

Échappement et tolérance des tumeurs à l'apoptose

**Pierre-Yves Dietrich
Paul R. Walker**

P.Y. Dietrich: Division d'oncologie, Laboratoire d'immunologie des tumeurs, Hôpital universitaire, 24, rue Micheli-du-Crest 1211 Genève 14, Suisse. P.R. Walker: Division d'oncologie et département de neurochirurgie, Laboratoire d'immunologie des tumeurs, Hôpital universitaire, 24, rue Micheli-du-Crest 1211 Genève 14, Suisse.

► La réponse immunitaire antitumorale nécessite une parfaite orchestration entre de multiples interactions impliquant cellules tumorales, lymphocytes et cellules présentatrices d'antigènes. Les nombreuses anomalies pouvant survenir dans ces dialogues complexes au sein d'un environnement défavorable peuvent expliquer l'absence de déclenchement de la réponse (ignorance) ou son insuffisance (tolérance et échappement). La cellule tumorale peut également se défendre contre les mécanismes effecteurs du système immunitaire grâce à une série de subterfuges lui permettant d'éviter l'apoptose. Le développement de l'immunothérapie anticancéreuse représente donc un double défi, visant à induire une réponse efficace tout en diminuant la protection de la cellule tumorale contre la mort. ◀

Dans un organisme vivant, les cellules normales qui se divisent ont également la capacité intrinsèque de déclencher leur propre suicide selon un programme complexe appelé mort cellulaire programmée ou apoptose. Ce processus biologique permet le renouvellement de ces cellules en évitant leur accumulation. Ainsi, on estime que plusieurs milliards de cellules meurent chaque jour par apoptose, afin de laisser la place à de nouvelles cellules fonctionnellement plus compétentes. Les voies qui mènent à l'apoptose sont complexes et variées et ont été présentées par d'autres auteurs de ce numéro. Des événements très divers peuvent stimuler la mort cellulaire, comme par exemple la déplétion en facteurs de croissance, la perte de contact entre les cellules, certains produits d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de cancer, des agents oxydants, l'irradiation, certains traitements hormonaux ou cytotoxiques (chimiothérapie) ou des cellules de notre système de défense, le système immunitaire. Il est aisé d'imaginer que l'inhibition de l'apoptose puisse favoriser le développement de cancers en augmentant la survie cellu-

laire et en permettant ainsi l'accumulation des « accidents » génétiques impliqués dans la transformation maligne. Dans cet article, nous nous proposons de discuter quelques-uns des mécanismes employés par les cellules tumorales pour échapper à l'apoptose, en nous concentrant particulièrement sur les subterfuges utilisés pour contrer les effets relayés par les cellules du système immunitaire.

Existence et principes de la réponse immunitaire antitumorale

Un nombre croissant d'arguments cliniques et biologiques suggèrent qu'il existe un contrôle du développement et de la croissance tumorale par le système immunitaire. L'incidence de certains cancers est augmentée chez les patients immunodéprimés et la plupart des tumeurs sont infiltrées par des lymphocytes. Dans certains cas de régression spontanée de mélanomes (tumeurs malignes de la peau), malheureusement très rares, il a été démontré que les lymphocytes infiltrants pouvaient tuer spécifiquement les cellules tumorales en reconnaissant des antigènes exprimés sélectivement par ces dernières [1, 2]. Dans

un nombre modeste de cas, l'administration d'interleukine-2 induit, de façon reproductible, la régression de métastases de mélanome ou de cancer du rein (*m/s* 1998, n° 14, p. 655). Les arguments cliniques les plus convaincants découlent cependant de l'action antitumorale des lymphocytes dans le cadre de la transplantation médullaire. En effet, les hématologues ont observé une augmentation très significative du taux de rechute de leucémies après transplantation d'un greffon médullaire déplété en lymphocytes T, mettant en évidence l'effet GVL (*graft versus leukemia*). Sur la base de cette observation, les lymphocytes T du donneur de moelle osseuse sont actuellement utilisés comme des « cellules antitumorales » en les administrant, avec un succès thérapeutique impressionnant, à des patients présentant une rechute de leucémie myéloïde chronique après allo-transplantation ou un lymphome post-transplantation lié au virus EBV (*Epstein-Barr virus*) [3]. Le rôle capital des lymphocytes T (en particulier les CD8⁺) comme effecteurs de la réponse anti-tumorale a également été mis en évidence dans des modèles animaux [4], dans lesquels la régression et la prévention des lésions tumorales sont le plus souvent dépendantes de ce type de cellules.

Malgré ces résultats, les mécanismes précis par lesquels le système immunitaire en général et les lymphocytes T en particulier peuvent protéger l'organisme contre le développement ou la progression d'une tumeur restent partiellement hypothétiques (*figure 1*). Théoriquement, une cellule tumorale peut avoir la capacité intrinsèque d'apprêter un antigène et de le présenter en association avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH, appelé HLA chez l'homme) de classe I (HLA-A, -B -C) ou II (HLA-DR, -DQ, -DP). Ces complexes HLA-peptides peuvent ainsi être reconnus par le récepteur antigénique (TCR ou *T cell receptor*) des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ présents au site de la tumeur. Cependant, ce signal spécifique de l'antigène, fourni par l'interaction entre le complexe CMH-peptide et le TCR, est en général insuffisant pour induire l'expansion et l'activation fonctionnelle des lymphocytes T. Un second

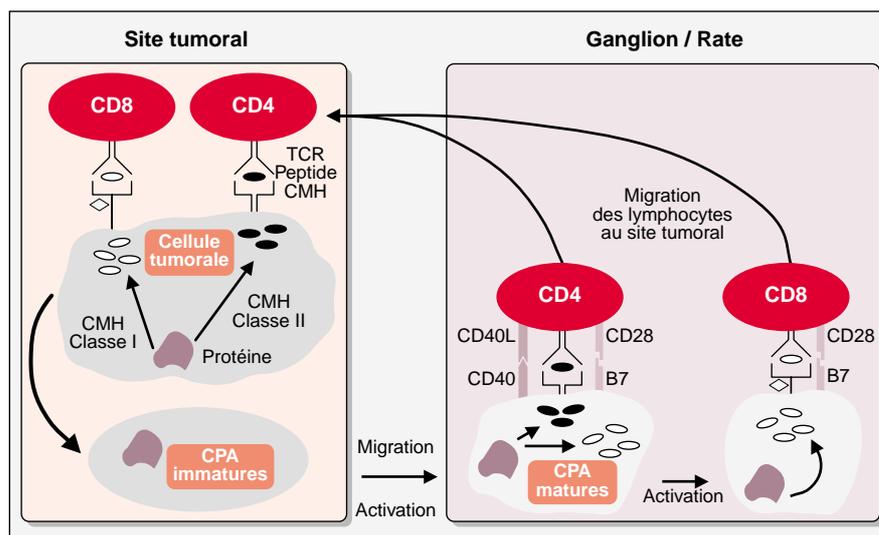


Figure 1. Modèle de la réponse immunitaire antitumorale spécifique. L'obtention d'une réponse antitumorale dépend d'une collaboration entre cellules tumorales et cellules présentatrices de l'antigène (CPA), et d'événements non seulement au site de la tumeur mais aussi dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions). Comme la plupart des cellules d'un organisme vivant, les cellules tumorales peuvent présenter des antigènes aux lymphocytes T. Les protéines endogènes ou exogènes sont « clivées » en peptides dont certains vont s'associer aux molécules du CMH de classe I et II selon un processus d'apprêtement de l'antigène. Celui-ci permet aux cellules tumorales d'être reconnues par les lymphocytes T mais est probablement insuffisant pour déclencher une réponse immunitaire spécifique efficace. Spécialisées dans la présentation de l'antigène, les CPA viennent à la rescousse des cellules tumorales dont ils vont présenter les peptides antigéniques dans les organes lymphoïdes secondaires. Ces événements complexes permettent probablement l'expansion de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques qui vont migrer à leur tour vers leurs cibles tumorales.

signal, non spécifique, est nécessaire afin d'éviter l'anergie des lymphocytes. Il est généralement délivré par les molécules de co-stimulation (par exemple, les membres de la famille B7) dont sont habituellement dépourvues les cellules tumorales. Le déclenchement d'une réponse efficace ne peut donc reposer sur les cellules tumorales elles-mêmes. Celles-ci sont probablement aidées dans cette tâche par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA), comme les monocytes ou les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques phagocytent les cellules tumorales (ou leurs fragments), puis probablement migrent dans les organes lymphoïdes secondaires. Durant cette migration, elles perdent leurs capacités de phagocytose et acquièrent des aptitudes à stimuler les lymphocytes T, grâce entre autres à des molécules de co-stimulation fortement exprimées. Récemment, il a été démontré que les

lymphocytes CD4⁺ jouent un rôle important dans l'activation des CPA via l'interaction entre CD40L et CD40 (*voir figure 1*). Cette interaction facilite non seulement l'expansion des lymphocytes CD8⁺, mais surtout le maintien de leurs fonctions cytolytiques [5].

Les lymphocytes T apparaissent donc comme les cellules antitumorales idéales, puisqu'ils possèdent une spécificité antigénique très fine, qu'ils représentent la mémoire du système immunitaire et qu'ils sont armés de molécules capables d'induire la lyse des cellules cibles. La description des mécanismes cytolytiques des cellules immunitaires constitue un sujet en constante et rapide évolution (pour revue, *voir* [6]). Nous rappellerons seulement les rôles prédominants joués par le système perforine-granzyme et par l'interaction entre le ligand Fas (FasL) et Fas [7] (*m/s* 1995, n° 11, p. 99) (*figure 2*). Il est important

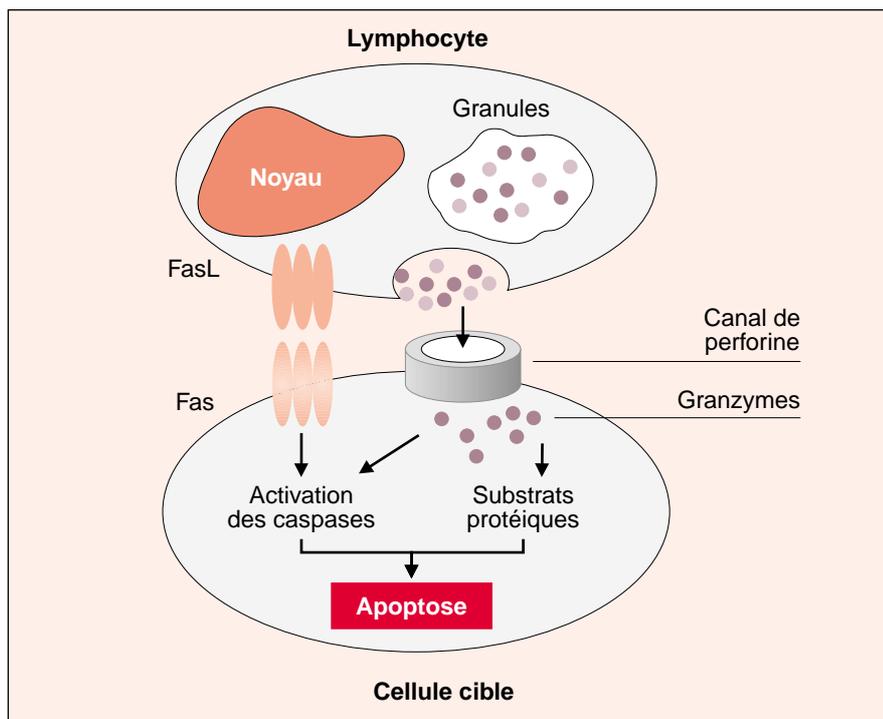


Figure 2. **Mécanismes effecteurs des lymphocytes.** L'apoptose des cellules cibles peut être induite par un contact intercellulaire (liaison FasL-Fas) ou par l'activité protéolytique des granzymes. Les granzymes sont une famille d'enzymes protéolytiques contenus dans des granules cytoplasmiques; ils pénètrent les cellules cibles à travers les canaux transmembranaires formés par des molécules de perforines polymérisées. Leur activité enzymatique leur permet de cliver de nombreux substrats protéiques, dont certaines pro-caspases.

de mentionner que les granzymes ont également la capacité de cliver des substrats cellulaires au niveau des acides aspartiques et, de ce fait, de couper les pro-caspases et certaines protéines nucléaires essentielles à la vie de la cellule [6]. Ce double système (perforine-granzyme et Fas) permet donc aux lymphocytes de provoquer l'apoptose des cellules tumorales ou des cellules infectées par des virus.

On peut se demander comment une cellule tumorale peut échapper à cette surveillance hautement spécialisée et apparemment efficace. A l'inverse, la complexité du système peut le rendre particulièrement vulnérable, et une multitude de mécanismes a été décrite pouvant expliquer les déficiences de la réponse immunitaire antitumorale. Schématiquement, nous présenterons séparément les mécanismes qui inhibent ou diminuent le déclenchement de la réponse immunitaire de ceux qui

empêchent l'action des effecteurs cytotolytiques en protégeant les cellules tumorales de l'apoptose.

Comment la réponse immunitaire antitumorale peut-elle être insuffisante ou avortée ?

Les multiples mécanismes pouvant entraver le déclenchement d'une réponse immunitaire peuvent être déduits du schéma de la figure 1. Nombre d'entre eux sont hypothétiques et leur importance *in vivo* n'est pas toujours établie. Nous ne ferons que mentionner ceux qui nous paraissent les plus importants. Une condition *sine qua non* à la reconnaissance des tumeurs est qu'elles expriment des molécules du CMH. Or plusieurs types d'altérations ont été mises en évidence à la fois *in vitro* dans des lignées de cellules tumorales et *in vivo* [8]. La perte

d'expression des molécules du CMH est parfois complète; elle peut par exemple être due à une absence des molécules TAP [9]. Ces molécules participent activement au transport des peptides du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique où les peptides peuvent s'associer aux molécules de CMH. Cette adjonction de peptides est essentielle, car elle permet non seulement de délivrer un message spécifique de l'antigène, mais aussi de stabiliser les complexes CMH-peptides à la surface des cellules, une molécule CMH « vide » de peptide étant instable. Les altérations de l'expression des molécules du CMH sont cependant souvent plus subtiles, avec une perte de l'haplotype, du locus ou même d'un simple allèle [8].

Comme cela a été démontré dans de nombreux modèles animaux, l'un des éléments-clés du déclenchement d'une réponse immunitaire est constitué par les molécules de co-stimulation, dont sont en général dépourvues les cellules tumorales. Les CPA professionnelles jouent un rôle prépondérant dans ce phénomène de co-stimulation. Cependant, si ces cellules sont bien identifiées dans certains organes (il s'agit par exemple des cellules de Langerhans dans la peau), elles restent mal caractérisées dans d'autres (ainsi pour les cellules microgliales dans le cerveau). De plus, certains résultats suggèrent que les cellules dendritiques présentes au site de la tumeur peuvent être hypofonctionnelles [10]. Enfin, il est maintenant établi que la co-stimulation, en raison de son importance, est un phénomène finement contrôlé et que certaines molécules induisent surtout des signaux d'inactivation (comme dans le cas du CTLA-4). L'ensemble de ces observations constitue la base d'études cliniques visant à renforcer ce second signal d'activation, soit en transfectant les cellules tumorales avec les gènes codant pour la famille des molécules B7, soit en immunisant les patients avec des cellules dendritiques chargées de peptides ou de lysats tumoraux [11].

Une autre cause pouvant expliquer le « silence » de la réponse immunitaire est l'absence d'antigènes de tumeur. Cette hypothèse est actuellement peu probable, si l'on considère la quantité impressionnante de nouveaux anti-

gènes rapportés dans la littérature [12]. Cependant, la nature de ces antigènes, leur taux d'expression, le type de CPA impliqués dans leur présentation et le micro-environnement dans lequel ils se trouvent peuvent profondément influencer la réponse immunitaire antitumorale. Il est par exemple bien établi que nombre de tumeurs expriment des antigènes fœtaux (dont l'expression est réprimée dans les cellules normales adultes) envers lesquels une tolérance a pu être établie tôt au cours de la vie. De même, certains antigènes de tumeur sont en fait des protéines du soi (tels que Melan-A, gp100 et la tyrosinase dans le mélanome ou la PSA dans le cancer de la prostate). Si l'expression de ce type d'antigènes ne s'accompagne pas de signaux de danger pour l'hôte, il est probable que le stimulus ne sera pas suffisant pour induire une rupture de tolérance. Le taux d'expression pourrait alors être un paramètre important impliquant qu'un minimum de complexes CMH-peptides soit nécessaire pour obtenir la reconnaissance et la lyse des cellules tumorales par les lymphocytes cytotoxiques spécifiques [13].

La nature des CPA présentes majoritairement au site de la tumeur représente probablement un autre paramètre important. Il est en effet possible d'imaginer que différentes CPA entrent en compétition pour la phagocytose des cellules tumorales vivantes ou apoptotiques. Ainsi, si une réponse immunitaire efficace peut être obtenue avec des cellules dendritiques chargées avec des peptides ou des corps apoptotiques [14-16], le rôle des macrophages pourrait être différent. Ces cellules tendent en effet, après phagocytose de cellules apoptotiques, à produire des cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF- β) afin de prévenir l'inflammation. Ainsi, l'élimination insuffisante de cellules apoptotiques est probablement une cause importante du développement de phénomènes auto-immuns et d'inflammation en cas de lupus érythémateux disséminé [17]. Or, les macrophages ont une grande capacité de phagocytose et sont probablement plus nombreux que les cellules dendritiques dans les lésions tumorales. Il est donc possible d'émettre l'hypothèse que, du moins dans certains organes, les cellules

dendritiques sont recrutées dans les tumeurs seulement lorsque la capacité phagocytaire des macrophages est dépassée. Cette hypothèse pourrait expliquer qu'une quantité minimale de cellules tumorales apoptotiques semble nécessaire pour le déclenchement d'une réponse efficace dans certains modèles où ce paramètre est mesuré directement [16]. Cette distinction entre macrophages et cellules dendritiques est certainement trop simpliste et il est probable que certaines cellules dendritiques (grâce à leur hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle) puissent également jouer un rôle modérateur. L'ensemble de ces observations pourrait expliquer comment certaines tumeurs, malgré la présence d'antigènes bien définis, peuvent être ignorées par le système immunitaire [18].

Le déclenchement d'une réponse immunitaire peut aussi être sérieusement ralenti par des facteurs solubles produits dans le micro-environnement tumoral. Cette question a été surtout étudiée en utilisant le modèle des gliomes (qui sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes, et qui dérivent des astrocytes). C'est en effet au cours de l'analyse des propriétés du surnageant de culture des cellules gliomateuses qu'a été identifié le TGF- β . Par la suite, d'autres travaux ont montré que ces cellules tumorales produisent fréquemment la forme active du TGF- β 2 qui, parmi d'autres effets immunosuppresseurs, a la capacité de diminuer l'expression des molécules du CMH de classe II et la synthèse de la perforine et des granzymes [19]. D'autres facteurs, produits par les cellules tumorales, les cellules stromales ou les cellules immunitaires infiltrantes peuvent contribuer à inhiber une réponse immunitaire. Parmi ceux-ci, on peut citer l'IL-10, les prostaglandines ou encore les gangliosides membranaires [20].

Inhibition de l'apoptose induite par les lymphocytes

Une fois amorcée, la réponse immunitaire doit pouvoir se développer en dépit de tous les obstacles créés par la cellule tumorale. Il est encore difficile d'évaluer l'importance relative de chacun des mécanismes décrits ci-

dessous. Par souci de clarté, nous avons donc choisi arbitrairement de présenter les subterfuges utilisés par la cellule tumorale en partant de la surface cellulaire (figure 3).

Expression du ligand Fas (FasL)

Nous avons vu que FasL, membre de la famille du TNF, est utilisé comme molécule effectrice par les lymphocytes cytotoxiques afin d'induire l'apoptose des cellules cibles Fas positives (figure 2). Par ailleurs, le système FasL/Fas joue un rôle capital dans l'arrêt des réponses immunes en induisant la mort des lymphocytes mûrs qui se sont multipliés à la suite d'une stimulation antigénique (par exemple une infection virale bénigne). Plus récemment, il a été rapporté que l'expression de FasL n'était pas restreinte aux lymphocytes mais pouvait aussi s'observer sur certains tissus ou organes dits « immuno-privilegiés » comme la cornée, le placenta ou le testicule, leur permettant d'induire l'apoptose des cellules inflammatoires exprimant Fas [21-24]. Ainsi, l'expression de FasL est certainement une des raisons pour lesquelles le rejet de greffe de cornée est relativement rare même lorsque les greffes ne sont pas histocompatibles.

A la suite de ces observations, plusieurs groupes de recherche ont émis l'hypothèse selon laquelle les tumeurs pouvaient utiliser cet artifice pour déjouer le système immunitaire. Si l'expression de FasL par les tumeurs hématopoïétiques pouvait être attendue, plus surprenante a été celle par des tumeurs solides aussi variées que le mélanome [25], le cancer du côlon [26], les hépatocarcinomes [27] ou encore les gliomes [28]. Comme pour les tissus ou sites immunoprivilégiés, l'expression de FasL par les cellules tumorales leur confère la possibilité de tuer les lymphocytes T et NK, les monocytes ou les neutrophiles exprimant Fas. Nous avons en effet démontré que des lignées de lymphocytes CD4 et CD8 dérivés des lymphocytes infiltrant la tumeur pouvaient être tués *in vitro* par les cellules gliomateuses autologues *via* une interaction entre FasL et Fas [29].

Cependant, les conséquences *in vivo* de l'expression de FasL par les cel-

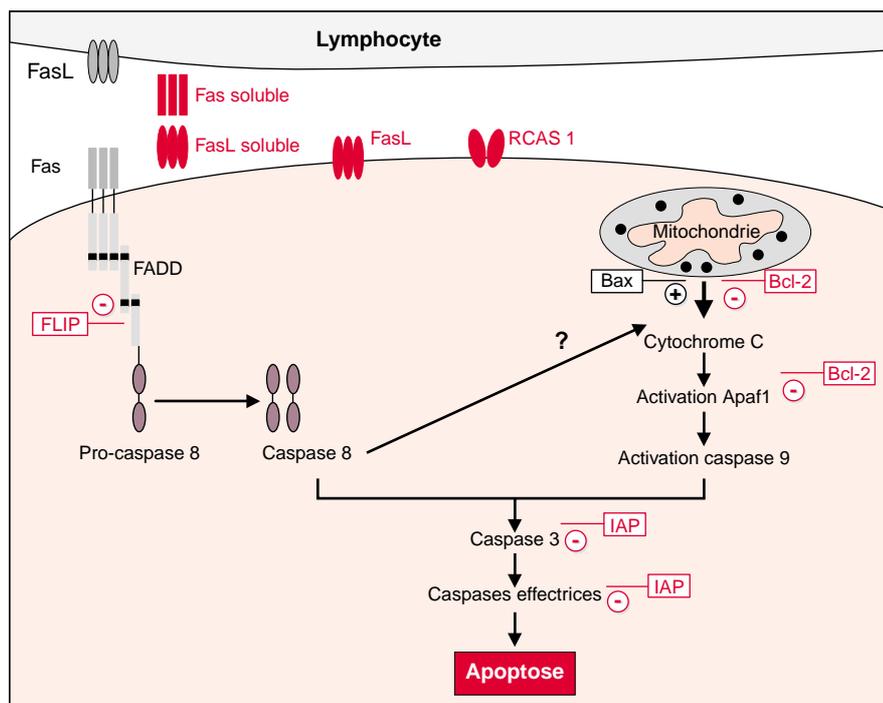


Figure 3. Modèle simplifié des principales voies d'apoptose et sites d'action des mécanismes protecteurs. La liaison entre Fas et son ligand induit le recrutement d'une protéine adaptatrice FADD grâce à l'interaction de leurs domaines de mort (DED, death effector domain, indiqué par un carré noir). Cet appariement entre DED est également à la base de la liaison entre FADD et la pro-caspase 8 qui est ainsi activée et induit à son tour la cascade d'activation des autres caspases [60]. En parallèle, les mitochondries sont la cible de plusieurs facteurs provoquant l'apoptose comme certaines drogues anticancéreuses, les oxydants, la protéine Bax ou encore certaines caspases. Ces différents stimulus induisent la libération du cytochrome c qui forme un complexe actif par sa liaison avec apaf-1. Ce complexe se lie à son tour à la pro-caspase-9, entraînant son activation par autocatalyse. Les deux voies décrites sur ce schéma très simplifié se rejoignent au niveau de l'activation de la caspase-3. Les principaux inhibiteurs et leur site d'action sont indiqués en rouge.

lules tumorales restent à éclaircir. En effet, des résultats contradictoires (croissance tumorale *versus* rejet) ont été rapportés dans différents modèles testant la réponse immunitaire contre des tumeurs exprimant FasL spontanément ou après transfection [25, 30-33]. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour tenter de comprendre ces contradictions [34]. En premier lieu, il est maintenant clair que la stimulation de Fas n'induit pas seulement l'apoptose mais aussi parfois la prolifération et la libération de cytokines comme l'IL-8. Cela pourrait contribuer au recrutement important de neutrophiles au site des tumeurs FasL⁺, neutrophiles qui visiblement jouent un rôle capital dans le rejet de ces tumeurs. Par ailleurs, le niveau d'expression de FasL et la libération

ou non d'une forme soluble sont des facteurs additionnels dont il faut tenir compte. En effet, le FasL soluble inhibe l'action pro-apoptotique du FasL membranaire [35-37]. Ces paramètres n'ont pas été caractérisés dans les modèles animaux évoqués ci-dessus. Enfin, le sort d'une tumeur FasL⁺ face à une réponse immunitaire est certainement influencée par le micro-environnement dans lequel elle se développe. Ainsi, un cancer colique FasL⁺ est rejeté lors d'une implantation sous-cutanée, alors qu'il ne l'est pas en cas d'implantation dans l'espace intra-oculaire [33]. Dans ce modèle, cette différence radicale est la conséquence directe de la sécrétion de TGF- β au niveau de l'œil, permettant à FasL de collaborer avec cette cytokine immunosuppressive.

Libération de FasL soluble

L'expression de FasL à la membrane est transitoire ; elle est fortement influencée par des métalloprotéinases clivant le FasL membranaire en FasL soluble. Ces deux formes biochimiques possèdent des fonctions opposées. En effet, le FasL soluble est non seulement dépourvu de propriétés pro-apoptotiques mais il inhibe en outre l'apoptose lymphocytaire induite par le FasL membranaire [35-37]. Si cette dualité fonctionnelle semble importante dans l'homéostasie lymphocytaire, son rôle dans la réponse immune antitumorale reste inconnu.

Expression de RCAS1

De façon analogue à FasL, une autre molécule transmembranaire (RCAS1 ou *receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells*) pourrait être impliquée dans l'inhibition de la réponse immunitaire. C'est du moins l'hypothèse émise récemment dans un travail mettant en évidence l'expression de cette protéine sous forme d'homodimères, principalement dans des cancers touchant le système reproducteur féminin (utérus et ovaires) [38]. Le récepteur (non identifié) de cette protéine est exprimé par les cellules hématopoïétiques et les lymphocytes. Il est cependant important de noter que RCAS1 soluble ou recombinant ne tue pas les lymphocytes au repos mais empêche leur activation par les mitogènes, et qu'aucune information n'existe concernant l'importance de cette molécule sur la réponse immunitaire *in vivo*.

Récepteurs Fas solubles

L'inhibition de l'apoptose peut avoir lieu au niveau du récepteur Fas lui-même par le biais de plusieurs mécanismes : de simples mutations [39], une internalisation avec destruction dans les lysosomes dans des cellules infectées par un adénovirus [40], ou encore une inhibition de l'expression par les oncogènes Ras [41, 42]. Un autre mécanisme implique la présence de récepteurs Fas solubles capables d'empêcher des lymphocytes FasL⁺ d'atteindre leur cible cellulaire Fas⁺. Cela semble être le cas

d'un récepteur appelé DcR3 qui possède la partie extracellulaire de Fas sous forme de 4 domaines riches en cystéine mais qui est dépourvu de région transmembranaire. Son affinité pour FasL semble équivalente à celle de Fas, ce qui lui permet théoriquement de piéger les lymphocytes T et NK en bloquant un de leurs mécanismes cytotoxiques [43]. L'expression du transcrite de DcR3 a été démontré dans une série de cancers du côlon et des bronches, mais la signification de cette observation *in vivo* reste une question ouverte.

Surexpression de FLIP

La mort cellulaire peut donc être finement réglée par des facteurs solubles et des mécanismes agissant par contact intercellulaire direct, mais aussi par l'intermédiaire de protéines cytoplasmiques. Dans la cascade intracellulaire de l'apoptose induite par Fas, les premiers inhibiteurs sont les membres de la famille ADED (pour *anti-apoptotic death effector domain*), dont le représentant le plus étudié est FLIP (*FADD-like IL1 β -converting enzyme [FLICE] / caspase-8-inhibitory proteins*). FLIP a tout d'abord été isolé dans des virus de la famille herpès [44], où il confère aux cellules infectées une résistance à l'apoptose. C'est le cas par exemple des tumeurs associées à l'herpès virus de type 8 comme le sarcome de Kaposi ou certains lymphomes associés au SIDA. FLIP a également été mis en évidence dans des cellules humaines, et inhibe l'apoptose grâce à son homologie avec la pro-caspase-8. En effet, FLIP possède deux domaines DED lui permettant de se lier aux DED (*death effector domain*) des molécules adaptatrices (par exemple FADD sous Fas) et ainsi d'empêcher l'interaction entre FADD et la pro-caspase-8 (*figure 3*). Par son mode d'action, FLIP bloque non seulement l'effet pro-apoptotique induit par la stimulation de Fas, mais aussi celui déclenché par d'autres membres de la famille du récepteur TNF (TNF-R1, TRAMP, TRAIL-R). Thome *et al.* ont observé une expression élevée de cette molécule dans les mélanomes [44], ce qui a conduit à l'hypothèse selon laquelle FLIP pouvait aider les cellules tumorales à échapper au contrôle du système

immunitaire. Très récemment, l'importance de cette molécule a été confirmée par deux équipes indépendantes étudiant le rôle de FLIP sur la réponse anti-tumorale *in vivo* (*m/s 1999, n° 15, p. 1468*). Ces deux groupes ont étudié le comportement de tumeurs transfectées avec le gène codant pour le FLIP viral [45] ou cellulaire [46]. Ils ont observé que les cellules tumorales FLIP⁺, comparées avec les mêmes cellules tumorales transfectées avec un vecteur vide, avaient un avantage de croissance très significatif lorsqu'elles sont injectées chez des souris immunocompétentes syngéniques ou semi-allogéniques. En revanche, cette différence de comportement était totalement abolie lorsque l'injection était faite chez des souris SCID, suggérant fortement que les lymphocytes T sont capables d'induire le rejet des cellules tumorales FLIP – chez les souris immunocompétentes. Ces travaux démontrent que FLIP joue un rôle important *in vivo* dans l'inhibition de la réponse immunitaire spécifique. Ils suggèrent également que le système FasL/Fas est un mécanisme effecteur important en cas de réponse anti-tumorale. En effet, *in vitro*, FLIP n'empêche pas la lyse induite par le système perforine/granzyme et il est peu probable que cela soit différent *in vivo*. Comment expliquer alors l'effet de FLIP sur la réponse antitumorale *in vivo*? Il se peut que l'affinité et l'avidité des interactions entre molécule du CMH, peptide et TCR soient relativement faibles en cas de présentation d'antigènes de tumeur. Cela pourrait influencer le type d'effecteurs utilisés par les lymphocytes, comme des travaux récents le suggèrent en montrant le rôle prédominant de Fas comme mécanisme effecteur par les lymphocytes cytotoxiques reconnaissant des peptides agonistes partiels [47, 48].

IAP et survivine

Identifiés initialement dans les baculovirus, les protéines de la famille IAP (*inhibitor of apoptosis*) sont caractérisés par la présence d'un ou de plusieurs domaines de 70 acides aminés appelés BIR (pour *baculoviral IAP repeat*). Leur présence chez toutes les espèces (insectes, vers, souris, hommes) souligne leur importance

dans la régulation de l'apoptose [49]. Ces protéines inhibent principalement les caspases -3, -7, -9 qui interviennent dans la partie distale de la cascade. Les IAP peuvent contrôler l'apoptose induite par les stimulus agissant sur Fas et les mitochondries (*figure 3*). Bien que 6 IAP aient été identifiées dans les cellules de mammifères, leur rôle dans les cellules cancéreuses est encore mal connu.

Un grand intérêt a récemment porté sur l'une de ces 6 IAP, appelée survivine. Cette protéine, fortement exprimée durant la vie fœtale, n'est pratiquement pas détectable dans les cellules normales chez l'adulte. En revanche, la survivine est fortement exprimée dans des tumeurs originaires de différents organes (poumons, sein, pancréas, prostate, côlon) [50], et pas dans les cellules stromales ou normales adjacentes [51]. L'expression dans les cellules tumorales est cependant hétérogène et concerne surtout les tumeurs ayant un taux de prolifération élevé. Ces observations peuvent s'expliquer par l'augmentation d'expression de la survivine dans les cellules en phase G2/M [52], comme si, durant cette phase, les cellules se protégeaient ainsi contre l'apoptose. Il s'agit là d'une indication supplémentaire montrant l'interdépendance de deux systèmes biologiques, le cycle cellulaire et la mort programmée. Dans les années à venir, il y a fort à parier que le rôle des IAP dans l'inhibition de l'apoptose des cellules tumorales sera caractérisé et permettra, compte tenu de leur site d'action très distal dans la cellule, d'envisager des perspectives thérapeutiques intéressantes. Dans un travail préalable, il a récemment été rapporté que des molécules antisens contre la survivine pouvaient sensibiliser des lignées tumorales à la chimiothérapie et induire leur apoptose [51].

Les membres de la famille Bcl-2

Le gène *Bcl-2* a été initialement identifié comme un proto-oncogène dans des lymphomes folliculaires. Dans ces cellules, une translocation spécifique t(14;18) induit l'augmentation de l'expression de Bcl-2 et une résistance importante à l'apoptose. Cette découverte a été le détonateur d'une série de travaux qui ont permis la

caractérisation d'une famille de protéines (la famille Bcl-2) ayant un rôle fondamental dans la régulation de la vie et de la mort cellulaire [53, 54]. Schématiquement, on peut classer les protéines de la famille Bcl-2 en deux catégories : celles qui inhibent l'apoptose (ex. : Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1...) et celles qui la stimulent (ex. : Bax, Bak, Bid, Bik). La décortication des modes et des sites d'action de ces protéines est en plein essor. Ainsi, les protéines inductrices peuvent favoriser la libération de cytochrome c par les mitochondries (figure 3) ou inhiber la fonction des protéines inhibitrices comme Bcl-2 par hétérodimérisation. La protéine Bcl-2 agirait quant à elle principalement en bloquant la libération de cytochrome c et en empêchant l'activation de la caspase-9 par le complexe cytochrome-c/apaf-1 (figure 3). Le rôle de cette famille dans la résistance à l'apoptose induite par le système immunitaire n'est pas clairement défini. En effet, les effecteurs lymphocytaires (granzymes, Fas) semblent agir directement sur les caspases mais peu (ou pas) sur les mitochondries. De plus, on considère habituellement que la voie mitochondriale est indépendante de la cascade d'activation dépendante de Fas. Cependant, comme indiqué sur la figure 3, certaines caspases pourraient stimuler la libération de cytochrome c, et l'apoptose induite par Fas peut être bloquée par Bcl-2, du moins dans certaines cellules [55]. Il n'est donc pas exclu que la surexpression de Bcl-2 observée dans de nombreuses tumeurs (lymphomes, poumons, seins) [56, 57] ou l'inactivation du gène *Bax* [58] puissent contribuer à bloquer l'action du système immunitaire. Cependant, la famille Bcl-2 semble surtout être impliquée dans la résistance aux thérapies favorisant des dégâts mitochondriaux (irradiation, molécules anticancéreuses). La possibilité de diminuer l'expression des protéines inhibitrices par des oligonucléotides antisens devrait permettre de sensibiliser les cellules tumorales aux traitements conventionnels [59].

Conclusions

Grâce aux progrès réalisés en immunologie fondamentale, en biologie cellulaire et moléculaire, ainsi qu'au déve-

loppement de nouvelles technologies, l'immunothérapie anticancéreuse apparaît aujourd'hui comme un réel espoir pour le traitement des cancers. La cellule tumorale a cependant appris à se défendre en utilisant de nombreux subterfuges empruntés aux mécanismes réglant la vie et la mort cellulaire physiologique. Le défi sera donc double : amplifier une réponse antitumorale préexistante (ou l'induire), tout en agissant sur les mécanismes s'opposant à l'apoptose des cellules tumorales. Pour atteindre ce but ambitieux, il faudra non seulement intégrer les avancées biologiques dans les stratégies thérapeutiques, mais aussi mieux appréhender l'interdépendance de systèmes biologiques aussi complexes que le cycle cellulaire, les télomères, l'apoptose, l'angiogenèse et le système immunitaire ■

RÉFÉRENCES

- Mackensen A, Carcelain G, Viel S, *et al.* Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma. *J Clin Invest* 1994; 93: 1397-402.
- Zorn E, Hercend T. A MAGE-6-encoded peptide is recognized by expanded lymphocytes infiltrating a spontaneously regressing human primary melanoma lesion. *Eur J Immunol* 1999; 29: 602-7.
- Helg C, Starobinski M, Jeannot M, Chappuis B. Donor lymphocyte infusion for the treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 1998; 29: 301-13.
- Pardoll DM. Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 399-415.
- Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 1998; 393: 474-8.
- Trapani JA, Sutton VR, Smyth MJ. CTL granules: evolution of vesicles essential for combating virus infections. *Immunol Today* 1999; 20: 351-6.
- Lowin B, Mattmann C, Hahne M, Tschopp J. Comparison of Fas(Apo-1/CD95)- and perforin-mediated cytotoxicity in primary T lymphocytes. *Int Immunol* 1996; 8: 57-63.
- Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, *et al.* Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 1997; 18: 89-95.
- Cromme FV, Airey J, Heemels MT, *et al.* Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J Exp Med* 1994; 179: 335-40.
- Chaux P, Moutet M, Faivre J, Martin F, Martin M. Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2 costimulatory molecules of the T-cell activation. *Lab Invest* 1996; 74: 975-83.

- Nestlé FO, Aljagic S, Gilliet M, *et al.* Vaccination of melanoma patients with peptide - or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998; 4: 328-32.
- Gilboa E. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity* 1999; 11: 263-70.
- Lethe B, Van der Bruggen P, Brasseur F, Boon T. MAGE-1 expression threshold for the lysis of melanoma cell lines by a specific cytotoxic T lymphocyte. *Melanoma Res* 1997; 7 (suppl 2): 83-8.
- Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, *et al.* Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J Exp Med* 1996; 183: 87-97.
- Ashley DM, Faiola B, Nair S, Hale LP, Bigner DD, Gilboa E. Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors. *J Exp Med* 1997; 186: 1177-82.
- Ronchetti A, Rovere P, Iezzi G, *et al.* Immunogenicity of apoptotic cells *in vivo*: role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines. *J Immunol* 1999; 163: 130-6.
- Botto M, Dell'Agnola C, Bygrave AE, *et al.* Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat Genet* 1998; 19: 56-9.
- Speiser DE, Miranda R, Zakarian A, *et al.* Self antigens expressed by solid tumours do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy. *J Exp Med* 1997; 186: 645-53.
- Inge TH, McCoy KM, Susskind BM, Barrett SK, Zhao G, Bear HD. Immunomodulatory effects of transforming growth factor-beta on T lymphocytes. Induction of CD8 expression in the CTLL-2 cell line and in normal thymocytes. *J Immunol* 1992; 148: 3847-56.
- McKallip R, Li R, Ladisch S. Tumor gangliosides inhibit the tumor-specific immune response. *J Immunol* 1999; 163: 3718-26.
- French LE, Hahne M, Viard I, *et al.* Fas and Fas Ligand in embryos and adult mice: ligand expression in several immune-privileged tissues and coexpression in adult tissues characterized by apoptotic cell turnover. *J Cell Biol* 1996; 133: 335-43.
- Ferguson TA, Griffith TS. A vision of cell death: insights into immune privilege. *Immunol Rev* 1997; 156: 167-84.
- Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995; 270: 1189-92.
- Green DR, Ware CF. Fas-ligand: privilege and peril. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5986-90.
- Hahne M, Rimoldi D, Schröter M, *et al.* Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 1996; 274: 1363-6.
- O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 1996; 184: 1075-82.

RÉFÉRENCES

27. Strand S, Hofmann WJ, Hug H, *et al.* Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (Apo-1/Fas) ligand – expressing tumor cells – a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 1996; 2: 1361-6.
28. Saas P, Walker PR, Hahne M, *et al.* Fas ligand expression by astrocytoma *in vivo*: maintaining immune privilege in the brain? *J Clin Invest* 1997; 99: 1173-8.
29. Walker PR, Saas P, Dietrich PY. The role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back. *J Immunol* 1997; 158: 4521-4.
30. Arai H, Chan SY, Bishop DK, Nabel GJ. Inhibition of the alloantibody response by CD95 ligand. *Nat Med* 1997; 3: 843-8.
31. Arai H, Gordon D, Nabel EG, Nabel GJ. Gene transfer of Fas ligand induces tumor regression *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13862-7.
32. Seino K, Kayagaki N, Okumura K, Yagita H. Antitumor effect of locally produced CD95 ligand. *Nat Med* 1997; 3: 165-70.
33. Chen JJ, Sun Y, Nabel GJ. Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). *Science* 1998; 282: 1714-7.
34. Walker PR, Saas P, Dietrich PY. Tumor expression of Fas ligand (CD95L) and the consequences. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 564-72.
35. Schneider P, Holler N, Bodmer JL, *et al.* Conversion of membrane-bound Fas (CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* 1998; 187: 1205-13.
36. Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med* 1998; 4: 31-6.
37. Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med* 1997; 186: 2045-50.
38. Nakashima M, Sonoda K, Watanabe T. Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1. *Nat Med* 1999; 5: 938-42.
39. Gronbaek K, Straten PT, Ralfkiaer E, *et al.* Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood* 1998; 92: 3018-24.
40. Tollefson AE, Hermiston TW, Lichtenstein DL, *et al.* Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells. *Nature* 1998; 392: 726-30.
41. Fenton RG, Hixon JA, Wright PW, Brooks AD, Sayers TJ. Inhibition of Fas (CD95) expression and Fas-mediated apoptosis by oncogenic Ras. *Cancer Res* 1998; 58: 3391-400.
42. Peli J, Schroter M, Rudaz C, *et al.* Oncogenic Ras inhibits Fas ligand-mediated apoptosis by downregulating the expression of Fas. *EMBO J* 1999; 18: 1824-31.
43. Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, *et al.* Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 1998; 396: 699-703.
44. Thome M, Schneider P, Hofmann K, *et al.* Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 1997; 386: 517-21.
45. Djerbi M, Screpanti V, Catrina AI, Bogen B, Biberfeld P, Grandien A. The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J Exp Med* 1999; 190: 1025-31.
46. Medema JP, de Jong J, van Hall T, Melief CJ, Oeffring R. Immune escape of tumors *in vivo* by expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *J Exp Med* 1999; 190: 1033-8.
47. Brossart P, Bevan MJ. Selective activation of Fas/Fas ligand-mediated cytotoxicity by a self peptide. *J Exp Med* 1996; 183: 2449-58.
48. Kessler B, Hudrisier D, Schroeter M, Tschopp J, Cerottini JC, Luescher IF. Peptide modification or blocking of CD8, resulting in weak TCR signaling, can activate CTL for Fas – but not perforin-dependent cytotoxicity or cytokine production. *J Immunol* 1998; 161: 6939-46.
49. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13: 239-52.
50. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3: 917-21.
51. Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem* 1998; 273: 11177-82.
52. Li F, Ambrosini G, Chu EY, *et al.* Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998; 396: 580-4.
53. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-6.
54. Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998; 17: 3225-36.
55. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, *et al.* Two CD95 (Apo-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998; 17: 1675-87.
56. Rochemaix P, Krajewski S, Reed JC, Bonnet F, Voigt JJ, Brousset P. *In vivo* patterns of Bcl-2 family protein expression in breast carcinomas in relation to apoptosis. *J Pathol* 1999; 187: 410-5.
57. Borner MM, Brousset P, Pfanner-Meyer B, *et al.* Expression of apoptosis regulatory proteins of the Bcl-2 family and p53 primary resected non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 1999; 79: 952-8.
58. Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Van Dyke T. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis *in vivo*. *Nature* 1997; 385: 637-40.
59. Webb A, Cunningham D, Cotter F, *et al.* BCL-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 1997; 349: 1137-41.
60. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-12.

MS2000

Summary

Tumour tolerance and immune escape to apoptosis

An anti-tumour response requires a perfect orchestration of interactions between tumour cells, lymphocytes and antigen presenting cells. The numerous imperfections in these dialogues together with an unfavourable and hostile environment may explain why the response is never initiated (immune ignorance) or why it is not efficacious (tolerance and immune escape). In addition, the tumour cell may defend itself against immune effector mechanisms thanks to a number of subterfuges allowing it to avoid apoptosis. The development of anti-cancer immunotherapies is therefore a double challenge requiring the induction of an efficient immune response whilst simultaneously diminishing the protection of the tumour against death.

TIRÉS À PART

P.Y. Dietrich.