des cas) ou T ou NK puis en fonction de l'origine des cellules tumorales : cellules précurseurs ou cellules matures. Sont également prises en compte la taille des cellules, l'architecture folliculaire ou diffuse de la tumeur. A partir de ces données, les cliniciens ont pris l'habitude de distinguer des lymphomes indolents, incurables mais susceptibles d'évoluer sur un mode plus ou moins chronique pendant plusieurs années et des lymphomes agressifs, potentiellement mortels dans un bref laps de temps, mais qui peuvent être guéris par un traitement intensif. Au sein des proliférations B, les lymphomes folliculaires représentent un modèle de lymphome indolent alors que les lymphomes diffus à grandes cellules constituent le prototype des lymphomes agressifs. Les proliférations T sont généralement toutes considérées comme agressives.

En ce qui concerne les lymphomes agressifs, le traitement d'induction repose toujours sur une polychimiothérapie s'efforçant de respecter au mieux le concept dose intensité, c'est-à-dire de délivrer le maximum tolérable de médicaments dans le minimum de temps. Le régime le plus communément utilisé est le CHOP (Cyclophosphamide, Adriamycine, Oncovin, Prednisone), souvent avantageusement remplacé par le protocole ACVBP (Adriamycine, Cyclophosphamide, Vépéside, Bléomycine, Prednisone). Les formes à très haut risque et les rechutes doivent bénéficier en consolidation d'une intensification chimiothérapeutique suivie d'une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Il s'agit, bien entendu, de traitements lourds qui comportent une toxicité et une morbidité propres, et ne peuvent s'administrer qu'en milieu très spécialisé.

Le traitement des lymphomes indolents est moins bien codifié et contrairement à celui des lymphomes agressifs, son objectif n'est que très exceptionnellement curatif et s'attache surtout à obtenir une survie prolongée et une qualité de vie.

L'introduction récente des anticorps monoclonaux anti-CD20 (Mabthera®) utilisables isolément ou associés à la chimiothérapie et/ou à un radioisotope (Zévalin®) dans les lymphomes d'immunophénotype B laisse entrevoir de nouvelles possibilités de thérapeutique "ciblée" (*P.Lederlin-question ECN n°164-lymphomes malins*).

### ***II.3. Les cancers induits par le virus HTLV-1***

L'infection des lymphocytes T par le virus HTLV-1 (*Human T-cell leukemia virus type I*) est susceptible d'entraîner une leucémie lymphocytaire T de l'adulte (ATL). Le virus HTLV-1 est un rétrovirus appartenant à la famille des *Oncornavirinae*. Son génome est constitué de deux séquences LTR en 5' et 3' séparées par les régions Gag, Pol, Env, codant pour les protéines de structure et la reverse transcriptase, et la région Px codant pour des protéines favorisant à la fois la réplication du rétrovirus et la transformation tumorale de la cellule hôte, en particulier des lymphocytes T.

Le virus HTLV-I est impliqué dans le développement de deux maladies : les leucémies/lymphomes de l'adulte (ATL) et les paraparésies spastiques tropicales ou myélopathie (TSP/HAM). Le mode de contamination influence le type de maladie engendrée par le virus.

Trois modes de transmission du virus ont été démontrés :

-La transmission verticale, de la mère vers l'enfant, représente la principale voie de transmission dans les régions d'endémie. Elle se fait essentiellement par l'allaitement. Environ 25 % des enfants allaités seront infectés et deviendront séropositifs pour HTLV-I. La transmission intra-utérine trans-placentaire du virus reste controversée et semble de toute façon peu importante.

-Le second mode de transmission pour HTLV-I est la voie sexuelle (principalement l'homme vers la femme).

-Enfin, la voie sanguine, essentiellement par transfusion de produits sanguins constitue le troisième mode de transmission du virus avec un risque d'infection de 15 à 60% pour les personnes transfusées avec du sang contaminé par HTLV-I.

Nous parlerons dans ce chapitre uniquement de la leucémie lymphocytaire T de l'adulte, dont les cellules T caractéristiques et surexprimées expriment de façon constitutive les trois chaînes réceptrices  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  du complexe récepteur de l'IL-2 (Yamada et al. 1999 ; Kodaka et al. 1990).

L'ATL affecte principalement les LT matures de phénotypes CD4 et se développe après une période de latence pouvant aller de 20 à 30 ans chez 2 à 5% des sujets adultes infectés par HTLV-1. Quatre formes cliniques ont été décrites. La forme aigue est la plus fréquente et est caractérisée par des adénopathies périphériques, des atteintes cutanées et/ou

osseuses et une hypercalcémie. Cette forme a un caractère très agressif, la médiane de survie étant de l'ordre de 6 mois. Les formes subaiguës et chroniques sont caractérisées par des lésions cutanées ou la présence de rares cellules leucémiques dans le sang. Ces formes sont les moins agressives, mais peuvent néanmoins évoluer en quelques mois vers une forme aiguë. Enfin, la forme lymphomateuse est plus rare. Elle est caractérisée par l'atteinte des organes lymphoïdes en l'absence de cellules leucémiques dans le sang. Les malades atteints d'ATL sont immunodéprimés, ce qui se traduit par une susceptibilité aux infections opportunistes.

L'utilisation des anticorps monoclonaux a permis de montrer que les cellules ATL ont un phénotype CD4+ activé, exprimant le récepteur à l'IL-2 (CD25) et des antigènes CMH II. L'analyse des sites d'intégration génomique de HTLV-1, montre que les cellules ATL dérivent d'un seul clone tumoral infecté. Le virus responsable est un rétrovirus (virus à ARN) qui s'intègre dans le génome de la cellule T hôte. Il exprime ensuite à partir du génome viral la protéine Tax, de 42 kD qui participe à la régulation de certains gènes, dont celui de l'IL-2, de sa chaîne réceptrice  $\alpha$  et du facteur de transcription NF- $\kappa$ B en se liant sur les régions promotrices de ces gènes. La séquence codant Tax est apparemment toujours conservée, suggérant un rôle actif de cette région dans la transformation cellulaire. De façon intéressante, il y a une faible expression des ARNm viraux dans les cellules leucémiques par rapport aux sujets asymptomatiques.

Les mécanismes de transformation cellulaire aboutissant à l'apparition d'une ATL ne sont pas encore complètement connus, cependant le rôle de Tax est clairement établi. L'infection des lymphocytes par HTLV-1 se traduit lors de la mise en culture *in vitro* par une stimulation et une prolifération spontanées des cellules. Cette prolifération nécessite dans un premier temps la présence d'IL2 puis elle devient indépendante d'IL2 exogène et fait intervenir une boucle autocrine IL2/IL-2R. La protéine Tax active en effet, les promoteurs de l'IL-2 et de son récepteur par l'intermédiaire de la voie NF- $\kappa$ B. La famille des *janus kinases* est impliquée dans la voie de signalisation de IL-2R et permet le recrutement et la phosphorylation de plusieurs protéines de signalisation intracellulaire dont les STAT qui seront transloquées dans le noyau sous forme de dimères. Une corrélation entre la prolifération des cellules issues de sujets ayant une ATL et l'activation des systèmes JAK et STAT, a été mise en évidence. Cependant, l'analyse de lignées ou de clones T infectés par

HTLV-1 n'a pas toujours permis de confirmer l'implication de ces processus dans la prolifération clonale spontanée induite par HTLV-1.

Actuellement il n'existe pas de traitement curatif pour cette pathologie. L'idée de perturber la voie de signalisation participant à la prolifération de cellules malignes en utilisant des anticorps dirigés contre le récepteur de l'IL-2 a été retenue par l'équipe de Waldmann. Cette inhibition conduirait à la mort programmée des cellules privées d'IL-2 (Waldmann et al. 1993).

Les lymphocytes T infectés par le HTLV-1 prolifèrent spontanément par des boucles autocrines IL-2 et IL-15 (Azimi et al.1999 ; Azimi et al. 2000), ce qui laisse envisager l'idée de perturber également la voie de signalisation du système IL-2/IL-2R.

#### ***II.4. Les lymphomes cutanés T épidermotropes (CTLC)***

Les lymphomes cutanés T épidermotropes représentent un groupe très hétérogènes d'un point de vue clinique et biologique. Ils sont dus à la prolifération dans la peau de lymphocytes T activés se traduisant par deux principales affections dermatologiques : *le mycosis fongoïde* (MF) et *le syndrome de Sézary*.(SS) Les autres lymphomes cutanés T épidermotropes sont beaucoup plus anecdotiques. Ce sont les plus fréquents des lymphomes cutanés ; *le mycosis fongoïde* représentant à lui seul presque la moitié des cas de lymphomes cutanés. Le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments cliniques, cytologiques, histologiques, immunohistochimiques et moléculaires. Ces lymphomes évoluent lentement et présentent au terme de leur évolution un risque d'envahissement ganglionnaire et viscéral et un risque de transformation en lymphome de haut grade.

Il a été démontré que le marqueur CD25 (chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2) était hautement exprimé par les cellules tumorales épidermotropes (Jones et al.2004). Ainsi, les études récentes nous permettant de mieux comprendre le fonctionnement du système IL-2/IL-2R offrent la possibilité d'envisager des protocoles d'immunothérapie spécifique des leucémies T épidermotropes.

### ***II.4.1. Le mycosis fongoïde (MF)***

Le mycosis fongoïde désigne une dermatose particulière d'évolution chronique, irrégulière, toujours mortelle, caractérisée dans sa forme classique type Alibert-Bazin, d'abord par un prurit intense, des éruptions diverses, érythémateuses ou eczématiformes (période érythémateuse prémycosique), plus tard par l'apparition de plaques lichenoïdes infiltrées, bosselées accompagnées de prurit, d'adénopathies, d'altération de l'état général, enfin en dernier lieu, par des tumeurs d'un rouge vif, pouvant s'ulcérer. Il existe aussi une forme érythrodermique type Hallopeau-Besnier (1892), très prurigineuse dans laquelle la peau de tout le corps est rouge, infiltrée, lichenifiée et une forme à tumeurs d'emblée, type Vidal-Brocq (1885). L'origine de cette pathologie est inconnue et sa nature est encore discutée. Il a été classée dans les hématodermies (il s'agirait d'un lymphosarcome à LT) et rapprochée des leucémies, des réticulo-endothélioses, enfin et surtout du syndrome de Sézary dont les cellules caractéristiques ont été retrouvées dans les lésions du MF.

Les stratégies de traitement comprennent actuellement, dans les phases précoces, principalement la PUVA (photo-chimiothérapie à l'aide des UV-A), l'interféron alpha-2a (Chiaron-Sileni et al 2002 ; Stadler et al 1998), les rétinoïdes (seuls ou associés), la chimiothérapie locale, les stéroïdes locaux, le rayonnement ultra-violet B à bande étroite (311nm) et la thérapie photo-dynamique. La maladie avancée peut être traitée par une chimiothérapie systémique, une photophorèse extracorporelle, et/ou une radiothérapie.

De nouvelles modalités de traitement expérimental comprennent de nouvelles molécules rétinoïdes (comme le bexarotène), l'inquimod, de nouveaux médicaments chimiothérapeutiques (gemcitabine, fludarabine, doxorubicine pégylé), pentostatine, l'IL-12, la Denileukin Diftitox (ciblant l sous-unité  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2) et la transplantation des cellules souches allogéniques.

### ***II.4.2. Le syndrome de Sézary***

Le syndrome de Sézary est une affection cutanée survenant chez l'homme vers la cinquantaine. Annoncée par un prurit violent, elle est caractérisée par une érythrodermie diffuse avec épaissement et aspect squameux des téguments, accompagnés d'adénopathies à prédominance inguinale. Le derme est infiltré de grandes cellules mononuclées atypiques dont le noyau, cérébériforme, irrégulier, très foncé, a une chromatine striée. IL existe une

hyperleucocytose sanguine constituée essentiellement de ces mêmes cellules mononuclées (cellules de Sézary), que l'on considère comme des LT anormaux. Cette maladie se termine par la mort au bout de quelques années. Elle est classée dans les hémato dermatoses et, par quelques auteurs, parmi les lymphosarcomes (lymphosarcomes à cellules T). Elle est très proche du syndrome de petites cellules circulantes et du mycosis fongoïdes.

## ***II.5. La leucémie lymphoïde chronique (LLC)***

La leucémie lymphoïde chronique doit être considérée tout à la fois comme une prolifération et une accumulation de lymphocytes malins dans l'organisme. Il s'agit d'une infection qui survient essentiellement chez le sujet âgé et dont la plupart des formes est compatible avec une longue survie, de telle sorte qu'elle n'est pas directement responsable du décès de nombreux patients.

Il existe de nombreuses variétés de leucémies lymphoïdes chroniques, en fonction des aspects cytologiques et des marqueurs immunologiques.

La forme la plus fréquente est représentée par une prolifération de lymphocytes B d'aspect cytologique mature. Cette leucémie est caractérisée par l'augmentation dans le sang de lymphocytes B, précurseurs des plasmocytes qui synthétisent les anticorps. Ils sont très proches des lymphocytes B circulants normaux et portent à leur surface des immunoglobulines. Quelques cas (5%) affectent les lymphocytes T responsables de l'immunité cellulaire. La population atteinte est monoclonale, avec une seule cellule à son origine. La prolifération cellulaire est faible, mais les cellules s'accumulent car leur durée de vie est très longue. Il s'agit de la plus fréquente des leucémies de l'adulte en Occident, elle est rare en Extrême-Orient. On ne lui connaît aucune cause. Des anomalies sont trouvées sur les chromosomes : l'addition d'un chromosome 12 est la plus fréquente mais son rôle est inconnu. Les variantes sont :

1. cytologique, la forme prolymphocytaire, qui peut survenir *de novo* ou compliquer l'évolution d'une forme typique classique ;
2. sur le plan immunologique, les proliférations de cellules T.

On estime que les critères minimums de diagnostic d'une leucémie lymphoïde chronique comportent une infiltration du sang au-dessus de 5000 lymphocytes/mm<sup>3</sup> et de la

moelle au-dessus de 40%. Les cliniciens sont parfois confrontés à la nécessité de poser un diagnostic précoce sur une infiltration moins importante qui peut se réduire à une simple inversion de la formule sanguine : dans ce cas, la mise en évidence de la prolifération clonale maligne repose sur les marqueurs immunologiques (anticorps monoclonaux), voire la biologie moléculaire mettant en évidence un réarrangement des chaînes lourdes des immunoglobulines.

L'examen clinique est normal ou montre des ganglions superficiels bilatéraux et symétriques. L'imagerie peut montrer des ganglions profonds dans l'abdomen ou le thorax. Une augmentation modérée de la rate est possible. Dans le sang, une anémie ou une baisse des plaquettes sont rares au moment du diagnostic. L'évolution est souvent lente, la moitié des malades vivent plus de 8 à 10 ans (survie médiane). Le pronostic s'apprécie sur le taux des globules rouges et des plaquettes, les adénopathies, la splénomégalie. Les malades à un stade précoce laissés sans traitement ont la même durée de vie que la population générale de même âge. L'évolution est compliquée d'infections par des bactéries, parfois graves, surtout quand elles sont tardives, ou par des virus comme ceux de l'herpès ou du zona. Différents mécanismes peuvent entraîner une anémie ou une diminution des plaquettes exposant à des hémorragies.

Les traitements actuels reposent sur l'immunité passive, l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des marqueurs exprimés par les cellules B leucémiques, tels que le rituximab (Mabthera®) ou l'alemtuzumab (Campath®). De tels anticorps peuvent être utilisés seuls ou en association avec d'autres agents chimiothérapeutiques. De nouvelles stratégies de vaccination ont également été développées pour induire ou augmenter les réponses des cellules T contre les cellules T leucémiques autologues (Wierda et al 2005).

Malgré de nombreuses options thérapeutiques, le pronostic des patients en rechute est peu encourageant. Après l'utilisation des thérapies de "premières lignes" incluant la fludarabine, les agents alkylants, le rituximab utilisés seuls ou en association, un grand nombre de patients rechutent. L'utilisation des thérapies de seconde ligne incluant l'alemtuzumab, a permis d'observer quelques cas de rémissions, mais restant partielles.

Ainsi, en se basant sur l'expression du complexe récepteur de l'IL-2 de haute affinité sur les cellules B leucémiques, l'utilisation de la Denileukin Diftitox a été envisagée (Frankel et al 2003).

## ***II.6. La leucémie à tricholeucocytes (HCL, Hairy cell leukemia)***

La leucémie à tricholeucocytes est une hémopathie maligne lymphoïde à cellules B monoclonales particulière par l'aspect morphologique caractéristique et les propriétés immunologiques et fonctionnelles des cellules anormales. L'affection atteint de façon prédominante les sujets de sexe mâle, le diagnostic étant habituellement posé entre quarante et soixante ans. Cette hémopathie se manifeste le plus souvent cliniquement par une splénomégalie isolée, et hématologiquement par une pancytopénie avec neutropénie et monocytopénie prédominantes. Le diagnostic est posé sur l'aspect cytologique des cellules circulantes et il est confirmé par l'infiltration médullaire de la moelle dont l'image histologique le distingue des autres hémopathies lymphoïdes chroniques. Jusqu'en 1984 le pronostic était sévère, avec une médiane de survie aux alentours de cinquante mois, le décès survient habituellement du fait des complications infectieuses notamment respiratoires (Flandrin et al. 1984). En 1984, Quesada (Quesada et al. 1984) a démontré une remarquable activité thérapeutique de l'interféron  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ). Les méthodes sensibles d'étude anatomique des biopsies médullaires (les aspirations étant à proscrire du fait de l'existence d'une fibrose) tendent à prouver que des rémissions complètes sont sans doute exceptionnelles. Cependant, il est possible d'envisager le ciblage de la chaîne réceptrice  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2, exprimée dans 80% des cas de leucémies à tricholeucocytes (Mey et al. 2003).

## ***III. Le ciblage du récepteur de l'IL-2 dans le traitement des hémopathies malignes***

La surexpression de la chaîne réceptrice  $\alpha$  (Tac), ainsi que les taux élevés de sa forme soluble (s-Tac) ont été observés dans le cadre des leucémies à cellules T telles que la leucémie lymphocytaire de l'adulte (ATL), le mycosis fongoïde, les lymphomes T périphériques, la leucémie à tricholeucocytes, la maladie de Hodgkin, la leucémie à grands lymphocytes à grains ainsi que les leucémies T épidermotropes et la leucémie lymphoïde chronique. Les anticorps anti-Tac bloquant la liaison de l'IL-2 à son récepteur, permettent d'inhiber la prolifération des cellules leucémiques, constituant ainsi la cible idéale de nouveaux anticorps monoclonaux (Strauchen et al 1989).

La leucémie lymphocytaire T de l'adulte (ATL) a servi de prototype dans les premiers essais permettant d'évaluer le potentiel thérapeutique des premiers anticorps monoclonaux anti-Tac. Les premiers essais ont utilisé des anticorps murins non-modifiés (Waldmann et al 1993). Les principaux effets secondaires répertoriés se résument à une augmentation de la température corporelle chez deux patients et une pancytopenie transitoire chez un seul patient. La courte demi-vie d'élimination des anti-Tac murins, ainsi que la production des anticorps dirigés contre les anticorps de souris (HAMA pour *Human Antimouse Antibodies*) ont limité le développement de cette approche. Le couplage de l'anticorps murin anti-Tac à l'Yttrium 90, émetteur de particules  $\alpha$ , a suivi cette première stratégie en 1995 (Waldmann et al 1995). Cependant, l'administration de doses répétées d'anticorps a été limitée également par le développement des anticorps HAMA. Ainsi, de nouvelles approches utilisant le ciblage du récepteur de l'IL-2 dans le cadre de la thérapie du cancer, ont permis d'envisager la production de protéines de fusion, possédant des propriétés cytotoxiques intrinsèques permettant de détruire spécifiquement les cellules leucémiques, exprimant le récepteur de l'IL-2, en les associant à l'IL-2 recombinante. Deux d'entre elles sont en cours d'évaluation.

### ***III.1. Denileukin Diftitox (DAB<sub>389</sub>IL2, Ontak®)***

#### ***III.1.1. Structure et mécanisme d'action***

Denileukin Diftitox est une protéine de fusion constituée de la séquence complète de l'IL-2 humaine couplée aux domaines de translocation et enzymatique, de la toxine diphtérique. Elle permet de cibler le récepteur de l'IL-2 exprimée par les cellules leucémiques (Williams et al 1990 ; Kiyokawa et al 1991). Lorsque le gène de fusion est exprimé dans la bactérie *Escherichia coli*, cela conduit à l'expression d'une chaîne simple polypeptidique capable de se fixer aux cellules exprimant le récepteur de l'IL-2. Après internalisation par endocytose, la molécule va inhiber la synthèse des protéines par l'ADP-ribosylation du facteur d'élongation de la toxine conduisant à la destruction de la cellule cible par apoptose (Duvic et al 2000 ; Railan et al 2000). Seul le complexe récepteur d'affinité intermédiaire permet l'endocytose de Denileukin Diftitox (Waters et al 1990 ; Re et al 1996). Rappelons que le récepteur de haute-affinité est seulement exprimé sur les cellules T activées, les cellules B et les monocytes (Nakarai et al 1994). L'expression constitutive du récepteur de l'IL-2 est

observée à la surface des cellules leucémiques T et B, dont celles retrouvées dans le cadre de la leucémie lymphoïde chronique (LLC), du lymphome T cutané (CTCL), dans la maladie de Hodgkin ainsi que dans les lymphomes non Hodgkiniens (Weiss et al 1987 ; Rosolen et al 1989 ; Nakase et al 1994, Tsilivakos 1994). Les cellules exprimant le récepteur de haute affinité semblent être plus sensibles ( $\approx 1$  log de plus) aux effets cytotoxiques de Denileukin Diftitox que les cellules exprimant le récepteur d'affinité intermédiaire (Waters et al 1990).

L'Ontak® fait l'objet de nombreuses études cliniques, permettant d'évaluer le potentiel thérapeutique de cette molécule parmi les anticancéreux actuellement sur le marché.

### ***III.1.2. Applications***

#### ***✓ Le lymphome malin non hodgkinien (LMNH)***

Un essai clinique de phase I a permis d'observer des réponses objectives chez trois patients sur 17, deux d'entre eux étaient atteints d'un lymphome folliculaire et un seul atteint d'un lymphome diffus à grandes cellules. Ces lymphomes étaient réfractaires à tous les protocoles de chimiothérapie (Lemaistre et al 1998).

Une seconde étude, de phase II a été conduite afin d'établir une corrélation entre l'expression du CD25 et le potentiel thérapeutique du Denileukin Diftitox. Cette étude a été menée chez des patients atteints d'un LMNH récidivant et a permis de démontrer que l'expression du CD25 ne pouvait pas être corrélée directement à l'efficacité du Denileukin Diftitox. En effet, aucune différence n'a été observée chez des patients exprimant la chaîne  $\alpha$  seule ou les chaînes  $\alpha\beta$  associées. Le marqueur CD25 ne semblerait donc pas être le marqueur idéal permettant de suivre l'évolution de la maladie, contrairement à ce qui peut être observé au cours de la LLC (LeMaistre et al 1998).

Le Denileukin Diftitox semble être actif dans le NHL-B, bien que les taux d'expression du CD25 au niveau tumoral soient faibles, voir indétectables. Compte tenu de son efficacité et de sa tolérance chez des patients ayant subi de nombreux traitements anti-tumoraux (chimiothérapie, radiothérapie), l'étude de l'Ontak® en association avec d'autres agents thérapeutiques dans le traitement du NHL-B peut être envisagé sans risque potentiel (Dang et al 2004).

### ✓ *La leucémie lymphoïde chronique (LLC)*

Un essai clinique de phase II, permettant de déterminer la posologie optimale pour les études de phase III, a été mené chez des patients atteints d'une LLC ne répondant pas à la fludarabine (antimétabolite). Sur les 12 patients testés, seuls 11 d'entre eux ont obtenus une réduction du nombre de cellules leucémiques. Une augmentation des transaminases, transitoires et asymptomatiques a été observée, associée à une augmentation de la température corporelle, une hypoalbuminémie, et au syndrome de fuite capillaire (*vascular leak syndrom*). Des taux variables d'anticorps dirigés contre la toxine diphtérique ont été mesurés. L'Ontak® permet donc d'obtenir une diminution rapide des cellules leucémiques dans la moelle osseuse et le sang périphérique chez la plupart des patients réfractaires aux traitements anticancéreux classiques. Le traitement a été relativement bien toléré, n'engendrant ni myélocytopénie, ni immunodépression. Les résultats obtenus ont démontré l'activité biologique de l'Ontak®, cependant des études plus approfondies associant l'Ontak® à différents autres agents thérapeutiques sont envisagées (Frankel et al. 2003).

### ✓ *Les lymphomes T cutanés épidermotropes (CTLC)*

En 1999, la FDA (The United States Food and Drug Administration) a autorisé le traitement de patients atteints de lymphomes T cutanés persistant ou récidivant par l'Ontak®. Cet accord repose sur des essais cliniques de phase I/II et III chez des patients atteints de leucémies épidermotropes. L'étude de phase III a été randomisée, et effectuée en double-aveugle en utilisant deux niveaux de doses d'Ontak® chez 71 patients. Les données obtenues à partir de 35 patients impliqués dans une étude de phase III ont été également incluses. L'Ontak® a été administré par voie intra-veineuse à des doses comprises entre 9 et 18 mg/kg/jour pendant cinq jours consécutifs. Ces cures de 5 jours ont été répétées toutes les trois semaines, sans dépasser huit cycles de traitement.

La durée optimale du traitement n'a pas été clairement définie. 97 patients participant à ces essais cliniques, ont produit des anticorps dirigés contre la toxine diphtérique après trois cycles de thérapies.

71 patients participant aux essais de phase III ont été résistants aux thérapies précédentes (interféron, chimiothérapie, radiothérapie). Au cours de cette étude, une réduction tumorale de plus de 50% a été observée chez 30% des patients (21 sur 71) traités.

Une rémission complète a été observée chez 10% (7 sur 71) des patients traités pendant une période d'environ 9 mois. Des rémissions partielles ont été également observées pour une durée de 4 mois.

Des effets secondaires ont été observés dans l'ensemble du groupe testé (143 patients). Voici les principaux :

Des syndromes pseudo-grippaux (91%), des réactions d'hypersensibilité (69%), des nausées et vomissements (64%), des infections (48%), le syndrome de fuite vasculaire (27%).

Cependant, cette étude n'a pas permis d'établir un lien de cause à effet entre l'Ontak® et l'augmentation du nombre des infections.

Malgré les avancées récentes, dans la prise en charge des hémopathies malignes, les traitements "classiques" restent limités par leur myélotoxicité. Ainsi, compte tenu de sa spécificité d'action et l'absence de toxicité médullaire, Denileukin Diftitox constitue une alternative thérapeutique de premier ordre.

### ***III.2. L'anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2)***

Afin de cibler un plus grand nombre de pathologies touchant les cellules exprimant le récepteur à l'IL-2, en particulier celles n'exprimant pas le récepteur de haute-affinité, le CD25 a été utilisé comme cible thérapeutique. L'intérêt de cette approche réside dans le fait que l'anticorps anti-Tac se lie au récepteur avec une plus grande affinité ( $K_d \approx 10^{-10} M$ ) que l'IL-2 (Uchiyama et al. 1981). Le CD25 semble être surexprimé sur un grand nombre de types cellulaires caractéristiques de plusieurs hémopathies malignes comme la leucémie lymphocytaire T de l'adulte, la leucémie à tricholeucocytes et la maladie de Hodgkin (Yagura et al 1990).

### III.2.1. Structure et mécanisme d'action

LMB-2 est constituée des domaines variables des chaînes lourdes et légères de l'anticorps anti-Tac, couplées à une forme tronquée de l'exotoxine de la bactérie *Pseudomonas* (PE). Les deux domaines variables sont associés par un peptide linker (G4S)<sub>3</sub>.

L'exotoxine de la bactérie *Pseudomonas* est une protéine simple brin constitué de 613 AA, contenant 3 domaines fonctionnels nécessaires à l'activité cytotoxique de la toxine (Hwang et al 1987; Allured et al 1986). Le domaine Ia (AA 1-252) constitue le domaine de liaison, le domaine II (AA 253-364) est responsable de la translocation de la toxine vers le cytosol, et le domaine III (400-613) contient l'enzyme responsable de la ribosylation de l'ADP responsable de l'inactivation du facteur d'élongation (EF-2) dans le cytosol.

En 1989, l'équipe de Huston obtient la construction de la première immunotoxine recombinante contenant le fragment Fv de l'anti-Tac couplée à une forme tronquée de la Pe. Cette toxine recombinante fut universellement cytotoxique sur les cellules malignes de patients atteints par la leucémie T de l'adulte (Kreitman et al 1990). Une forme dérivée ayant la même activité cytotoxique et possédant une séquence plus courte, l'anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2), a été développée pour réaliser les essais cliniques. Par ailleurs, l'activité cytotoxique de LMB-2 est indépendante de l'expression des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  (Kreitman et al 1993 ; 1994).

Sur la base d'études structurales et fonctionnelles (Li et al 1996), la cytotoxicité induite par le LMB-2 dépend d'une part, de sa liaison à la sous-unité  $\alpha$ , de l'internalisation et de la translocation de la toxine, et de l'ADP-ribosylation du facteur d'élongation 2, conduisant à l'apoptose et la mort cellulaire (Brinkmann et al 1995).

Lorsque LMB-2 est administré à des souris exprimant des tumeurs CD25+, l'immunotoxine s'accumule rapidement au niveau des tumeurs et permet d'obtenir une régression complète des tumeurs solides (Kreitman et al. 1998). Par ailleurs, les études de toxicité ont démontré que les taux sériques permettant d'obtenir une régression tumorale chez des xéno greffes de souris ont été tolérées chez des singes (Kreitman et al. 1995), accompagnée d'une augmentation dose-dépendante des transaminases réversibles. L'immunotoxine est produite à partir de corps d'inclusion après expression dans la bactérie *Escherichia coli*.

Tout comme la toxine diphtérique, après internalisation par endocytose, l'immunotoxine va inhiber la synthèse protéique par l'ADP-ribosylation du facteur d'élongation de la toxine, processus responsable de la mort cellulaire par apoptose.

Afin de déterminer la toxicité, la pharmacocinétique, l'immunogénicité et l'activité thérapeutique de LMB-2 chez l'humain, des essais cliniques de phase I ont été entrepris chez des patients atteints d'hémopathologies malignes CD25+, résistantes aux protocoles thérapeutiques existants.

### ***III.2.2. Applications***

35 patients atteints d'hémopathies malignes diverses résistantes aux protocoles thérapeutiques existants ont été traités avec le LMB-2. La moyenne d'âge des patients était de 47 ans. 11 patients étaient atteints de la Maladie de Hodgkin, 8 de leucémie lymphoïde chronique, 4 de leucémie à tricholeucocytes, 6 de lymphome non hodgkinien type B, et les 6 derniers de leucémies ou de lymphomes T divers. Parmi ces patients, 16 avaient préalablement expérimenté des protocoles de chimiothérapie à hautes doses ainsi que des greffes de cellules souches.

LMB-2 peut être relativement bien tolérée à des doses intra-veineuses (IV) de 40 µg/kg répétées trois fois. LMB-2 est faiblement immunogénique en raison de sa faible taille et de l'absence d'épitopes immunogéniques présents sur les domaines constants des anticorps murins. Cela permet de répéter les cycles thérapeutiques, et assure un taux de réponse relativement élevé. Fièvre et augmentation des transaminases sont les principaux effets secondaires observés. La Dose Minimale Tolérée (MTD) est équivalente à celle du DAB<sub>389</sub>IL2, soit 120 µg/kg/cycle vs 135 (LeMaistre et al 1998). La demi-vie retrouvée chez l'homme semble être plus élevée que celle obtenue chez la souris (257 minutes vs 48). DAB<sub>389</sub>IL2 ayant un poids moléculaire plus faible que LMB-2 (53 vs 63) sera éliminé plus rapidement de l'organisme (Foss et al 1998). La plupart des patients traités avec le LMB-2 n'ont pas produit d'anticorps neutralisants après le premier cycle de traitement, en particulier les patients atteints de leucémie lymphoïde chronique.

Par ailleurs, les cellules leucémiques ne sont pas sensibles au mutant LMB-2, déficients pour les domaines de liaison ou pour le site d'ADP-ribosylation. Cela suppose que les réponses cliniques résultent directement des effets cytotoxiques de l'exotoxine et pas seulement de la fixation du LMB-2 au CD25 ou à une simple internalisation de l'immunotoxine.

Les réponses au traitement ont été durables, avec une rémission complète obtenue pendant environ 20 mois et plusieurs réponses partielles obtenues durant plus de 6 mois. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.

Diagnostic	Dose ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ QODx3)	Nombre de cycles						Réponses
		1	2	3	4	5	6	
HCL	30	+						PR
CTCL	30,30,30,40,40	-	-	-	-	-	++	PR
CLL	50,50,50	-	-	-				PR
HCL	63,63	-	-					PR
HCL	63	-						CR
HD	40,40	-	-					PR
ATL	40,40	-	++					PR
HCL	40,40	++	++					PR

Tableau 3- Résultats au traitement par le LMB2 chez divers patients atteints d'hémopathies malignes (d'après Kreitman et al 2000)

HCL (*Hairy Cell Leukemia*) : Leucémie à tricholeucocytes

CTCL (*Cutaneous T-Cell Lymphomas*) : Lymphome T cutané épidermotrope

HD (*Hodgkin's Disease*) : Maladie de Hodgkin

ATL (*Adult T-Cell Leukemia*) : Leucémie lymphocytaire de l'adulte

CLL (*Chronic Lymphocytic Leukemia*) : Leucémie lymphoïde chronique

PR (*Partial Response*) : réponse partielle ; CR (*Complete Response*) : réponse complète

QOD (*Every other day*) : tous les 2 jours

Les taux de réponses ainsi que la faible toxicité du LMB-2 justifie l'utilité clinique des immunotoxines recombinantes et le développement de LMB-2

---

## CONCLUSION

A travers ce mémoire, nous avons cherché à montrer comment la position centrale du système IL2/récepteur à l'IL2 dans la réponse immunitaire T, en fait une cible essentielle pour contrôler ces cellules en situation de prévention du rejet de greffe allogénique et en cancérologie pour le ciblage de leucémie T. Dans le premier cas, l'utilisation de drogues immunosuppressives a un effet direct ou indirecte sur les voies de signalisation dépendantes de l'IL2. L'utilisation des anticorps monoclonaux dans l'arsenal des outils thérapeutiques a permis de cibler directement le récepteur à l'IL2 et de court-circuiter l'activation des lymphocytes T responsables du rejet de greffe. Dans le cadre des cancers hématologiques impliquant des lymphocytes T le ciblage des récepteurs à l'IL2, à l'aide d'anticorps couplés à des toxines, ont prouvé leur efficacité et constitue une approche séduisante permettant d'envisager un gain d'efficacité antitumorale tout en limitant la toxicité aux tissus sains. L'utilisation de ces anticorps couplés à des radioéléments est actuellement en cours d'évaluation préclinique. Cette approche a prouvé son efficacité dans le traitement d'autres pathologies hématologiques tel le ciblage du CD20 (Bexar®, Zevalin®) dans les lymphomes et suscite un intérêt croissant de l'industrie pharmaceutique. Il est donc envisageable que les anticorps ciblant le récepteur à l'IL2 viennent prochainement rejoindre la panoplie des anticorps existants et soient intégrés à part entière dans les stratégies de traitement des leucémies T.

L'utilisation d'émetteurs alpha en radioimmunothérapie est actuellement en cours d'évaluation pré-clinique pour le ciblage de ces pathologies. Les caractéristiques physiques des rayonnements alpha, ainsi que leur fort potentiel radiotoxique sont adaptés au ciblage de cellules isolées et des tumeurs diffuses, ce qui permet d'envisager un gain d'efficacité comparativement aux rayonnements bêta actuellement utilisés.

À côté de ces évolutions technologiques, le champ d'application clinique du ciblage du récepteur à l'IL2 pourrait s'étendre au traitement local ou systémique des pathologies auto-immunes en ciblant le compartiment T dont le rôle n'est plus à démontrer dans ces dysfonctionnements immunitaires. L'application du ciblage du système IL2/IL2 récepteur dans ces maladies, dont le pronostic n'est pas vital, reste encore peu investiguée probablement en raison de la toxicité aux tissus sains. Les traitements palliatifs anti-inflammatoires et immunosuppresseurs appliqués actuellement aux pathologies auto-immunes sont cependant accompagnés d'effets secondaires non négligeables. À l'image des traitements utilisés dans la

prévention du rejet de greffe ou le ciblage du système IL2/IL2 récepteur a permis de limiter la toxicité liée au traitement immunosupresseur. Une telle approche pourrait permettre un bénéfice thérapeutique pour les patients atteints de pathologies autoimmunes en intervenant plus précocément, afin de retarder ou de contrôler la progression de la maladie.

---

## Références bibliographiques

1. **Abramowicz, D., Schandene, L., Goldman, M., Crusiaux, A., Vereerstraeten, P., De Pauw, L., Wybran, J., Kinnaert, P., Dupont, E., and Toussaint, C.** (1989). Release of tumor necrosis factor, interleukin-2, and gamma-interferon in serum after injection of OKT3 monoclonal antibody in kidney transplant recipients. Transplantation 47, 606-608.
2. **Ajani, J. A., Kelsen, D. P., Haller, D., Hargraves, K., and Healey, D.** (2000). A multi-institutional phase II study of BMS-182248-01 (BR96-doxorubicin conjugate) administered every 21 days in patients with advanced gastric adenocarcinoma. Cancer J 6, 78-81.
3. **Allen, B. J.** (1999). Targeted alpha therapy: evidence for potential efficacy of alpha-immunoconjugates in the management of micrometastatic cancer. Australas Radiol 43, 480-486.
4. **Allured, V. S., Collier, R. J., Carroll, S. F., and McKay, D. B.** (1986). Structure of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0-Angstrom resolution. Proc Natl Acad Sci U S A 83, 1320-1324.
5. **Almeida, A. R., Legrand, N., Papiernik, M., and Freitas, A. A.** (2002). Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers. J Immunol 169, 4850-4860.
6. **Ambrosetti, A., Nadali, G., Vinante, F., Carlini, S., Veneri, D., Todeschini, G., Morosato, L., de Sabata, D., Chilosi, M., Maggi, E., and et al.** (1993). Serum levels of soluble interleukin-2 receptor in Hodgkin disease. Relationship with clinical stage, tumor burden, and treatment outcome. Cancer 72, 201-206.
7. **Amlot, P. L., Rawlings, E., Fernando, O. N., Griffin, P. J., Heinrich, G., Schreier, M. H., Castaigne, J. P., Moore, R., and Sweny, P.** (1995). Prolonged action of a chimeric interleukin-2 receptor (CD25) monoclonal antibody used in cadaveric renal transplantation. Transplantation 60, 748-756.
8. **Asao, H., Takeshita, T., Nakamura, M., Nagata, K., and Sugamura, K.** (1990). The evidence for the IL-2 receptor beta chain processing from p70 to p75. Int Immunol 2, 469-472.
9. **Atcher, R. W., Friedman, A. M., and Hines, J. J.** (1988). An improved generator for the production of 212Pb and 212Bi from 224Ra. Int J Rad Appl Instrum [A] 39, 283-286.
10. **Auphan, N., DiDonato, J. A., Rosette, C., Helmborg, A., and Karin, M.** (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. Science 270, 286-290.
11. **Axworthy, D. B., Reno, J. M., Hylarides, M. D., Mallett, R. W., Theodore, L. J., Gustavson, L. M., Su, F., Hobson, L. J., Beaumier, P. L., and Fritzberg, A. R.** (2000). Cure of human carcinoma xenografts by a single dose of pretargeted yttrium-90 with negligible toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 1802-1807.
12. **Azimi, N., Jacobson, S., Leist, T., and Waldmann, T. A.** (1999). Involvement of IL-15 in the pathogenesis of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: implications for therapy with a monoclonal antibody directed to the IL-2/15R beta receptor. J Immunol 163, 4064-4072.
13. **Azria, D., Coelho, M., Larbouret, C., Lemanski, C., Serre, A., Ychou, M., Pelegrin, A., Dubois, J. B., and Culine, S.** (2004). [Concomitant use of radiotherapy and gemcitabine: preclinical findings and clinical practice]. Cancer Radiother 8 Suppl 1, S106-113.

14. **Baba, H., Yamada, Y., Mori, N., Hayashibara, T., Harasawa, H., Tsuruda, K., Sugahara, K., Soda, H., Takasaki, Y., Tawara, M., et al.** (2002). Multiple gammac-receptor expression in adult T-cell leukemia. Eur J Haematol 68, 362-369.
15. **Ballard, D. W., Bohnlein, E., Lowenthal, J. W., Wano, Y., Franza, B. R., and Greene, W. C.** (1988). HTLV-I tax induces cellular proteins that activate the kappa B element in the IL-2 receptor alpha gene. Science 241, 1652-1655.
16. **Bamford, R. N., Grant, A. J., Burton, J. D., Peters, C., Kurys, G., Goldman, C. K., Brennan, J., Roessler, E., and Waldmann, T. A.** (1994). The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 4940-4944.
17. **Barbet, J., Kraeber-Bodere, F., Vuillez, J. P., Gautherot, E., Rouvier, E., and Chatal, J. F.** (1999). Pretargeting with the affinity enhancement system for radioimmunotherapy. Cancer Biother Radiopharm 14, 153-166.
18. **Barral-Netto, M., Barral, A., Santos, S. B., Carvalho, E. M., Badaro, R., Rocha, H., Reed, S. G., and Johnson, W. D., Jr.** (1991). Soluble IL-2 receptor as an agent of serum-mediated suppression in human visceral leishmaniasis. J Immunol 147, 281-284.
19. **Bazan, J. F.** (1990). Haemopoietic receptors and helical cytokines. Immunol Today 11, 350-354.
20. **Behr, T. M., Behe, M., Stabin, M. G., Wehrmann, E., Apostolidis, C., Molinet, R., Strutz, F., Fayyazi, A., Wieland, E., Gratz, S., et al.** (1999). High-linear energy transfer (LET) alpha versus low-LET beta emitters in radioimmunotherapy of solid tumors: therapeutic efficacy and dose-limiting toxicity of <sup>213</sup>Bi- versus <sup>90</sup>Y-labeled CO17-1A Fab' fragments in a human colonic cancer model. Cancer Res 59, 2635-2643.
21. **Berzofsky, J. A., Ahlers, J. D., Janik, J., Morris, J., Oh, S., Terabe, M., and Belyakov, I. M.** (2004). Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections. J Clin Invest 114, 450-462.
22. **Bethge, W. A., and Sandmaier, B. M.** (2004). Targeted cancer therapy and immunosuppression using radiolabeled monoclonal antibodies. Semin Oncol 31, 68-82.
23. **Bitard, J., Daburon, S., Duplomb, L., Blanchard, F., Vuisio, P., Jacques, Y., Godard, A., Heath, J. K., Moreau, J. F., and Taupin, J. L.** (2003). Mutations in the immunoglobulin-like domain of gp190, the leukemia inhibitory factor (LIF) receptor, increase or decrease its affinity for LIF. J Biol Chem 278, 16253-16261.
24. **Bock, G. H., Neu, L., Long, C., Patterson, L. T., Korb, S., Gelpi, J., and Nelson, D. L.** (1994). An assessment of serum and urine soluble interleukin-2 receptor concentrations during renal transplant rejection. Am J Kidney Dis 23, 421-426.
25. **Bourdage, J. S., and Hamlin, D. M.** (1995). Comparative polyclonal antithymocyte globulin and antilymphocyte/antilymphoblast globulin anti-CD antigen analysis by flow cytometry. Transplantation 59, 1194-1200.
26. **Bourdage, J. S., and Hamlin, D. M.** (1995). Comparative polyclonal antithymocyte globulin and antilymphocyte/antilymphoblast globulin anti-CD antigen analysis by flow cytometry. Transplantation 59, 1194-1200.
27. **Boussiotis, V. A., Freeman, G. J., Griffin, J. D., Gray, G. S., Gribben, J. G., and Nadler, L. M.** (1994). CD2 is involved in maintenance and reversal of human alloantigen-specific clonal anergy. J Exp Med 180, 1665-1673.
28. **Brandhuber, B. J., Boone, T., Kenney, W. C., and McKay, D. B.** (1987). Three-dimensional structure of interleukin-2. Science 238, 1707-1709.

29. **Brinkmann, U., Brinkmann, E., Gallo, M., and Pastan, I.** (1995). Cloning and characterization of a cellular apoptosis susceptibility gene, the human homologue to the yeast chromosome segregation gene CSE1. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 10427-10431.
30. **Burton, J. D., Bamford, R. N., Peters, C., Grant, A. J., Kurys, G., Goldman, C. K., Brennan, J., Roessler, E., and Waldmann, T. A.** (1994). A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 4935-4939.
31. **Byrd, J. C., Kitada, S., Flinn, I. W., Aron, J. L., Pearson, M., Lucas, D., and Reed, J. C.** (2002). The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. Blood 99, 1038-1043.
32. **Caligiuri, M. A., Zmuidzinas, A., Manley, T. J., Levine, H., Smith, K. A., and Ritz, J.** (1990). Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. J Exp Med 171, 1509-1526.
33. **Cantrell, D. A., and Smith, K. A.** (1984). The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. Science 224, 1312-1316.
34. **Carretero-Margolis, C. D., and Fivenson, D. P.** (2003). A complete and durable response to denileukin diftitox in a patient with mycosis fungoides. J Am Acad Dermatol 48, 275-276.
35. **Carson, W. E., Fehniger, T. A., Haldar, S., Eckhert, K., Lindemann, M. J., Lai, C. F., Croce, C. M., Baumann, H., and Caligiuri, M. A.** (1997). A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. J Clin Invest 99, 937-943.
36. **Chappell, L. L., Deal, K. A., Dadachova, E., and Brechbiel, M. W.** (2000). Synthesis, conjugation, and radiolabeling of a novel bifunctional chelating agent for (225)Ac radioimmunotherapy applications. Bioconjug Chem 11, 510-519.
37. **Chatenoud, L., Ferran, C., Reuter, A., Legendre, C., Gevaert, Y., Kreis, H., Franchimont, P., and Bach, J. F.** (1989). Systemic reaction to the anti-T-cell monoclonal antibody OKT3 in relation to serum levels of tumor necrosis factor and interferon-gamma [corrected]. N Engl J Med 320, 1420-1421.
38. **Chatenoud, L.** (2003). CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. Nat Rev Immunol 3, 123-132.
39. **Chen, Z. K., Cobbold, S. P., Waldmann, H., and Metcalfe, S.** (1996). Amplification of natural regulatory immune mechanisms for transplantation tolerance. Transplantation 62, 1200-1206.
40. **Chen, J. J., Sun, Y., and Nabel, G. J.** (1998). Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). Science 282, 1714-1717.
41. **Chiarion-Sileni, V., Bononi, A., Fornasa, C. V., Soraru, M., Alaibac, M., Ferrazzi, E., Redelotti, R., Peserico, A., Monfardini, S., and Salvagno, L.** (2002). Phase II trial of interferon-alpha-2a plus psolaren with ultraviolet light A in patients with cutaneous T-cell lymphoma. Cancer 95, 569-575.
42. **Christians, U., and Sewing, K. F.** (1993). Cyclosporin metabolism in transplant patients. Pharmacol Ther 57, 291-345.
43. **Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., and Winter, G.** (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. Nature 352, 624-628.
44. **Cobleigh, M. A., Vogel, C. L., Tripathy, D., Robert, N. J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., Wolter, J. M., Paton, V., Shak, S., Lieberman, G., and Slamon, D. J.** (1999). Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. J Clin Oncol 17, 2639-2648.

45. **Cohen, J. L., Trenado, A., Vasey, D., Klatzmann, D., and Salomon, B. L.** (2002). CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. J Exp Med 196, 401-406.
46. **Colcher, D., Pavlinkova, G., Beresford, G., Booth, B. J., Choudhury, A., and Batra, S. K.** (1998). Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies. Q J Nucl Med 42, 225-241.
47. **Colver, G. B., Symons, J. A., and Duff, G. W.** (1989). Soluble interleukin 2 receptor in atopic eczema. Bmj 298, 1426-1428.
48. **Crabtree, G. R., and Olson, E. N.** (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. Cell 109 Suppl, S67-79.
49. **Dai, Z., Konieczny, B. T., Baddoura, F. K., and Lakkis, F. G.** (1998). Impaired alloantigen-mediated T cell apoptosis and failure to induce long-term allograft survival in IL-2-deficient mice. J Immunol 161, 1659-1663.
50. **Dai, Z., and Lakkis, F. G.** (1999). The role of cytokines, CTLA-4 and costimulation in transplant tolerance and rejection. Curr Opin Immunol 11, 504-508.
51. **Dang, N. H., Hagemester, F. B., Pro, B., McLaughlin, P., Romaguera, J. E., Jones, D., Samuels, B., Samaniego, F., Younes, A., Wang, M., et al.** (2004). Phase II study of denileukin diftitox for relapsed/refractory B-Cell non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol 22, 4095-4102.
52. **Davie, E. W., Ichinose, A., and Leytus, S. P.** (1986). Structural features of the proteins participating in blood coagulation and fibrinolysis. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51 Pt 1, 509-514.
53. **DeNardo, G. L., Bradt, B. M., Mirick, G. R., and DeNardo, S. J.** (2003). Human antiglobulin response to foreign antibodies: therapeutic benefit? Cancer Immunol Immunother 52, 309-316.
54. **Depper, J. M., Leonard, W. J., Drogula, C., Kronke, M., Waldmann, T. A., and Greene, W. C.** (1985). Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. Proc Natl Acad Sci U S A 82, 4230-4234.
55. **Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovsky, J., Munz, C., and Bhardwaj, N.** (2001). Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. J Exp Med 193, 233-238.
56. **DiJoseph, J. F., Goad, M. E., Dougher, M. M., Boghaert, E. R., Kunz, A., Hamann, P. R., and Damle, N. K.** (2004). Potent and specific antitumor efficacy of CMC-544, a CD22-targeted immunoconjugate of calicheamicin, against systemically disseminated B-cell lymphoma. Clin Cancer Res 10, 8620-8629.
57. **Douillard, J. Y., and Chatal, J. F.** (1998). [Use of antibodies or their fragments for the treatment of tumors]. Bull Cancer 85, 951-959.
58. **Durbin, P. W.** (1960). Metabolic characteristics within a chemical family. Health Phys 2, 225-238.
59. **Duvic, M., Cather, J., Maize, J., and Frankel, A. E.** (1998). DAB389IL2 diphtheria fusion toxin produces clinical responses in tumor stage cutaneous T cell lymphoma. Am J Hematol 58, 87-90.
60. **Eisen, H. J., Tuzcu, E. M., Dorent, R., Kobashigawa, J., Mancini, D., Valentine-von Kaeppler, H. A., Starling, R. C., Sorensen, K., Hummel, M., Lind, J. M., et al.** (2003). Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. N Engl J Med 349, 847-858.
61. **Espinoza-Delgado, I., Ortaldo, J. R., Winkler-Pickett, R., Sugamura, K., Varesio, L., and Longo, D. L.** (1990). Expression and role of p75 interleukin 2 receptor on human monocytes. J Exp Med 171, 1821-1826.
62. **Farah, R. A., Clinchy, B., Herrera, L., and Vitetta, E. S.** (1998). The development of monoclonal antibodies for the therapy of cancer. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 8, 321-356.

- 
63. **Firpo, E. J., Koff, A., Solomon, M. J., and Roberts, J. M.** (1994). Inactivation of a Cdk2 inhibitor during interleukin 2-induced proliferation of human T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 14, 4889-4901.
64. **Flandrin, G., Sigaux, F., Sebahoun, G., and Bouffette, P.** (1984). Hairy cell leukemia: clinical presentation and follow-up of 211 patients. *Semin Oncol* 11, 458-471.
65. **Fluckiger, A. C., Garrone, P., Durand, I., Galizzi, J. P., and Banchereau, J.** (1993). Interleukin 10 (IL-10) upregulates functional high affinity IL-2 receptors on normal and leukemic B lymphocytes. *J Exp Med* 178, 1473-1481.
66. **Fluckiger, A. C., Garrone, P., Durand, I., Galizzi, J. P., and Banchereau, J.** (1993). Interleukin 10 (IL-10) upregulates functional high affinity IL-2 receptors on normal and leukemic B lymphocytes. *J Exp Med* 178, 1473-1481.
67. **Fornasini, G., Monti, N., Brogin, G., Gallina, M., Eandi, M., Persiani, S., Bani, M., Della Pepa, C., Zara, G., and Strolin Benedetti, M.** (1997). Preliminary pharmacokinetic study of ibuprofen enantiomers after administration of a new oral formulation (ibuprofen arginine) to healthy male volunteers. *Chirality* 9, 297-302.
68. **Foss, F. M., Saleh, M. N., Krueger, J. G., Nichols, J. C., and Murphy, J. R.** (1998). Diphtheria toxin fusion proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 234, 63-81.
69. **Frankel, A. E., Fleming, D. R., Powell, B. L., and Gartenhaus, R.** (2003). DAB389IL2 (ONTAK) fusion protein therapy of chronic lymphocytic leukaemia. *Expert Opin Biol Ther* 3, 179-186.
70. **Friedmann, M. C., Migone, T. S., Russell, S. M., and Leonard, W. J.** (1996). Different interleukin 2 receptor beta-chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2077-2082.
71. **Froussard, P., Jankovic, D. L., Chastagner, P., and Theze, J.** (1991). Induction of mouse p55 interleukin-2 receptor gene expression by IL-2 and IL-4 and characterization of its transcription initiation sites. *Mol Immunol* 28, 87-93.
72. **Gaffen, S. L., Wang, S., and Koshland, M. E.** (1996). Expression of the immunoglobulin J chain in a murine B lymphoma is driven by autocrine production of interleukin 2. *Cytokine* 8, 513-524.
73. **Geerlings, M. W., Kaspersen, F. M., Apostolidis, C., and van der Hout, R.** (1993). The feasibility of <sup>225</sup>Ac as a source of alpha-particles in radioimmunotherapy. *Nucl Med Commun* 14, 121-125.
74. **Gershon, R. K., and Kondo, K.** (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18, 723-737.
75. **Giri, J. G., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K., Kumaki, S., Namen, A., Park, L. S., Cosman, D., and Anderson, D.** (1994). Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *Embo J* 13, 2822-2830.
76. **Giri, J. G., Kumaki, S., Ahdieh, M., Friend, D. J., Loomis, A., Shanebeck, K., DuBose, R., Cosman, D., Park, L. S., and Anderson, D. M.** (1995). Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *Embo J* 14, 3654-3663.
77. **Giron-Michel, J., Fogli, M., Gaggero, A., Ferrini, S., Caignard, A., Brouty-Boye, D., Baouz, S., Le Bousse-Kerdiles, M. C., Peault, B., van Dijk, M., et al.** (2003). Detection of a functional hybrid receptor gammac/GM-CSFRbeta in human hematopoietic CD34+ cells. *J Exp Med* 197, 763-775.
78. **Goldenberg, D. M.** (2002). Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies. *J Nucl Med* 43, 693-713.
79. **Goldsby, R. A., Kindt, T. J., and Osborne, B. A.** (2000). Immunologie, Le cours de Janis Kuby, Dunod ed.
-

80. **Goldschneider, I., and Cone, R. E.** (2003). A central role for peripheral dendritic cells in the induction of acquired thymic tolerance. Trends Immunol 24, 77-81.
81. **Grabstein, K. H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M. A., Ahdieh, M., and et al.** (1994). Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. Science 264, 965-968.
82. **Graca, L., Honey, K., Adams, E., Cobbold, S. P., and Waldmann, H.** (2000). Cutting edge: anti-CD154 therapeutic antibodies induce infectious transplantation tolerance. J Immunol 165, 4783-4786.
83. **Graca, L., Le Moine, A., Cobbold, S. P., and Waldmann, H.** (2003). Antibody-induced transplantation tolerance: the role of dominant regulation. Immunol Res 28, 181-191.
84. **Green, D. R.** (2003). The suicide in the thymus, a twisted trail. Nat Immunol 4, 207-208.
85. **Gregori, S., Casorati, M., Amuchastegui, S., Smioldo, S., Davalli, A. M., and Adorini, L.** (2001). Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. J Immunol 167, 1945-1953.
86. **Griffiths, G. L., Govindan, S. V., Sharkey, R. M., Fisher, D. R., and Goldenberg, D. M.** (2003). 90Y-DOTA-hLL2: an agent for radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma. J Nucl Med 44, 77-84.
87. **Hanks, S. K., Quinn, A. M., and Hunter, T.** (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. Science 241, 42-52.
88. **Hatakeyama, M., Minamoto, S., and Taniguchi, T.** (1986). Intracytoplasmic phosphorylation sites of Tac antigen (p55) are not essential for the conformation, function, and regulation of the human interleukin 2 receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 83, 9650-9654.
89. **Hatakeyama, M., Tsudo, M., Minamoto, S., Kono, T., Doi, T., Miyata, T., Miyasaka, M., and Taniguchi, T.** (1989). Interleukin-2 receptor beta chain gene: generation of three receptor forms by cloned human alpha and beta chain cDNA's. Science 244, 551-556.
90. **Hayashi, T., Treon, S. P., Hideshima, T., Tai, Y. T., Akiyama, M., Richardson, P., Chauhan, D., Grewal, I. S., and Anderson, K. C.** (2003). Recombinant humanized anti-CD40 monoclonal antibody triggers autologous antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against multiple myeloma cells. Br J Haematol 121, 592-596.
91. **Hicklin, D. J., and Ellis, L. M.** (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. J Clin Oncol 23, 1011-1027.
92. **Hicklin, D. J., and Ellis, L. M.** (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. J Clin Oncol 23, 1011-1027.
93. **Hoffmann, P., Ermann, J., Edinger, M., Fathman, C. G., and Strober, S.** (2002). Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. J Exp Med 196, 389-399.
94. **Honda, M., Kitamura, K., Matsuda, K., Yokota, Y., Yamamoto, N., Mitsuyasu, R., Chermann, J. C., and Tokunaga, T.** (1989). Soluble IL-2 receptor in AIDS. Correlation of its serum level with the classification of HIV-induced diseases and its characterization. J Immunol 142, 4248-4255.
95. **Hudson, P. J., and Souriau, C.** (2003). Engineered antibodies. Nat Med 9, 129-134.
96. **Hwang, J., Fitzgerald, D. J., Adhya, S., and Pastan, I.** (1987). Functional domains of Pseudomonas exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in E. coli. Cell 48, 129-136.

- 
97. **Ildstad, S. T., and Sachs, D. H.** (1984). Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts. Nature 307, 168-170.
98. **Imam, S. K.** (2001). Advancements in cancer therapy with alpha-emitters: a review. Int J Radiat Oncol Biol Phys 51, 271-278.
99. **Iwasaki, Y., Ohara, Y., Kobayashi, I., and Akizuki, S.** (1992). Infiltration of helper/inducer T lymphocytes heralds central nervous system damage in human T-cell leukemia virus infection. Am J Pathol 140, 1003-1008.
100. **Jacques, Y., Le Mauff, B., Boeffard, F., Godard, A., and Soullilou, J. P.** (1987). A soluble interleukin 2 receptor produced by a normal alloreactive human T cell clone binds interleukin 2 with low affinity. J Immunol 139, 2308-2316.
101. **Jain, R. K.** (1987). Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. Cancer Res 47, 3039-3051.
102. **Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. J.** (2003). Immunobiologie, De Boeck edn.
103. **Jeffery, K. J., Usuku, K., Hall, S. E., Matsumoto, W., Taylor, G. P., Procter, J., Bunce, M., Ogg, G. S., Welsh, K. I., Weber, J. N., et al.** (1999). HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 3848-3853.
104. **Jeremic, B., Milicic, B., Acimovic, L., and Milisavljevic, S.** (2005). Concurrent hyperfractionated radiotherapy and low-dose daily carboplatin and paclitaxel in patients with stage III non-small-cell lung cancer: long-term results of a phase II study. J Clin Oncol 23, 1144-1151.
105. **Jeremic, B., Milicic, B., Acimovic, L., and Milisavljevic, S.** (2005). Concurrent hyperfractionated radiotherapy and low-dose daily carboplatin/paclitaxel in patients with early-stage (I/II) non-small-cell lung cancer: long-term results of a phase II study. J Clin Oncol 23, 6873-6880.
106. **Jones, D., Ibrahim, S., Patel, K., Luthra, R., Duvic, M., and Medeiros, L. J.** (2004). Degree of CD25 expression in T-cell lymphoma is dependent on tissue site: implications for targeted therapy. Clin Cancer Res 10, 5587-5594.
107. **Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., and Enk, A. H.** (2001). Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. J Exp Med 193, 1285-1294.
108. **Josimovic-Alasevic, O., Herrmann, T., and Diamantstein, T.** (1988). Demonstration of two distinct forms of released low-affinity type interleukin 2 receptors. Eur J Immunol 18, 1855-1857.
109. **Kamihira, S., Atogami, S., Sohda, H., Momita, S., Yamada, Y., and Tomonaga, M.** (1994). Significance of soluble interleukin-2 receptor levels for evaluation of the progression of adult T-cell leukemia. Cancer 73, 2753-2758.
110. **Kanakura, Y., Sugahara, H., Mitsui, H., Ikeda, H., Furitsu, T., Yagura, H., Kitayama, H., Kanayama, Y., and Matsuzawa, Y.** (1993). Functional expression of interleukin 2 receptor in a human factor-dependent megakaryoblastic leukemia cell line: evidence that granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inhibits interleukin 2 binding to its receptor. Cancer Res 53, 675-680.
111. **Karnitz, L. M., and Abraham, R. T.** (1996). Interleukin-2 receptor signaling mechanisms. Adv Immunol 61, 147-199.
112. **Kaspersen, F. M., Bos, E., Doornmalen, A. V., Geerlings, M. W., Apostolidis, C., and Molinet, R.** (1995). Cytotoxicity of <sup>213</sup>Bi- and <sup>225</sup>Ac-immunoconjugates. Nucl Med Commun 16, 468-476.

113. **Keystone, E. C., Snow, K. M., Bombardier, C., Chang, C. H., Nelson, D. L., and Rubin, L. A.** (1988). Elevated soluble interleukin-2 receptor levels in the sera and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 31, 844-849.
114. **Kodaka, T., Uchiyama, T., Ishikawa, T., Kamio, M., Onishi, R., Itoh, K., Hori, T., Uchino, H., Tsudo, M., and Araki, K.** (1990). Interleukin-2 receptor beta-chain (p70-75) expressed on leukemic cells from adult T cell leukemia patients. Jpn J Cancer Res 81, 902-908.
115. **Kondo, N., Kondo, S., Shimizu, A., Honjo, T., and Hamuro, J.** (1988). A soluble 'anchorman' interleukin 2 receptor suppresses in vitro interleukin 2-mediated immune responses. Immunol Lett 19, 299-307.
116. **Kreisel, D., Sankaran, D., Wells, A. D., and Turka, L. A.** (2002). Interleukin-2-mediated survival and proliferative signals are uncoupled in T lymphocytes that fail to divide after activation. Am J Transplant 2, 120-128.
117. **Kreitman, R. J., Chaudhary, V. K., Waldmann, T., Willingham, M. C., FitzGerald, D. J., and Pastan, I.** (1990). The recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-Pseudomonas exotoxin 40 is cytotoxic toward peripheral blood malignant cells from patients with adult T-cell leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 87, 8291-8295.
118. **Kreitman, R. J., Batra, J. K., Seetharam, S., Chaudhary, V. K., FitzGerald, D. J., and Pastan, I.** (1993). Single-chain immunotoxin fusions between anti-Tac and Pseudomonas exotoxin: relative importance of the two toxin disulfide bonds. Bioconjug Chem 4, 112-120.
119. **Kreitman, R. J., Bailon, P., Chaudhary, V. K., FitzGerald, D. J., and Pastan, I.** (1994). Recombinant immunotoxins containing anti-Tac(Fv) and derivatives of Pseudomonas exotoxin produce complete regression in mice of an interleukin-2 receptor-expressing human carcinoma. Blood 83, 426-434.
120. **Kreitman, R. J., and Pastan, I.** (1995). Targeting Pseudomonas exotoxin to hematologic malignancies. Semin Cancer Biol 6, 297-306.
121. **Kreitman, R. J., and Pastan, I.** (1998). Accumulation of a recombinant immunotoxin in a tumor in vivo: fewer than 1000 molecules per cell are sufficient for complete responses. Cancer Res 58, 968-975.
122. **Kreitman, R. J., Wilson, W. H., White, J. D., Stetler-Stevenson, M., Jaffe, E. S., Giardina, S., Waldmann, T. A., and Pastan, I.** (2000). Phase I trial of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) in patients with hematologic malignancies. J Clin Oncol 18, 1622-1636.
123. **Kurth, I., Horsten, U., Pflanz, S., Timmermann, A., Kuster, A., Dahmen, H., Tacke, I., Heinrich, P. C., and Muller-Newen, G.** (2000). Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130. J Immunol 164, 273-282.
124. **Lamers, C. H., Bolhuis, R. L., Warnaar, S. O., Stoter, G., and Gratama, J. W.** (1997). Local but no systemic immunomodulation by intraperitoneal treatment of advanced ovarian cancer with autologous T lymphocytes re-targeted by a bi-specific monoclonal antibody. Int J Cancer 73, 211-219.
125. **Larsen, C. P., Elwood, E. T., Alexander, D. Z., Ritchie, S. C., Hendrix, R., Tucker-Burden, C., Cho, H. R., Aruffo, A., Hollenbaugh, D., Linsley, P. S., et al.** (1996). Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. Nature 381, 434-438.
126. **Lawrence, T. S., Davis, M. A., Hough, A., and Rehemtulla, A.** (2001). The role of apoptosis in 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine (gemcitabine)-mediated radiosensitization. Clin Cancer Res 7, 314-319.
127. **Layton, J. E., Hall, N. E., Connell, F., Venhorst, J., and Treutlein, H. R.** (2001). Identification of ligand-binding site III on the immunoglobulin-like domain of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. J Biol Chem 276, 36779-36787.

- 
128. **Lechler, R. I., Garden, O. A., and Turka, L. A.** (2003). The complementary roles of deletion and regulation in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 3, 147-158.
129. **LeMaistre, C. F., Saleh, M. N., Kuzel, T. M., Foss, F., Plataniias, L. C., Schwartz, G., Ratain, M., Rook, A., Freytes, C. O., Craig, F., et al.** (1998). Phase I trial of a ligand fusion-protein (DAB389IL-2) in lymphomas expressing the receptor for interleukin-2. *Blood* 91, 399-405.
130. **Lenardo, M., Chan, K. M., Hornung, F., McFarland, H., Siegel, R., Wang, J., and Zheng, L.** (1999). Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* 17, 221-253.
131. **Leonard, W. J., Depper, J. M., Uchiyama, T., Smith, K. A., Waldmann, T. A., and Greene, W. C.** (1982). A monoclonal antibody that appears to recognize the receptor for human T-cell growth factor; partial characterization of the receptor. *Nature* 300, 267-269.
132. **Leonard, W. J., Depper, J. M., Robb, R. J., Waldmann, T. A., and Greene, W. C.** (1983). Characterization of the human receptor for T-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 6957-6961.
133. **Li, M., Dyda, F., Benhar, I., Pastan, I., and Davies, D. R.** (1996). Crystal structure of the catalytic domain of Pseudomonas exotoxin A complexed with a nicotinamide adenine dinucleotide analog: implications for the activation process and for ADP ribosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6902-6906.
134. **Li, Y., Li, X. C., Zheng, X. X., Wells, A. D., Turka, L. A., and Strom, T. B.** (1999). Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat Med* 5, 1298-1302.
135. **Li, X. C., Li, Y., Dodge, I., Wells, A. D., Zheng, X. X., Turka, L. A., and Strom, T. B.** (1999). Induction of allograft tolerance in the absence of Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 163, 2500-2507.
136. **Li, X. C., Wells, A. D., Strom, T. B., and Turka, L. A.** (2000). The role of T cell apoptosis in transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol* 12, 522-527.
137. **Li, X. C., Demirci, G., Ferrari-Lacraz, S., Groves, C., Coyle, A., Malek, T. R., and Strom, T. B.** (2001). IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo. *Nat Med* 7, 114-118.
138. **Li, X. C., Strom, T. B., Turka, L. A., and Wells, A. D.** (2001). T cell death and transplantation tolerance. *Immunity* 14, 407-416.
139. **Lin, H., Bolling, S. F., Linsley, P. S., Wei, R. Q., Gordon, D., Thompson, C. B., and Turka, L. A.** (1993). Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4Ig plus donor-specific transfusion. *J Exp Med* 178, 1801-1806.
140. **Liu, C. C., Joag, S. V., Kwon, B. S., and Young, J. D.** (1990). Induction of perforin and serine esterases in a murine cytotoxic T lymphocyte clone. *J Immunol* 144, 1196-1201.
141. **Liu, C., Tadayoni, B. M., Bourret, L. A., Mattocks, K. M., Derr, S. M., Widdison, W. C., Kedersha, N. L., Ariniello, P. D., Goldmacher, V. S., Lambert, J. M., et al.** (1996). Eradication of large colon tumor xenografts by targeted delivery of maytansinoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8618-8623.
142. **Lombardi, G., Dunne, P. J., Scheel-Toellner, D., Sanyal, T., Pilling, D., Taams, L. S., Life, P., Lord, J. M., Salmon, M., and Akbar, A. N.** (2000). Type 1 IFN maintains the survival of anergic CD4+ T cells. *J Immunol* 165, 3782-3789.
143. **Macian, F., Garcia-Cozar, F., Im, S. H., Horton, H. F., Byrne, M. C., and Rao, A.** (2002). Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* 109, 719-731.
-

144. **Mack, M., Riethmuller, G., and Kufer, P.** (1995). A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 7021-7025.
145. **Maeda, M., Arima, N., Daitoku, Y., Kashihara, M., Okamoto, H., Uchiyama, T., Shirono, K., Matsuoka, M., Hattori, T., Takatsuki, K., and et al.** (1987). Evidence for the interleukin-2 dependent expansion of leukemic cells in adult T cell leukemia. Blood 70, 1407-1411.
146. **Makrigiannis, A. P., and Hoskin, D. W.** (1997). Inhibition of CTL induction by rapamycin: IL-2 rescues granzyme B and perforin expression but only partially restores cytotoxic activity. J Immunol 159, 4700-4707.
147. **Malek, T. R.** (2003). The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells. J Leukoc Biol 74, 961-965.
148. **Mandala, S., Hajdu, R., Bergstrom, J., Quackenbush, E., Xie, J., Milligan, J., Thornton, R., Shei, G. J., Card, D., Keohane, C., et al.** (2002). Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. Science 296, 346-349.
149. **McDevitt, M. R., Sgouros, G., Finn, R. D., Humm, J. L., Jurcic, J. G., Larson, S. M., and Scheinberg, D. A.** (1998). Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. Eur J Nucl Med 25, 1341-1351.
150. **McDevitt, M. R., Ma, D., Lai, L. T., Simon, J., Borchardt, P., Frank, R. K., Wu, K., Pellegrini, V., Curcio, M. J., Miederer, M., et al.** (2001). Tumor therapy with targeted atomic nanogenerators. Science 294, 1537-1540.
151. **McDevitt, M. R., Ma, D., Simon, J., Frank, R. K., and Scheinberg, D. A.** (2002). Design and synthesis of <sup>225</sup>Ac radioimmunopharmaceuticals. Appl Radiat Isot 57, 841-847.
152. **McFarlane, C. G., and Meikle, M. C.** (1991). Interleukin-2, interleukin-2 receptor and interleukin-4 levels are elevated in the sera of patients with periodontal disease. J Periodontal Res 26, 402-408.
153. **Meissner, U., Blum, H., Schnare, M., Rollinghoff, M., and Gessner, A.** (2001). A soluble form of the murine common gamma chain is present at high concentrations in vivo and suppresses cytokine signaling. Blood 97, 183-191.
154. **Mey, U., Strehl, J., Gorschluter, M., Ziske, C., Glasmacher, A., Pralle, H., and Schmidt-Wolf, I.** (2003). Advances in the treatment of hairy-cell leukaemia. Lancet Oncol 4, 86-94.
155. **Milas, L., Hunter, N. R., Mason, K. A., Kurdoglu, B., and Peters, L. J.** (1994). Enhancement of tumor radioresponse of a murine mammary carcinoma by paclitaxel. Cancer Res 54, 3506-3510.
156. **Minami, Y., Kono, T., Yamada, K., Kobayashi, N., Kawahara, A., Perlmutter, R. M., and Taniguchi, T.** (1993). Association of p56lck with IL-2 receptor beta chain is critical for the IL-2-induced activation of p56lck. Embo J 12, 759-768.
157. **Miyazaki, T., Liu, Z. J., Kawahara, A., Minami, Y., Yamada, K., Tsujimoto, Y., Barsoumian, E. L., Permuter, R. M., and Taniguchi, T.** (1995). Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation. Cell 81, 223-231.
158. **Morgan, D. A., Ruscetti, F. W., and Gallo, R.** (1976). Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. Science 193, 1007-1008.
159. **Morris, J. C., and Waldmann, T. A.** (2000). Advances in interleukin 2 receptor targeted treatment. Ann Rheum Dis 59 Suppl 1, i109-114.
160. **Mulford, D. A., Scheinberg, D. A., and Jurcic, J. G.** (2005). The promise of targeted {alpha}-particle therapy. J Nucl Med 46 Suppl 1, 199S-204S.

161. **Mulford, D. A., Scheinberg, D. A., and Jurcic, J. G.** (2005). The promise of targeted {alpha}-particle therapy. *J Nucl Med* 46 Suppl 1, 199S-204S.
162. **Muller, C., Knoflach, P., and Zielinski, C. C.** (1989). Soluble interleukin 2 receptor in acute viral hepatitis and chronic liver disease. *Hepatology* 10, 928-932.
163. **Nakarai, T., Robertson, M. J., Streuli, M., Wu, Z., Ciardelli, T. L., Smith, K. A., and Ritz, J.** (1994). Interleukin 2 receptor gamma chain expression on resting and activated lymphoid cells. *J Exp Med* 180, 241-251.
164. **Nakase, K., Kita, K., Nasu, K., Ueda, T., Tanaka, I., Shirakawa, S., and Tsudo, M.** (1994). Differential expression of interleukin-2 receptors (alpha and beta chain) in mature lymphoid neoplasms. *Am J Hematol* 46, 179-183.
165. **Nelson, B. H., and Willerford, D. M.** (1998). Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol* 70, 1-81.
166. **Nelson, B. H.** (2004). IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *J Immunol* 172, 3983-3988.
167. **Niitsu, N., Iijima, K., and Chizuka, A.** (2001). A high serum-soluble interleukin-2 receptor level is associated with a poor outcome of aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 66, 24-30.
168. **Noguchi, M., Adelstein, S., Cao, X., and Leonard, W. J.** (1993). Characterization of the human interleukin-2 receptor gamma chain gene. *J Biol Chem* 268, 13601-13608.
169. **Nourigat, C., Badger, C. C., and Bernstein, I. D.** (1990). Treatment of lymphoma with radiolabeled antibody: elimination of tumor cells lacking target antigen. *J Natl Cancer Inst* 82, 47-50.
170. **Odorico, J. S., Posselt, A. M., Naji, A., Markmann, J. F., and Barker, C. F.** (1993). Promotion of rat cardiac allograft survival by intrathymic inoculation of donor splenocytes. *Transplantation* 55, 1104-1107.
171. **Olsen, E., Duvic, M., Frankel, A., Kim, Y., Martin, A., Vonderheid, E., Jegasothy, B., Wood, G., Gordon, M., Heald, P., et al.** (2001). Pivotal phase III trial of two dose levels of denileukin diftitox for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 19, 376-388.
172. **Opelz, G.** (1995). Efficacy of rejection prophylaxis with OKT3 in renal transplantation. Collaborative Transplant Study. *Transplantation* 60, 1220-1224.
173. **Opelz, G.** (1995). Efficacy of rejection prophylaxis with OKT3 in renal transplantation. Collaborative Transplant Study. *Transplantation* 60, 1220-1224.
174. **Osawa, H., Josimovic-Alasevic, O., and Diamantstein, T.** (1986). Interleukin 2 receptors are released by cells in vitro and in vivo. I. Detection of soluble IL 2 receptors in cell culture supernatants and in the serum of mice by an immunoradiometric assay. *Eur J Immunol* 16, 467-469.
175. **Ozaki, K., and Leonard, W. J.** (2002). Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J Biol Chem* 277, 29355-29358.
176. **Ozkaynak, E., Gao, W., Shemmeri, N., Wang, C., Gutierrez-Ramos, J. C., Amaral, J., Qin, S., Rottman, J. B., Coyle, A. J., and Hancock, W. W.** (2001). Importance of ICOS-B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection. *Nat Immunol* 2, 591-596.
177. **Paganelli, G., Magnani, P., Zito, F., Villa, E., Sudati, F., Lopalco, L., Rossetti, C., Malcovati, M., Chiolerio, F., Seccamani, E., and et al.** (1991). Three-step monoclonal antibody tumor targeting in carcinoembryonic antigen-positive patients. *Cancer Res* 51, 5960-5966.
178. **Pawson, T.** (1995). Protein-tyrosine kinases. Getting down to specifics. *Nature* 373, 477-478.

179. **Pelegrin, A., Xavier, F., Barbet, J., Bartholeyns, J., Baty, D., Buchegger, F., Chatal, J. F., Dufief, F., Gurreau, D., Gruaz-Guyon, A., et al.** (2000). [Immunotargeting of tumors: state of the art and prospects in 2000]. *Bull Cancer* 87, 777-791.
180. **Pennica, D., Swanson, T. A., Shaw, K. J., Kuang, W. J., Gray, C. L., Beatty, B. G., and Wood, W. I.** (1996). Human cardiotrophin-1: protein and gene structure, biological and binding activities, and chromosomal localization. *Cytokine* 8, 183-189.
181. **Perkins, S. J., Haris, P. I., Sim, R. B., and Chapman, D.** (1988). A study of the structure of human complement component factor H by Fourier transform infrared spectroscopy and secondary structure averaging methods. *Biochemistry* 27, 4004-4012.
182. **Perkins, J. D., Nelson, D. L., Rakela, J., Grambsch, P. M., and Krom, R. A.** (1989). Soluble interleukin 2 receptor level in liver allograft recipients: an indicator of rejection. *Transplant Proc* 21, 2275-2276.
183. **Plaetinck, G., Van der Heyden, J., Tavernier, J., Fache, I., Tuypens, T., Fischkoff, S., Fiers, W., and Devos, R.** (1990). Characterization of interleukin 5 receptors on eosinophilic sublines from human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *J Exp Med* 172, 683-691.
184. **Platt, J. L., and Lakkis, F. G.** (2001). A scenic overlook on the road to clinical tolerance. *Trends Immunol* 22, 289-291.
185. **Posselt, A. M., Barker, C. F., Tomaszewski, J. E., Markmann, J. F., Choti, M. A., and Naji, A.** (1990). Induction of donor-specific unresponsiveness by intrathymic islet transplantation. *Science* 249, 1293-1295.
186. **Pouget, J. P., and Mather, S. J.** (2001). General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. *Eur J Nucl Med* 28, 541-561.
187. **Prince, H. E., Kleinman, S., and Williams, A. E.** (1988). Soluble IL-2 receptor levels in serum from blood donors seropositive for HIV. *J Immunol* 140, 1139-1141.
188. **Qin, S. X., Wise, M., Cobbold, S. P., Leong, L., Kong, Y. C., Parnes, J. R., and Waldmann, H.** (1990). Induction of tolerance in peripheral T cells with monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 20, 2737-2745.
189. **Qin, S., Cobbold, S. P., Pope, H., Elliott, J., Kioussis, D., Davies, J., and Waldmann, H.** (1993). "Infectious" transplantation tolerance. *Science* 259, 974-977.
190. **Quesada, J. R., Reuben, J., Manning, J. T., Hersh, E. M., and Gutterman, J. U.** (1984). Alpha interferon for induction of remission in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 310, 15-18.
191. **Railan, D., Fivenson, D. P., and Wittenberg, G.** (2000). Capillary leak syndrome in a patient treated with interleukin 2 fusion toxin for cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol* 43, 323-324.
192. **Re, G. G., Waters, C., Poisson, L., Willingham, M. C., Sugamura, K., and Frankel, A. E.** (1996). Interleukin 2 (IL-2) receptor expression and sensitivity to diphtheria fusion toxin DAB389IL-2 in cultured hematopoietic cells. *Cancer Res* 56, 2590-2595.
193. **Refaeli, Y., Van Parijs, L., London, C. A., Tschopp, J., and Abbas, A. K.** (1998). Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* 8, 615-623.
194. **Richards, D. S., Wagman, A. J., and Cabaniss, M. L.** (1990). Ascites not due to congestive heart failure in a fetus with lupus-induced heart block. *Obstet Gynecol* 76, 957-959.
195. **Rickert, M., Boulanger, M. J., Goriatcheva, N., and Garcia, K. C.** (2004). Compensatory energetic mechanisms mediating the assembly of signaling complexes between interleukin-2 and its alpha, beta, and gamma(c) receptors. *J Mol Biol* 339, 1115-1128.

- 
196. **Rickert, M., Wang, X., Boulanger, M. J., Goriatcheva, N., and Garcia, K. C.** (2005). The structure of interleukin-2 complexed with its alpha receptor. *Science* 308, 1477-1480.
197. **Robb, R. J., and Greene, W. C.** (1983). Direct demonstration of the identity of T cell growth factor binding protein and the Tac antigen. *J Exp Med* 158, 1332-1337.
198. **Robledo, O., Guillet, C., Chevalier, S., Fourcin, M., Froger, J., Pouplard-Barthelaix, A., Pennica, D., and Gascan, H.** (1997). Hepatocyte-derived cell lines express a functional receptor for cardiotrophin-1. *Eur Cytokine Netw* 8, 245-252.
199. **Rosolen, A., Nakanishi, M., Poplack, D. G., Cole, D., Quinones, R., Reaman, G., Trepel, J. B., Cotelingam, J. D., Sausville, E. A., Marti, G. E., and et al.** (1989). Expression of interleukin-2 receptor beta subunit in hematopoietic malignancies. *Blood* 73, 1968-1972.
200. **Rubin, L. A., Kurman, C. C., Fritz, M. E., Biddison, W. E., Boutin, B., Yarchoan, R., and Nelson, D. L.** (1985). Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro. *J Immunol* 135, 3172-3177.
201. **Rubin, L. A., Kurman, C. C., Fritz, M. E., Biddison, W. E., Boutin, B., Yarchoan, R., and Nelson, D. L.** (1985). Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro. *J Immunol* 135, 3172-3177.
202. **Rubin, L. A., and Nelson, D. L.** (1990). The soluble interleukin-2 receptor: biology, function, and clinical application. *Ann Intern Med* 113, 619-627.
203. **Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M.** (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, 1151-1164.
204. **Saleh, M. N., LeMaistre, C. F., Kuzel, T. M., Foss, F., Platanias, L. C., Schwartz, G., Ratain, M., Rook, A., Freytes, C. O., Craig, F., et al.** (1998). Antitumor activity of DAB389IL-2 fusion toxin in mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 39, 63-73.
205. **Salomon, B., Lenschow, D. J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A., and Bluestone, J. A.** (2000). B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12, 431-440.
206. **Sauter, B., Albert, M. L., Francisco, L., Larsson, M., Somersan, S., and Bhardwaj, N.** (2000). Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 191, 423-434.
207. **Schwartz, D. H., and Merigan, T. C.** (1990). Interleukin-2 in the treatment of HIV disease. *Biotherapy* 2, 119-136.
208. **Schwartz, R. H.** (1996). Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med* 184, 1-8.
209. **Scully, R., Qin, S., Cobbold, S., and Waldmann, H.** (1994). Mechanisms in CD4 antibody-mediated transplantation tolerance: kinetics of induction, antigen dependency and role of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 24, 2383-2392.
210. **Semenzato, G., Bambara, L. M., Biasi, D., Frigo, A., Vinante, F., Zuppini, B., Trentin, L., Feruglio, C., Chilosi, M., and Pizzolo, G.** (1988). Increased serum levels of soluble interleukin-2 receptor in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol* 8, 447-452.
211. **Shawver, L. K., Slamon, D., and Ullrich, A.** (2002). Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* 1, 117-123.
-

212. **Shawver, L. K., Slamon, D., and Ullrich, A.** (2002). Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* 1, 117-123.
213. **Sheu, B. C., Hsu, S. M., Ho, H. N., Lien, H. C., Huang, S. C., and Lin, R. H.** (2001). A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res* 61, 237-242.
214. **Shi, Y. F., Hill, M., Novak, A., Chen, Z. Q., Wang, R. X., Liew, C. C., and Mills, G. B.** (1997). Human hematopoietic cell express two forms of the cytokine receptor common gamma-chain (gamma c). *Cell Res* 7, 195-205.
215. **Shi, Y. X., Zhang, X. S., Liu, D. G., Li, Y. Q., Guan, Z. Z., and Jiang, W. Q.** (2004). [CD4+CD25+T regulatory cells in peripheral blood of B-NHL patients with or without chemotherapy]. *Ai Zheng* 23, 597-601.
216. **Shibuya, H., Yoneyama, M., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., and Taniguchi, T.** (1992). IL-2 and EGF receptors stimulate the hematopoietic cell cycle via different signaling pathways: demonstration of a novel role for c-myc. *Cell* 70, 57-67.
217. **Shield, C. F., Edwards, E. B., Davies, D. B., and Daily, O. P.** (1997). Antilymphocyte induction therapy in cadaver renal transplantation: a retrospective, multicenter United Network for Organ Sharing Study. *Transplantation* 63, 1257-1263.
218. **Shohat, M., Hodak, E., Sredni, B., Shohat, B., Sredni, D., and David, M.** (2001). Cytokine profile of patients with mycosis fungoides and the immunomodulatory effect of AS101. *Acta Derm Venereol* 81, 255-257.
219. **Siberil, S., Dutertre, C. A., Boix, C., and Teillaud, J. L.** (2005). [Therapeutic monoclonal antibodies: a little history, a lot of engineering, and... some clinical successes]. *Transfus Clin Biol* 12, 114-122.
220. **Siegel, J. P., Sharon, M., Smith, P. L., and Leonard, W. J.** (1987). The IL-2 receptor beta chain (p70): role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities. *Science* 238, 75-78.
221. **Sievers, E. L., Larson, R. A., Stadtmauer, E. A., Estey, E., Lowenberg, B., Dombret, H., Karanes, C., Theobald, M., Bennett, J. M., Sherman, M. L., et al.** (2001). Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol* 19, 3244-3254.
222. **Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., et al.** (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344, 783-792.
223. **Sloan-Lancaster, J., Steinberg, T. H., and Allen, P. M.** (1996). Selective activation of the calcium signaling pathway by altered peptide ligands. *J Exp Med* 184, 1525-1530.
224. **Smiley, S. T., Csizmadia, V., Gao, W., Turka, L. A., and Hancock, W. W.** (2000). Differential effects of cyclosporine A, methylprednisolone, mycophenolate, and rapamycin on CD154 induction and requirement for NFkappaB: implications for tolerance induction. *Transplantation* 70, 415-419.
225. **Smith, S. L., Bender, J. G., Maples, P. B., Unverzagt, K., Schilling, M., Lum, L., Williams, S., and Van Epps, D. E.** (1993). Expansion of neutrophil precursors and progenitors in suspension cultures of CD34+ cells enriched from human bone marrow. *Exp Hematol* 21, 870-877.
226. **Smyth, M. J., Ortaldo, J. R., Shinkai, Y., Yagita, H., Nakata, M., Okumura, K., and Young, H. A.** (1990). Interleukin 2 induction of pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8+ T cells. *J Exp Med* 171, 1269-1281.
227. **Stadler, R., Otte, H. G., Luger, T., Henz, B. M., Kuhl, P., Zwingers, T., and Sterry, W.** (1998). Prospective randomized multicenter clinical trial on the use of interferon -2a plus acitretin versus

- interferon -2a plus PUVA in patients with cutaneous T-cell lymphoma stages I and II. Blood 92, 3578-3581.
228. **Stein, R., Blumenthal, R., Sharkey, R. M., and Goldenberg, D. M.** (1994). Comparative biodistribution and radioimmunotherapy of monoclonal antibody RS7 and its F(ab')<sub>2</sub> in nude mice bearing human tumor xenografts. Cancer 73, 816-823.
229. **Stern, J. B., and Smith, K. A.** (1986). Interleukin-2 induction of T-cell G1 progression and c-myc expression. Science 233, 203-206.
230. **Stoldt, H. S., Aftab, F., Chinol, M., Paganelli, G., Luca, F., Testori, A., and Geraghty, J. G.** (1997). Pretargeting strategies for radio-immunoguided tumour localisation and therapy. Eur J Cancer 33, 186-192.
231. **Strauchen, J. A.** (1989). Interleukin receptors in lymphoid lesions. Relevance to diagnosis, biology, and therapy. Pathol Annu 24 Pt 2, 149-165.
232. **Suga, H., Honda, H., Naganuma, S., Yashuo, M., Suzuki, T., Teraoka, S., Agishi, T., and Ota, K.** (1990). A low CA<sup>++</sup> level in effluent as a risk factor for the peritonitis in CAPD patients. Adv Perit Dial 6, 102-105.
233. **Sykes, M.** (2001). Graft-Versus-Host Alloresponses to Treat Nonlymphohematopoietic Tumors: Is There a Solid Approach? J Immunother 24, 101-103.
234. **Symons, J. A., Wood, N. C., Di Giovine, F. S., and Duff, G. W.** (1988). Soluble IL-2 receptor in rheumatoid arthritis. Correlation with disease activity, IL-1 and IL-2 inhibition. J Immunol 141, 2612-2618.
235. **Syrigos, K. N., and Epenetos, A. A.** (1999). Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a review of the experimental and clinical considerations. Anticancer Res 19, 605-613.
236. **Szczzech, L. A., Berlin, J. A., Aradhye, S., Grossman, R. A., and Feldman, H. I.** (1997). Effect of anti-lymphocyte induction therapy on renal allograft survival: a meta-analysis. J Am Soc Nephrol 8, 1771-1777.
237. **Takeshita, T., Asao, H., Ohtani, K., Ishii, N., Kumaki, S., Tanaka, N., Munakata, H., Nakamura, M., and Sugamura, K.** (1992). Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor. Science 257, 379-382.
238. **Tanaka, N., Asao, H., Ohbo, K., Ishii, N., Takeshita, T., Nakamura, M., Sasaki, H., and Sugamura, K.** (1994). Physical association of JAK1 and JAK2 tyrosine kinases with the interleukin 2 receptor beta and gamma chains. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 7271-7275.
239. **Taniguchi, N., Miyawaki, T., and Yachie, A.** (1982). A monoclonal anti-tac antibody may interfere with receptor binding of interleukin 2. Lymphokine Res 1, 107-112.
240. **Taylor, P. A., Lees, C. J., and Blazar, B. R.** (2002). The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. Blood 99, 3493-3499.
241. **Tebib, J. G., Boughaba, H., Letroublon, M. C., Bienvenu, J., Noel, E., Armanet, P., Colson, F., Rouillet, A., and Bouvier, M.** (1991). Serum IL-2 level in rheumatoid arthritis: correlation with joint destruction and disease progression. Eur Cytokine Netw 2, 239-243.
242. **Timmermann, A., Kuster, A., Kurth, I., Heinrich, P. C., and Muller-Newen, G.** (2002). A functional role of the membrane-proximal extracellular domains of the signal transducer gp130 in heterodimerization with the leukemia inhibitory factor receptor. Eur J Biochem 269, 2716-2726.
243. **Tokano, Y., Murashima, A., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Okumura, K., and Hirose, S.** (1989). Relation between soluble interleukin 2 receptor and clinical findings in patients with systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis 48, 803-809.

244. **Tomizuka, K., Shinohara, T., Yoshida, H., Uejima, H., Ohguma, A., Tanaka, S., Sato, K., Oshimura, M., and Ishida, I.** (2000). Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 722-727.
245. **Treiger, B. F., Leonard, W. J., Svetlik, P., Rubin, L. A., Nelson, D. L., and Greene, W. C.** (1986). A secreted form of the human interleukin 2 receptor encoded by an "anchor minus" cDNA. *J Immunol* 136, 4099-4105.
246. **Trinchieri, G., Pflanz, S., and Kastelein, R. A.** (2003). The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 19, 641-644.
247. **Tsilivakos, V., Tsapis, A., Kakolyris, S., Iliakis, P., Perraki, M., and Georgoulas, V.** (1994). Characterization of interleukin 2 receptors on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 8, 1571-1578.
248. **Tsудо, M.** (1989). [Interleukin 2 receptor]. *Seikagaku* 61, 601-605.
249. **Uchiyama, T., Broder, S., and Waldmann, T. A.** (1981). A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac (+) cells. *J Immunol* 126, 1393-1397.
250. **Vaidyanathan, G., and Zalutsky, M. R.** (1996). Targeted therapy using alpha emitters. *Phys Med Biol* 41, 1915-1931.
251. **Van Parijs, L., Refaeli, Y., Lord, J. D., Nelson, B. H., Abbas, A. K., and Baltimore, D.** (1999). Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. *Immunity* 11, 281-288.
252. **VanBuskirk, A. M., Burlingham, W. J., Jankowska-Gan, E., Chin, T., Kusaka, S., Geissler, F., Pelletier, R. P., and Orosz, C. G.** (2000). Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest* 106, 145-155.
253. **Vincenti, F.** (1999). Daclizumab: novel biologic immunoprophylaxis for prevention of acute rejection in renal transplantation. *Transplant Proc* 31, 2206-2207.
254. **Wagner, D. K., York-Jolley, J., Malek, T. R., Berzofsky, J. A., and Nelson, D. L.** (1986). Antigen-specific murine T cell clones produce soluble interleukin 2 receptor on stimulation with specific antigens. *J Immunol* 137, 592-596.
255. **Waldmann, T. A., Goldman, C. K., Robb, R. J., Depper, J. M., Leonard, W. J., Sharrow, S. O., Bongiovanni, K. F., Korsmeyer, S. J., and Greene, W. C.** (1984). Expression of interleukin 2 receptors on activated human B cells. *J Exp Med* 160, 1450-1466.
256. **Waldmann, T. A.** (1991). The interleukin-2 receptor. *J Biol Chem* 266, 2681-2684.
257. **Waldmann, T. A., White, J. D., Goldman, C. K., Top, L., Grant, A., Bamford, R., Roessler, E., Horak, I. D., Zaknoen, S., Kasten-Sportes, C., and et al.** (1993). The interleukin-2 receptor: a target for monoclonal antibody treatment of human T-cell lymphotropic virus I-induced adult T-cell leukemia. *Blood* 82, 1701-1712.
258. **Waldmann, T. A., White, J. D., Carrasquillo, J. A., Reynolds, J. C., Paik, C. H., Gansow, O. A., Brechbiel, M. W., Jaffe, E. S., Fleisher, T. A., Goldman, C. K., et al.** (1995). Radioimmunotherapy of interleukin-2R alpha-expressing adult T-cell leukemia with Yttrium-90-labeled anti-Tac. *Blood* 86, 4063-4075.
259. **Waldmann, H., and Cobbold, S.** (2001). Regulating the immune response to transplants. a role for CD4+ regulatory cells? *Immunity* 14, 399-406.

- 
260. **Waldmann, T. A.** (2002). The IL-2/IL-15 receptor systems: targets for immunotherapy. J Clin Immunol 22, 51-56.
261. **Waters, C. A., Schimke, P. A., Snider, C. E., Itoh, K., Smith, K. A., Nichols, J. C., Strom, T. B., and Murphy, J. R.** (1990). Interleukin 2 receptor-targeted cytotoxicity. Receptor binding requirements for entry of a diphtheria toxin-related interleukin 2 fusion protein into cells. Eur J Immunol 20, 785-791.
262. **Weiden, P. L., Breitz, H. B., Press, O., Appelbaum, J. W., Bryan, J. K., Gaffigan, S., Stone, D., Axworthy, D., Fisher, D., and Reno, J.** (2000). Pretargeted radioimmunotherapy (PRIT) for treatment of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): initial phase I/II study results. Cancer Biother Radiopharm 15, 15-29.
263. **Weiner, L. M., and Adams, G. P.** (2000). New approaches to antibody therapy. Oncogene 19, 6144-6151.
264. **Weiss, L. M., Michie, S. A., Medeiros, L. J., Strickler, J. G., Garcia, C. F., and Warnke, R. A.** (1987). Expression of Tac antigen by non-Hodgkin's lymphomas. Am J Clin Pathol 88, 483-485.
265. **Wells, A. D., Li, X. C., Li, Y., Walsh, M. C., Zheng, X. X., Wu, Z., Nunez, G., Tang, A., Sayegh, M., Hancock, W. W., et al.** (1999). Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. Nat Med 5, 1303-1307.
266. **Wells, A. D., Li, X. C., Li, Y., Walsh, M. C., Zheng, X. X., Wu, Z., Nunez, G., Tang, A., Sayegh, M., Hancock, W. W., et al.** (1999). Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. Nat Med 5, 1303-1307.
267. **Wierda, W. G., Kipps, T. J., and Keating, M. J.** (2005). Novel immune-based treatment strategies for chronic lymphocytic leukemia. J Clin Oncol 23, 6325-6332.
268. **Willerford, D. M., Chen, J., Ferry, J. A., Davidson, L., Ma, A., and Alt, F. W.** (1995). Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. Immunity 3, 521-530.
269. **Williams, D. P., Snider, C. E., Strom, T. B., and Murphy, J. R.** (1990). Structure/function analysis of interleukin-2-toxin (DAB486-IL-2). Fragment B sequences required for the delivery of fragment A to the cytosol of target cells. J Biol Chem 265, 11885-11889.
270. **Williams, M. B., and Butcher, E. C.** (1997). Homing of naive and memory T lymphocyte subsets to Peyer's patches, lymph nodes, and spleen. J Immunol 159, 1746-1752.
271. **Wood, K. J., and Sakaguchi, S.** (2003). Regulatory T cells in transplantation tolerance. Nat Rev Immunol 3, 199-210.
272. **Wymann, M. P., and Pirola, L.** (1998). Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. Biochim Biophys Acta 1436, 127-150.
273. **Yagura, H., Tamaki, T., Furitsu, T., Tomiyama, Y., Nishiura, T., Tominaga, N., Katagiri, S., Yonezawa, T., and Tarui, S.** (1990). Demonstration of high-affinity interleukin-2 receptors on B-chronic lymphocytic leukemia cells: functional and structural characterization. Blut 60, 181-186.
274. **Yamada, Y., and Kamihira, S.** (1999). Pathological roles of interleukin-15 in adult T-cell leukemia. Leuk Lymphoma 35, 37-45.
275. **Yawata, H., Yasukawa, K., Natsuka, S., Murakami, M., Yamasaki, K., Hibi, M., Taga, T., and Kishimoto, T.** (1993). Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130. Embo J 12, 1705-1712.

276. **Yodoi, J., Tagaya, Y., Okada, M., Taniguchi, Y., Hirata, M., Naramura, M., and Maeda, M.** (1987). Interleukin-2 receptor-inducing factor(s) in adult T cell leukemia. Acta Haematol 78 Suppl 1, 56-63.
277. **Zalutsky, M. R., and Bigner, D. D.** (1996). Radioimmunotherapy with alpha-particle emitting radioimmunoconjugates. Acta Oncol 35, 373-379.
278. **Zhang, M., Yao, Z., Saga, T., Sakahara, H., Nakamoto, Y., Sato, N., Nakada, H., Yamashina, I., and Konishi, J.** (1998). Improved intratumoral penetration of radiolabeled streptavidin in intraperitoneal tumors pretargeted with biotinylated antibody. J Nucl Med 39, 30-33.
279. **Zhang, M., Yao, Z., Garmestani, K., Axworthy, D. B., Zhang, Z., Mallett, R. W., Theodore, L. J., Goldman, C. K., Brechbiel, M. W., Carrasquillo, J. A., and Waldmann, T. A.** (2002). Pretargeting radioimmunotherapy of a murine model of adult T-cell leukemia with the alpha-emitting radionuclide, bismuth 213. Blood 100, 208-216.
280. **Zhang, M., Yao, Z., Garmestani, K., Axworthy, D. B., Zhang, Z., Mallett, R. W., Theodore, L. J., Goldman, C. K., Brechbiel, M. W., Carrasquillo, J. A., and Waldmann, T. A.** (2002). Pretargeting radioimmunotherapy of a murine model of adult T-cell leukemia with the alpha-emitting radionuclide, bismuth 213. Blood 100, 208-216.

---

**UNIVERSITE DE NANTES**  
**FACULTE DE PHARMACIE**

**Année de la soutenance**  
**2006**

---

**Nom – Prénoms :** RUELLAN Anne-Lise, Marie

**Titre de la Thèse :** Ciblage du système Interleukine-2/récepteur : enjeux thérapeutiques et préventifs dans le rejet d'allogreffe et les hémopathies malignes

---

**Résumé de la thèse :**

Découvert il y a plus de 30 ans, l'IL-2 reste la cytokine la plus étudiée à l'heure actuelle. Il s'agit d'une cytokine majeure du système immunitaire, de part son rôle essentiel dans les réponses immunitaire dépendantes des lymphocytes T. Ses fonctions principales sont d'assurer l'expansion clonale des lymphocytes T régulateurs et cytotoxiques activés par l'antigène. Le rôle central de ces réponses dans les mécanismes de rejet de greffe allogénique a conduit au développement de stratégies de prévention du rejet en ciblant le système IL2 /récepteur à l'IL2 à l'aide d'agents pharmaceutiques interférant avec les signaux transduits par le récepteur ou plus directement en ciblant spécifiquement le récepteur à l'IL2 avec des anticorps monoclonaux ou avec la cytokine modifiée. Cette possibilité de a également permis, en oncologie, de développer des stratégies de ciblage des leucémies T. Après une partie introductive sur la physiologie des lymphocytes T, la structure et la fonction du système IL-2/récepteur, une étude bibliographique présente les développements expérimentaux et thérapeutiques du ciblage du récepteur à l'IL2 dans la prévention du rejet de greffe et dans le traitement des hémopathies malignes (leucémies T ).

---

**MOTS CLES :**

-INTERLEUKINE 2 /-REPOSE ALLOGENIQUE /-TOLERANCE / LYMPHOCYTES T / -CD25  
-HEMOPATHIES MALIGNES

---

**JURY**

**PRESIDENT :** Monsieur Alain FAIVRE-CHAUVET, Maître de Conférence de Biophysique  
Faculté de Pharmacie de Nantes

**ASSESEURS :** Monsieur François DAVODEAU, chargé de recherche INSERM  
Institut de Biologie - Nantes  
Madame Françoise NAZIH, Maître de Conférence de Biochimie  
Faculté de Pharmacie de Nantes  
Monsieur Patrick PARERE, Docteur en Pharmacie  
Rue de la Blordière-Rezé