



**HAL**  
open science

# Lymphocytes T CD4 et immunité anti-tumorale naturelle : impact de la chimiothérapie, émergence de lymphocytes T CD4 cytotoxiques

Isabelle Peguillet

► **To cite this version:**

Isabelle Peguillet. Lymphocytes T CD4 et immunité anti-tumorale naturelle : impact de la chimiothérapie, émergence de lymphocytes T CD4 cytotoxiques. Immunologie. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05T034 . tel-01089027

**HAL Id: tel-01089027**

**<https://theses.hal.science/tel-01089027>**

Submitted on 1 Dec 2014

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

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

**Université Paris Descartes**

Ecole doctorale Gc2iD

Laboratoire d'Immunologie Clinique

INSTITUT CURIE

**Thèse de doctorat**

en Immunologie

**Lymphocytes T CD4 et Immunité anti-tumorale naturelle :  
Impact de la chimiothérapie, Emergence de Lymphocytes T CD4  
Cytotoxiques**

**Par Isabelle PEGUILLET**

Présentée et soutenue publiquement le 20 Octobre 2014

*Devant un jury composé de :*

**Docteur Olivier Lantz Directeur de thèse**

**Professeur Pierre Coulie Rapporteur**

**Professeur Pierre Van Der Bruggen Rapporteur**

**Professeur Frédéric Batteux Examineur**

**Docteur Suzy Scholl Membre invité**

## REMERCIEMENTS

Je remercie Suzy Scholl et Olivier Lantz pour m'avoir accordé toute leur confiance et laissée entière liberté pour mener ce projet de thèse. Salariée à plein temps, après le CNAM qui m'a permis d'obtenir un diplôme d'ingénieur en 2008, la thèse finalise à 41 ans, mon parcours Universitaire. Ayant toujours considéré que le savoir était un grand trésor, je souhaite pouvoir continuer à nourrir ma curiosité, et porter plus loin ce projet que j'ai initié.

Je tenais à remercier tout particulièrement Hélène pour ses précieux et judicieux conseils et pour son soutien sans faille. Merci pour le temps passé à la relecture de ce manuscrit malgré un emploi du temps de Maman-Chercheur que je sais bien rempli.

Je remercie mes formidables collaboratrices, Maud, Delphine, Sarah et Aurore avec qui je partage le quotidien du travail depuis déjà quelques années, pour les plus anciennes. Efficacité rigueur toujours avec le sourire et une pointe d'humour voilà qui caractérise cette équipe dynamique et réactive. Merci les Filles pour vos encouragements et votre aide.

Je remercie l'ensemble du Personnel de Curie et tout spécialement les infirmières des PPP et de l'UIC avec qui nous collaborons étroitement et dont la compétence et la dévotion auprès des patients en toutes circonstances ne peuvent que forcer l'admiration.

Merci à l'ensemble des personnes du laboratoire qui m'ont témoigné leur soutien et encouragée dans cette entreprise. Merci aux nombreuses personnes avec qui j'ai pu interagir pour la réalisation de mes travaux, en particulier les ingénieures ingénieurs de la plateforme de cytométrie et les techniciens du laboratoire d'hématologie.

Enfin et surtout un grand merci à ma Petite Famille sans qui, encore une fois, rien n'aurait été possible. Merci de m'avoir porté tous deux et permis de finaliser ce travail. Merci Viktor, pour les petits billets doux que tu venais discrètement me glisser pour ne pas me déranger et m'encourager. Encore merci à vous deux, mes Amours pour toute votre patience.

Je tenais également à remercier vivement Mr M. Elmaleh.

# Table des matières

<b>1. Liste des Abréviations.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Liste des Figures .....</b>	<b>4</b>
<b>3. Résumé.....</b>	<b>7</b>
<b>4. Abstract :.....</b>	<b>9</b>
<b>5. Introduction générale : système immunitaire et cancers.....</b>	<b>10</b>
5.1. Concepts : de l'immunosurveillance à l'immunoediting .....	10
5.2. L'immunosurveillance anti-tumorale chez l'Homme .....	11
5.2.1. Immunodéficience et cancer.....	11
5.2.2. Réponses anti-tumorales naturelles et cancer .....	11
5.2.3. Environnement tumoral et évolution de la maladie .....	12
5.2.4. Les lymphocytes T et l'immunité anti-tumorale chez l'Homme.....	12
<b>6. Lymphocytes T CD4 et immunité anti-tumorale naturelle.....</b>	<b>14</b>
6.1. Introduction générale : les lymphocytes T CD4, une population hétérogène aux propriétés multiples.....	14
6.2. Lymphocytes T CD4 « helper » 1 et 2.....	14
6.2.1. Introduction : le concept de <i>help</i> , concept multidirectionnel.....	14
6.2.2. Th1/Th2 et immunité anti-tumorale .....	15
6.3. Lymphocytes T CD4 « helper » 17.....	18
6.3.1. Introduction .....	18
6.3.2. Th17 et immunité anti-tumorale .....	19
6.4. Les lymphocytes T CD4 folliculaires « helper ».....	22
6.4.1. Introduction .....	22
6.4.2. Les T <sub>FH</sub> et l'immunité anti-tumorale.....	25
6.5. Les Lymphocytes T régulateurs .....	28
6.5.1. Mise en évidence et caractérisation .....	28
6.5.2. Mécanismes de suppression .....	28
6.5.3. T régulateurs et immunité anti-tumorale .....	29
6.6. Les lymphocytes T CD4 cytotoxiques .....	34
6.6.1. Introduction .....	34
6.6.2. Les CD4 CTL et l'immunité anti-tumorale .....	35
6.7. Conclusion : les LT CD4 et l'immunité anti-tumorale naturelle .....	41
6.7.1. Les LT CD4 : populations plurifonctionnelles adaptatives.....	41
6.7.2. Les lymphocytes T CD4 dans les cancers .....	42
6.7.3. CD4 cytotoxiques parmi les autres sous-populations .....	43
<b>7. Chimiothérapie et LT CD4 effecteurs : modulation de l'immunité anti-tumorale naturelle.....</b>	<b>44</b>
7.1. Introduction.....	44
7.2. Les mécanismes de modulation de la réponse immune par les chimiothérapies .....	44
7.2.1. Induction d'une mort dite immunogénique des cellules tumorales.....	44
7.2.2. Augmentation de l'immunogénicité des cellules tumorales .....	45
7.2.3. La modulation de l'immunosuppression.....	46
7.2.4. La prolifération homéostatique induite par la lymphopénie consécutive à la chimiothérapie .....	47
7.3. Chimiothérapies conventionnelles et LT CD4 .....	49
7.3.1. Introduction .....	49

7.3.2.	Quelques définitions .....	49
7.3.3.	Effet des chimiothérapies néo-adjuvantes (CNA) .....	50
7.3.4.	Effet des chimiothérapies adjuvantes (CA) .....	53
7.3.5.	Chimiothérapie : effet sur les sous-populations de LT CD4 .....	54
<b>7.4.</b>	<b>Conclusion : chimiothérapie et LT CD4 effecteurs, modulation de l'immunité anti-tumorale naturelle .....</b>	<b>57</b>
<b>8.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>58</b>
8.1.	Présentation .....	58
8.2.	Article.....	60
<b>9.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>61</b>
9.1.	ChCD4 et immunité anti-tumorale .....	61
9.1.1.	Immunité anti-tumorale naturelle dans les mélanomes uvéaux métastatiques non traités (Mum) : les chCD4 aux côtés des LT CD8 .....	61
9.1.2.	L'impact de la chimiothérapie adjuvante (CA) et néo-adjuvante (CNA) sur les chCD4 dans les cancers du sein .....	62
9.2.	Influence de la charge tumorale sur les chCD4.....	63
9.3.	Les chCD4 effecteurs, LT cytotoxiques antigène spécifique soumis à un programme distinct de différenciation ? .....	64
9.3.1.	LT CD4 cytotoxiques .....	64
9.3.2.	chCD4 et T-Regs, deux lignages distincts .....	64
9.3.3.	chCD4 effecteurs Th1-like ? .....	65
9.3.4.	chCD4 population à part entière ? .....	65
9.4.	ChCD4 effecteurs associés au phénotype : CD28-CD11b <sup>+</sup> 2B4 <sup>+</sup> .....	66
<b>10.</b>	<b>Perspectives.....</b>	<b>67</b>
10.1.	Analyse rétrospective des tumeurs.....	67
10.2.	Analyse prospective des tumeurs .....	68
10.2.1.	Tumeurs non traitées.....	68
10.2.2.	Tumeurs traitées.....	68
10.3.	Spécificité antigénique des chCD4.....	69
10.3.1.	Quantification des chCD4 spécifiques de la tumeur .....	69
10.3.2.	Détermination de la spécificité antigénique .....	70
10.3.3.	Différenciation en CD4 cytotoxiques liée à la stimulation antigénique .....	70
10.4.	Potentiel thérapeutique des chCD4 .....	71
10.4.1.	PD-1/PDL-1 et lymphocytes CD4 effecteurs.....	72
10.5.	Modèle hypothétique du mécanisme de différenciation des chCD4.....	73
10.5.1.	Relation entre CD25 et CD28 dans les chCD4 à partir du modèle T-Reg.....	73
10.5.2.	Hypothétique programme de transcription conduisant à la fonction cytotoxique des chCD4 .....	74
<b>11.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>77</b>
<b>12.</b>	<b>Bibliographie.....</b>	<b>78</b>

## **1. Liste des Abréviations**

### **A :**

ACE Antigène Carcino embryonnaire  
ARN Acide Ribonucléique  
ATL/L leucemie à cellule T de l'adulte

### **B :**

Bcl6 B-cell lymphoma 6 protein  
Bclx B-cell lymphoma-extra large  
Blimp-1 PR domain zinc finger protein 1 ou PRDM1  
BrDU Bromodéoxyuridine

### **C :**

CA Chimiothérapie Adjuvante  
CCL C-C chemokine Ligand  
CCR C-C chemokine Receptor  
CD Cluster de différenciation  
CDR3 Complimentary Determining Region 3  
chCD4 Lymphocytes T CD4 chroniquement stimulés  
CMH Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
CMV Cytomégalovirus  
CNA Chimiothérapie Néo-adjuvante  
CPAs Cellules Présentatrices de l'Antigène  
CSF-1 Colony Stimulating Factor  
CTL Lymphocytes T Cytotoxiques  
CTLA-4 Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4  
CXCL Chemokine (C-X-C motif) Ligand  
CXCR Chemokine (C-X-C motif) Receptor

### **D :**

Dec1 Deleted in esophageal cancer 1

### **E :**

E6 Early Protein 6  
EBV Virus d'Epstein Barr/Epstein Barr Virus  
ECP Eosinophil Cationic Protein  
Eomes T-box brain protein 2/Eomesodermin  
ER Recepteur aux Oestrogènes  
ERp57 Endoplasmic Reticulum protein 57

### **F :**

Flt3L Fms-related tyrosine kinase 3 ligand  
FoxP3 Forkhead box Protein 3

**G:**

GATA-3	Trans-Acting T-cell-specific transcription factor 3
GC	Germinal Center
GITR	Glucocorticoid-induced TNFR-related protein
GMCSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

**H:**

HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HIF $\alpha$ -1	Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$
HMGB1	High Mobility Group Box1
HPV	Papillomavirus Humain/Human Pailloma Virus
Hsp	Heat choc Protein
HTLV-1	Virus T Lymphotrope humain de type 1

**I:**

ICD	Immunogenic Cell Death
ICOS	Inducible T Cell COStimulator
IDO	Indoleamine 2-3 dioxygenase
IFN $\gamma$	Interféron gamma
IL-	Interleukine
IL-R	Recepteur à l'Interleukine
IPEX	Immunedysregulation Polyendocrinopathy autoimmune Enteropathy X Linked

**K:**

KLRG-1	Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1
--------	---

**L:**

LAG-3	Lymphocyte-activation gene 3
LB	Lymphocyte B
LT	Lymphocyte T
LTAI	Lymphome T dit angio Immunoblastique
LT $\alpha\beta$ 2	Lymphotoxine $\alpha\beta$ 2

**M:**

M1	Macrophage Type 1
M2	Macrophage Type 2
MAGE	Melanoma antigen family
MART-1	Melanoma Antigen Recognized by T cells 1
MBP	Major Basic Protein
MCA	Méthylcholanthrène
MDSC	Cellules Myeloïdes Suppressives
Mum	Mélanomes Uvéaux Métastatiques

**N:**

NK	Natural Killer
NLRP3	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
NY-ESO-1	Cancer/testis antigen 1

**P :**

P2RX7	P2X purinoceptor 7
PBMCs	Cellules mononuclées du sang périphérique
PD-1	Programmed Death-1
PD-L1	Programmed Death-1 ligand
PR	Recepteur à la Progestérone

**R :**

RA	Arthrite Rhumatoïde
RLA	Réaction Lymphocytaire Autologue
ROR $\gamma$ t	Orphan nuclear Receptor
RT	Radiothérapie
Runx	Runt-related transcription factor

**S :**

SAP	Signalling lymphocyte activation molecular [SLAM] Associated Protein (SH2D1A)
SGPP2	Sphingosine 1 Phosphatase Phosphatase 2
SIDA	Syndrome d'Immunodéficience Acquise
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STL	Structure lymphoïde tertiare

**T :**

TAM	Macrophages Associés à la Tumeur
TAN	Polynucléaires Neutrophiles Associés à la Tumeur
T-bet	T-box transcription factor TBX21
TCR	T Cell Receptor
TFH	Lymphocyte T "helper" /auxiliaire Folliculaire
TGF $\beta$	Tumor Growth Factor $\beta$
Th	Lymphocyte T "helper" /auxiliaire
ThPOK	Zinc finger and BTB domain-containing protein 7B
TILs	Lymphocytes Intra-Tumoraux
TLR	Toll Like Receptor
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
T-Reg	Lymphocyte T régulateur
Trp1	Tyrosinase-related protein 1

**V :**

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VSTM3	V-set and Immunoglobulin domain containing 9

## 2. Liste des Figures

<b>Figure 1 : Les trois phases de l'immunoediting.</b>	10
<i>Annual Review of Immunology 29:235-71 (January 2011)</i>	
<b>Figure 2 : Définition des sous-populations de lymphocytes T CD4 en fonction de leur polarisation.</b>	15
<i>Nature Reviews Immunology 12, 136-148 (February 2012)</i>	
<b>Figure 3 : Fréquence des lymphocytes T CD4 spécifiques de NY-ESO-1 dans les cancers de l'ovaire en fonction de leur localisation.</b>	19
<i>Cancer Immunology Research 1(5), 303-8 (November 2013)</i>	
<b>Figure 4 : Origine des lymphocytes T helper 17 chez l'Homme.</b>	20
<i>Journal of Experimental Medicine 205, 1903-1916 (August 2008)</i>	
<b>Figure 5 : Modèle de différenciation des Th17 dans la Lamina Propria Intestinale chez la souris.</b>	21
<i>Cell, 126, 1121-1133 (September 2006)</i>	
<b>Figure 6 : Distribution, phénotype et profile cytokinique des lymphocytes T CD4 Th17 dans les cancers de l'ovaire.</b>	23
<i>Blood, 114 (6), 1141-1149 (August 2009)</i>	
<b>Figure 7 : Corrélation entre le pourcentage de lymphocytes T CD4 Th17 et de LT CD4 IFN<math>\gamma</math>+, LT CD8 IFN<math>\gamma</math>+ et T-Reg dans les tumeurs ovariennes.</b>	24
<i>Blood, 114 (6), 1141-1149 (August 2009)</i>	
<b>Figure 8 : Cellules hématopoïétiques produisant de l'IL-17 dans le microenvironnement tumoral des cancers colorectaux.</b>	25
<i>Clinical and Developmental Immunology, 2013, 1-7 (October 2013)</i>	
<b>Figure 9 : Modèle intégratif de la différenciation des T<sub>FH</sub>.</b>	27
<i>Annual Reviews of Immunology, 29, 621-663 (February 2011)</i>	
<b>Figure 10 : Caractérisation phénotypique des T<sub>FH</sub> chez l'Homme et la souris.</b>	27
<i>Annual Reviews of Immunology, 29, 621-663 (February 2011)</i>	
<b>Figure 11 : Mécanisme moléculaire de contrôle de la différenciation des LB par les T<sub>FH</sub> au sein des centres germinatifs.</b>	28
<i>Annual Reviews of Immunology, 29, 621-663 (February 2011)</i>	
<b>Figure 12 : Identification d'une population de T<sub>FH</sub> régulateurs (T<sub>FR</sub>) : CXCR5<sup>+</sup>Bcl6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> chez l'Homme.</b>	30
<i>Nature Medicine, 17 (8), 983-988 (August 2011)</i>	
<b>Figure 13 : Organisation de l'infiltrat hématopoïétique dans les tumeurs du sein chez l'Homme.</b>	33
<i>The Journal of Clinical Investigation, 123 (7), 2873-2892 (July 2013)</i>	
<b>Figure 14 : Corrélations entre l'expression génique de différents marqueurs caractéristiques des T<sub>FH</sub> par les LT CD4 intra-tumoraux isolés de tumeurs du sein présentant un infiltrat lymphoïde dense.</b>	33
<i>The Journal of Clinical Investigation, 123 (7), 2873-2892 (July 2013)</i>	

<b>Figure 15 : Facteur pronostique des signatures géniques T<sub>FH</sub>, Th1 ou CXCL13 sur la survie sans récidive à 10 ans chez les patientes atteintes de cancer du sein non traitées en fonction du statut hormonal des tumeurs.</b>	<b>34</b>
<i>The Journal of Clinical Investigation, 123 (7), 2873-2892 (July 2013)</i>	
<b>Figure 16 : Signatures géniques T<sub>FH</sub>, Th1 ou CXCL13 et réponse complète à la chimiothérapie préopératoire chez les patientes atteintes de cancer du sein en fonction du statut hormonal des tumeurs : facteur prédictif.</b>	<b>34</b>
<i>The Journal of Clinical Investigation, 123 (7), 2873-2892 (July 2013)</i>	
<b>Figure 17 : Histoire de la Découverte des T-Reg.</b>	<b>36</b>
<i>Nature Reviews Immunology 10, 490-500 (July 2010)</i>	
<b>Figure 18 : Mécanismes de suppression conduits par les T-Reg.</b>	<b>38</b>
<i>Nature Reviews Immunology 6, 295-307 (April 2006) et Immunological 236 (1), 219-242 (July 2010)</i>	
<b>Figure 19 : Recrutement des T-Reg au sein de la tumeur par CCL22.</b>	<b>40</b>
<i>OncoImmunology; 1:5, 759-761, (August 2012)</i>	
<b>Figure 20 : Classification de 58 études en fonction de la valeur pronostique des T-Reg dans différents type de cancer.</b>	<b>43</b>
<i>Clinical Cancer Research; 18, 3022-3029, (April 2012)</i>	
<b>Figure 21 : Régulation de la fonction suppressive des T-Reg (CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>).</b>	<b>44</b>
<i>Immunity; 30 (6), 899-911, (June 2009)</i>	
<b>Figure 22 : Facteur pronostique du taux de T-Reg infiltrant les tumeurs en fonction de l'expression du récepteur à l'oestrogène dans les cancers du sein.</b>	<b>46</b>
<i>Journal of Clinical Oncology; 24, 5373-80, (December 2006)</i>	
<b>Figure 23 : A. Description phénotypique des lymphocytes T CD4 Perforine<sup>+</sup> cytotoxiques. B. Hypothétique processus de différenciation des LT CD4 en périphérie, contribution de certaines infections virales.</b>	<b>47</b>
<i>The Journal of Immunology 168, 5954-5958 (April 2002)</i>	
<b>Figure 24 : Régression tumorale complète après transfert adoptif de LT CD4 autologues spécifiques de NY-ESO-1 chez un patient atteints de mélanome métastatique.</b>	<b>49</b>
<i>The New England Journal of Medecine 358 (25), 2698-2703 (June 2008)</i>	
<b>Figure 25 : Régression tumorale de mélanomes après radiothérapie et transfert adoptif de LT CD4 naïfs spécifiques de la tumeur chez la souris, potentialisation de la réponse par l'administration d'anti-CTLA-4.</b>	<b>49</b>
<i>Journal of Experimental Medecine 207, 2698-2703 (March 2010)</i>	
<b>Figure 26 : Régression tumorale de mélanomes après chimiothérapie et transfert adoptif de LT CD4 naïfs spécifiques de la tumeur chez la souris, potentialisation de la réponse par l'administration d'anti-OX40.</b>	<b>51</b>
<i>Journal of Experimental Medecine 209 (11), 2113-2126 (September 2012)</i>	
<b>Figure 27 : Différence phénotypique entre LT CD4 effecteurs : CD45<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> et CD27<sup>+</sup> ré-exprimant CD45RA chez l'Homme.</b>	<b>52</b>
<i>Immunology 132, 326-339 (November 2011)</i>	

<b>Figure 28 : Caractérisation des LT CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> de patients atteints d'arthrite rhumatoïde par l'expression spécifique de 2B4.</b>	<b>53</b>
<i>European Journal of Immunology</i> 40, 378-387 (February 2010)	
<b>Figure 29 : A. Dans les syndromes coronariens aigus, l'Activité cytotoxique des LT CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> est dépendante des voies de signalisation engageant OX40 et 4-1BB. B. Modélisation du mécanisme d'action impliquant les LT CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> conduisant à la rupture des plaques d'athérome chez les patients atteints de syndrome coronarien aigu.</b>	<b>54</b>
<i>Circulation Research</i> , 110 (6), 857-869 (March 2012)	
<b>Figure 30 : Le déséquilibre entre les facteurs de transcription co-exprimés dans les LT CD4 naïfs serait à l'origine de la diversité fonctionnelle de cette population.</b>	<b>56</b>
<i>Nature reviews Immunology</i> , 12 (11), 799-844 (November 2012)	
<b>Figure 31 : Le microenvironnement joue un rôle majeur dans la différenciation des LT CD4 en une population distincte.</b>	<b>57</b>
<i>Nature reviews Immunology</i> , 12 (11), 799-844 (November 2012)	
<b>Figure 32 : A. Activité et effets biologiques des différentes classes de molécules antinéoplasiques utilisées dans les traitements conventionnels des cancers. B. Immunomodulation induite par les chimiothérapies « conventionnelles ».</b>	<b>60</b>
<i>Cell Death and Differentiation</i> , 21, 15-25 (June 2013)	
<b>Figure 33 : Détermination in vitro, de la séquence spatio-temporelle des signaux conduisant à l'activation du système immunitaire, durant la « mort immunogénique ».</b>	<b>62</b>
<i>BioMed Research International</i> , 2013, 1-18 (October 2012)	
<b>Figure 34 : Réponse immune in situ dans les cancers du sein : infiltrats T-Reg (FoxP3<sup>+</sup>) et LT CD8 en fonction du grade histologique de tumeurs du sein.</b>	<b>68</b>
<i>Journal of Pathology</i> , 224, 389-400 (March 2011)	
<b>Figure 35 A. Représentation schématique de l'expression d'une molécule de CMH classe II associée à un peptide spécifique, à la surface d'une cellule d'insecte transfectée par un baculovirus porteur de l'information génique nécessaire. B. Représentation schématique de la production de TCR multimériques fluorescents.</b>	<b>87</b>
<i>Immunological Reviews</i> , 210, 156-170 (2006)	
<b>Figure 36 : Réponses cliniques dans les cancers à un traitement par un anticorps anti-PD1.</b>	<b>89</b>
<i>The new England Journal of Medicine</i> 366 (26), 2443-54 (June 2012)	
<b>Figure de Synthèse : Les différentes voies de signalisation et les facteurs de transcriptions potentiellement impliqués dans la différenciation des chCD4 en effecteurs cytotoxiques</b>	<b>94</b>

### 3. Résumé

Le concept d'immunosurveillance établi au début du XX siècle définit un processus selon lequel le système immunitaire serait capable d'identifier et détruire les cellules tumorales et agirait comme un moyen de défense important contre le développement de cancer. Récemment, les données obtenues à partir de nombreuses études dans des modèles murins et chez l'Homme offrent des preuves convaincantes que les cellules de l'immunité adaptatives et innées, œuvrent de concert pour mettre en place des mécanismes suppresseurs de la tumeur. Toutefois, dans certaines situations, le système immunitaire pourrait promouvoir la progression tumorale. L'équilibre instable entre l'action pro et anti-tumorale de l'immunité est à l'origine du concept d'immunoediting. Dans l'immunité tumorale, alors que le rôle des lymphocytes T CD8 (LT CD8) a été largement investi, les données cliniques expérimentales et humaines démontrent la nécessité d'explorer de manière plus extensive celui des lymphocytes T CD4 (LT CD4).

Les LT CD4 peuvent être considérés comme une grande famille de lymphocytes T caractérisés par différents phénotypes. Ces sous-populations sont toutes différemment impliquées dans la régulation des réponses immunes, soit par l'action de cytokines qui vont contribuer à stimuler ou inhiber d'autres types cellulaires de l'immunité adaptative ou innée, soit par contacts cellulaires directs conduisant à la co-stimulation ou à la suppression des cellules immunitaires. Par ces divers mécanismes, les LT CD4 pourraient influencer sur l'immunité tumorale de manière favorable ou délétère. Ainsi au sein des tumeurs, les LT CD4 « helper » Th1, sont principalement associés à un bon pronostic d'évolution alors que les LT CD4 régulateur, T-Reg, sont le plus souvent définis, de par leur fonction suppressive, comme un obstacle majeur à l'immunité anti-tumorale. Aux côtés de ces fonctions « helper » ou suppressive, des LT CD4 présentant une activité cytotoxique directe en réponse à des agents pathogènes variés, ont été identifiés chez l'Homme et la souris. Ces cellules pourraient potentiellement contribuer au même titre que les LT CD8 cytotoxiques, à la surveillance immune des cancers, en induisant la lyse spécifique des cellules malignes.

Dans une première partie, l'objectif de ce travail a consisté à examiner l'activité des différentes sous-populations de LT CD4 sur la progression tumorale. Par divers aspects, quantitatifs et qualitatifs, il a été montré que la compréhension des nombreux rôles des LT CD4 au cours de la réponse anti-tumorale spontanée, était fondamentale pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques conduisant à établir une immunité protectrice et durable.

La majeure partie des traitements standards anticancéreux, consiste en l'administration de chimiothérapies cytotoxiques. L'impact de ces agents chimiques sur les sous-populations LT CD4 est donc de première importance. Récemment, certains de ces agents thérapeutiques ont été décrits comme pouvant exercer des effets immunostimulants, encourageant le développement de traitements combinant chimiothérapies et immunothérapie. Dans une seconde partie, la capacité immuno-modulatrice des chimiothérapies adjuvantes et néo-adjuvantes, a été étudiée au sein de la tumeur et dans le sang périphérique, dans l'objectif d'une meilleure compréhension de l'activité de ces drogues sur les différentes sous-populations LT CD4. En plus d'induire la lyse de cellules tumorales essentielle à la résolution de la tumeur, les chimiothérapies contribueraient par le relargage d'antigènes tumoraux à la stimulation du système immunitaire. D'autres facteurs, consécutifs à l'administration de ces drogues, interviendraient également dans la modulation de l'immunité tumorale. (i) La lymphopénie, induite par le traitement, permettrait la création d'une niche favorable à l'expansion de cellules immunes effectrices. (ii) La levée de l'immunosuppression par cytotoxicité sélective sur les cellules régulatrices (*ie* T-Reg) de certains de ces agents chimiques, contribuerait à promouvoir la fonction anti-tumorale de cellules immunes. (iii) Les

modifications environnementales conduisant à la libération de facteurs solubles, pourraient influencer de manière décisionnelle sur le développement de réponse immune anti-tumorale au cours de la chimiothérapie

Par ailleurs, dans un contexte tumoral, en présence ou en absence de traitement, les LT CD4 cytotoxiques pourraient occuper une place importante dans l'immunité anti-tumorale. Leur capacité à induire des régressions tumorales a été démontrée chez la souris. Chez l'Homme, leur fonction dans l'immunité anti-tumorale demeurait jusqu'à présent hypothétique bien que leur existence et leur rôle dans nombre de pathologies chroniques, virales, bactériennes et auto-immunes aient été mis en évidence.

Notre travail, par l'étude longitudinale de la réponse immune chez des patientes atteintes de cancer du sein sous traitement en l'absence (chimiothérapie adjuvante : CA) ou en présence de la tumeur (chimiothérapie néo-adjuvante : CNA), a permis de mettre en évidence, pour la première fois chez l'Homme, une augmentation de LT CD4 aux propriétés cytotoxiques en lien avec la tumeur. Ces LT CD4 cytotoxiques pourraient jouer un rôle déterminant dans la réponse à la CNA et dans l'établissement d'une réponse immune durable et protectrice. Cette population effectrice, définie par l'absence d'expression des récepteurs à la chaîne  $\alpha$  de l'IL-2 (CD25) et de l'IL-7 (CD127) détermine une sous-population de lymphocytes T CD4 chroniquement stimulés, les chCD4. Les chCD4 semblent se différencier des autres sous-populations LT CD4 effectrices classiquement décrites, à la fois sur le plan morphologique, phénotypique et fonctionnel.

Cette étude a également contribué à évaluer l'impact de la dynamique tumorale sur les lymphocytes circulants en dehors de tout traitement soulignant l'importance de l'immunogénicité des tumeurs dans la réponse immune. Parallèlement, elle a permis de confirmer l'effet différentiel d'agents chimiques sur les différentes sous-populations lymphocytaires. L'absence de renseignements sur le microenvironnement tumoral et notamment sur la diversité cellulaire qui le compose, représente néanmoins un obstacle à la compréhension de la cinétique du développement ou de la recirculation de ces chCD4, en cours de traitement.

La mise en évidence de LT CD4 cytotoxiques, spécifiques de la tumeur, représente une nouvelle alternative aux traitements des cancers que ce soit en thérapie cellulaire ou dans la conception d'immunothérapies.

**Mots clés : cancer du sein, chimiothérapie, chCD4, LT CD4 effecteurs cytotoxiques.**

#### 4. Abstract :

Historically, CD8 positive Cytotoxic T Lymphocytes (CTL) have been associated with an effector immune response, while T cells with a CD4 phenotype were considered helper T cells. More recent data suggest that CD4 positive T cells are also capable of a direct cytotoxic activity.

Through a systematic analysis of the IL-2 (CD25) as well as IL-7 (CD127) receptors  $\alpha$  on the surface of CD4+ CTL in peripheral blood of patients before during and after treatment we were able to identify a specific CD4+ T cell population devoid of expression for these 2 molecules. These CD4+, CD25<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup>, T cells only represent 0,2-2% of the total CD4+ pool in peripheral blood of healthy donors, while in the presence of a chronic infectious disease such as HIV or tuberculosis they were increased, representing up to 2-20% of all CD4+ T cells. Similarly, high numbers of CD4+, CD25<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup>, T cells could be identified in the circulation in patients with metastatic uveal melanoma (muM) or with breast cancer. These chronically stimulated T cells (chCD4) demonstrate a memory effector phenotype (CD45RO<sup>+</sup>); while the majority shows a terminally differentiated phenotype (CD57<sup>+</sup>), these T cells all arbore distinct phenotypic characteristics as defined by the absence of expression of CD28 together with the presence of a surface expression of integrin CD11b and of the NK receptor, 2B4.

The presence of cytoplasmic granules concentrating granzyme B and perforin, known to be responsible for T cell cytotoxicity, were identified in effector chCD4 while they were absent in conventional CD4+ T cells as well as in Tregs. This cytotoxic potential was demonstrated through redirected cytotoxicity assays that functionally confirm this feature of these chronically activated CD4+ T cells. The secretory cytokine profile showed absent IL-17 levels and a Th1 orientation, asking questions as regards to the lineage of this particular T cell population. Ki67 expression, a marker of cell proliferation, was absent, suggestive of their ability to persist quiescently in patients. However in muM patients we were able to demonstrate a vast oligoclonal increase in chCD4+ T cells, which correlated positively with CD8+ T cells. We were able to detect a high frequency of T cells responding against a specific tumor antigen among these CD8+ T cells.

We furthermore studied the effects of chemotherapy on peripheral lymphocyte populations. In breast cancer patients who had been treated with preoperative (neoadjuvant) chemotherapy we detected high levels of effector chCD4 in 17/22 patients. Of particular interest was the fact that this increase through a course of chemotherapy treatment was strongly correlated to the percentage of regression of the original tumor. Together, these results cast new light on the role and function of CD4+ T cells in tumor immunity. Our observations show that CD4+ cytotoxic T lymphocytes do exist and suggest for the first time in human that they may have an important role in response to treatment and in particular in the establishment of a durable protective immune response.

**Keywords : breast cancer, chemotherapy, chCD4, cytotoxic effector CD4 T cells.**

## 5. Introduction générale : système immunitaire et cancers

### 5.1. Concepts : de l'immunosurveillance à l'immunoediting

La contribution du système immunitaire, à la résolution et/ou au contrôle des tumeurs a été suggérée dès les années 1890, par les observations de William B. Cooley, qui ont permis de mettre en évidence une corrélation entre régression tumorale et infection. La survenue d'érysipèles, infections à streptocoque, post-opératoire chez des patients atteints de sarcomes s'est avérée déterminante pour l'obtention de réponses complètes sans récurrences. Ces données cliniques ont permis d'établir l'hypothèse selon laquelle une réaction inflammatoire secondaire à une infection contribuerait au contrôle de la progression tumorale. Elles sont également à l'origine des premières immunothérapies anti-tumorales par l'injection de toxines bactériennes (toxines de Cooley) dans l'objectif de stimuler le système immunitaire et d'induire des régressions tumorales.

En 1909, partant du postulat que les transformations tumorales survenaient naturellement avec une fréquence élevée, Paul Ehrlich, suggéra que l'occurrence modérée des tumeurs, chez l'Homme, résultait de la capacité du système immunitaire à endiguer le développement tumoral. Il introduisit pour la première fois, le concept d'immunosurveillance des tumeurs. Ce concept, selon lequel le système immunitaire était en alerte perpétuelle contre les cellules transformées, a été repris et adapté, dans les années 1950, par Frank Macfarlane Burnet et Lewis Thomas : « *sentinel thymus dependent cells of the body constantly surveyed host tissues for nascent transformed cells* » suggérant que les lymphocytes T joueraient un rôle central dans l'immunité anti-tumorale. Cette théorie était soutenue par des modèles expérimentaux utilisant des souris syngéniques, tendant à démontrer l'implication de lymphocytes spécifiques d'antigènes associés à la tumeur dans le contrôle de la progression tumorale. L'immunisation de souris par des cellules tumorales irradiées préalablement à l'implantation de tumeur syngénique, induisait leur rejet. De même, le transfert de lymphocytes isolés des souris ayant rejeté la tumeur conférait à l'hôte une résistance au développement de la greffe de tumeurs (Burnet, 1970).

Par la suite, l'augmentation de la fréquence des tumeurs n'ayant pu être mise en évidence entre souris thymectomisées et souris sauvages, le concept d'immunosurveillance est devenu sujet à controverse. Il n'a été réinvesti que dans les années 1990, où il a été clairement démontré que chez les souris immunocompétentes, l'IFN $\gamma$  jouait un rôle critique dans l'apparition de cancers (Kaplan et al., 1998). La neutralisation de l'IFN $\gamma$  ou de son récepteur entraînait effectivement une augmentation de la susceptibilité des souris au méthylcholanthrène (MCA), puissant agent carcinogène. En 2001, Shankaran et al. ont montré que le système immunitaire était capable d'influer non seulement sur le développement de la tumeur mais également sur son immunogénicité (Shankaran et al., 2001). En effet, une proportion importante de tumeurs, soit 40%, dérivant de souris immunodéficientes (Rag2<sup>-/-</sup>) traitées par MCA étaient spontanément rejetées lorsqu'elles étaient transférées dans des hôtes naïfs immunocompétents. Ces résultats ont permis de mettre en avant le rôle du système immunitaire sur le remodelage des tumeurs par la pression de sélection qu'il exercerait et d'introduire un nouveau concept : l'immunoediting (Dunn et al., 2002).

L'immunoediting serait un processus dynamique comprenant trois phases distinctes : (i) l'élimination, (ii) l'équilibre, (iii) l'échappement **figure 1**. La phase d'élimination reprend le concept d'immunosurveillance, dans lequel l'immunité adaptative et innée coopèrent pour

déceler des transformations malignes précoces et les éliminer. Cette étape constituerait une fin en soi lorsqu'elle aboutirait à l'éradication de tumeurs naissantes. La phase d'équilibre, suppose la persistance de cellules tumorales. Pendant cette phase, la croissance tumorale serait contrôlée par les cellules de l'immunité. Enfin, l'échappement conduisant à la progression tumorale, serait consécutif à une rupture de l'équilibre préalablement établi entre tumeur et cellules immunes. Cette dernière étape résulterait de l'émergence de variants tumoraux immunorésistants, sous l'effet de la pression de sélection constante exercée par le système immunitaire (Koebel et al., 2007).

## **5.2.L'immunosurveillance anti-tumorale chez l'Homme**

De nombreux arguments émanant d'études épidémiologiques, cliniques ou histologiques sont en faveur d'un rôle du système immunitaire dans l'immunosurveillance des cancers chez l'Homme. Cependant, dans la majorité des cas, la réponse immune anti-tumorale apparaît inefficace ou insuffisante à la résolution des cancers. Le concept d'immunoediting précédemment énoncé serait en faveur d'une subversion du système immunitaire par la tumeur. Les relations entre tumeur et immunité chez l'Homme, ne sont que partiellement élucidées et nécessitent plus amples explorations pour envisager une action thérapeutique visant à inverser le cours du développement tumoral et stimuler la réponse immune anti-tumorale.

### **5.2.1. Immunodéficience et cancer**

Chez l'Homme, le concept d'immunosurveillance avait été initialement mis en évidence par le constat d'une incidence plus importante des cancers chez les patients atteints de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (Boshoff and Weiss, 2002). La plus part des tumeurs identifiées chez ces patients étaient associées à des virus : lymphomes (Epstein Barr virus), sarcome de Kaposi (virus de l'Herpes) ou cancers urogénitaux (Papillomavirus humain). Ces observations suggéraient que la recrudescence des cancers, dans ce contexte spécifique, serait non pas liée à une diminution de l'immunosurveillance mais la conséquence d'une rupture de l'immunité antivirale. Cependant, l'augmentation de la fréquence des cancers, chez les sujets transplantés où l'administration d'immunosuppresseurs préalable à la transplantation d'organe pourrait compromettre l'immunité, tend à soutenir l'existence d'une surveillance immunologique des cancers chez l'Homme (Chapman et al., 2013; Vajdic et al., 2006). Par conséquent, l'intensité, la durée et la nature du traitement immunosuppresseur constitueraient des facteurs pouvant moduler le risque de survenue de cancers chez les sujets greffés.

### **5.2.2. Réponses anti-tumorales naturelles et cancer**

Dans les cancers, l'établissement de réponses anti-tumorales naturelles et par conséquent, le potentiel immunogénique des tumeurs, ont été initialement mis en évidence par l'identification d'anticorps spécifiques d'antigènes tumoraux dans le sérum de patients. La diversité des anticorps détectés et le faible taux de recouvrement entre ces anticorps dans les différents types de cancer, suggéraient que les réponses immune anti-tumorales étaient dépendantes des mutations propres à chaque tumeur (Reuschenbach et al., 2009). Par ailleurs, la régression spontanée de mélanomes, coordonnée à l'expansion clonale de lymphocytes T intra-tumoraux (TILs) spécifiques d'antigènes associés à la tumeur, corrobore

la capacité du système immunitaire à éliminer les cellules transformées et renforce l'hypothèse d'une veille immunologique à l'encontre des tumeurs chez l'Homme (Mackensen et al., 1993; Zorn and Hercend, 1999).

### 5.2.3. Environnement tumoral et évolution de la maladie

La présence d'infiltrat lymphoïde au niveau de tumeurs d'origine histologique diverse constitue un argument supplémentaire confortant l'hypothèse d'une surveillance immunologique des cancers. En effet, l'augmentation de la survie globale ou de la survie sans récurrences des patients, a pu être corrélée à la densité des lymphocytes infiltrant la tumeur dans certain cancer (Clark et al., 1989). Outre cet aspect quantitatif, la nature de l'infiltrat lymphoïde serait également déterminante dans l'évolution de la maladie. La relation entre le stade de la tumeur et les populations lymphocytaires T intra-tumorales dominantes ou le ratio entre cellules répondeuses et suppressives infiltrant la tumeur, pourrait définir l'état du système immunitaire au cours du développement tumorale. Elle permettrait de discriminer un contexte immuno-stimulateur d'un contexte immuno-subversif, en d'autres termes différencier l'état d'équilibre de la phase d'échappement, à la base du concept d'immunoediting (Fridman et al., 2012; Galon et al., 2006).

L'ensemble de ces résultats contribue à démontrer que le système immunitaire n'est pas inerte face au développement de tumeurs. Nonobstant ce constat, la régression complète et spontanée de cancers établis n'est observée que dans de très rares cas. L'échec de la résolution des cancers par le système immunitaire pourrait résulter de la conjonction de plusieurs facteurs : (i) une réponse immune inadéquate liée au manque d'immunogénicité des tumeurs, (ii) l'incompétence du système immunitaire consécutif à des immunodéficiences acquises ou induites (iii) la sélection de variants tumoraux immuno-résistant sous la pression du système immunitaire pendant la phase de dormance. La compréhension des mécanismes par lesquels les cellules tumorales deviennent réfractaires à l'action effectrice du système immunitaire constitue un véritable enjeu thérapeutique.

### 5.2.4. Les lymphocytes T et l'immunité anti-tumorale chez l'Homme

Les observations précédemment énoncées attestaient du rôle majeur des lymphocytes T dans le contrôle de la prolifération tumorale. Les réponses cliniques observées après immunothérapie adoptive, ont permis de le démontrer. Le transfert adoptif de TILs autologues, préalablement expansus *in vitro*, en combinaison avec l'IL-2, avait permis d'obtenir chez les patients atteints de mélanomes métastatiques un taux de réponse supérieur à celui observé chez les patients traités par IL-2 seul (Rosenberg et al., 1988). Par la suite, Rosenberg et al. ont montré que le « conditionnement » des patients avant transfert adoptif, par un traitement immunosuppresseur, permettait d'améliorer considérablement la réponse clinique. Les auteurs suggéraient que la lymphodéplétion induite par la chimiothérapie avant transfert des TILs, favorisait l'expansion de clones spécifiques de la tumeur (Dudley et al., 2002).

Traditionnellement, les lymphocytes T CD4 (LT CD4) sont considérés comme des auxiliaires ou des régulateurs de la réponse immune adaptative, alors que les lymphocytes T CD8 (LT CD8) matérialisent la phase effectrice par leur activité cytotoxique directe. Cette dichotomie fonctionnelle entre LT CD8 et CD4, a conduit les chercheurs à concentrer la

majorité de leurs efforts à l'identification et à la stimulation des LT CD8 spécifiques de la tumeur dans l'objectif d'établir des réponses immunes anti-tumorales efficaces (June, 2007). La notion selon laquelle, les tumeurs n'expriment pas de molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) classe II et ne peuvent donc pas être reconnues directement par les LT CD4, renforçait l'hypothèse que les CD8 cytotoxiques étaient les acteurs principaux de la veille immunologique anti-tumorale.

Au cours de la dernière décennie, le spectre des sous-populations de lymphocytes T CD4 c'est considérablement élargi. La diversité de ces sous-populations effectrices révèle l'ensemble des activités que peuvent exercer les LT CD4 dans leur fonction de « help » (fonction auxiliaire). Parallèlement, leur capacité à acquérir une activité cytotoxique et à éliminer directement les cellules infectées dans un contexte de CMH classe II préalablement établie, représente un potentiel clinique important dans le traitement des tumeurs. Elle suggèrerait, que les LT CD4, au même titre que les LT CD8, pourraient jouer un rôle direct dans la réponse immune anti-tumorale et constituer une nouvelle cible thérapeutique ou vaccinale.

Dans le traitement des cancers, l'émergence des immunothérapies, envisagées comme alternative ou adjuvant des chimiothérapies classiques, nécessite pour optimiser leur efficacité, de déterminer l'impact des diverses sous-populations qui composent les LT CD4 dans l'initiation des réponses immunes naturelles.

## **6. Lymphocytes T CD4 et immunité anti-tumorale naturelle**

### **6.1. Introduction générale : les lymphocytes T CD4, une population hétérogène aux propriétés multiples**

La reconnaissance d'antigènes spécifiques présentés dans un contexte de Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) classe II par les cellules présentatrices de l'antigène (CPAs) conduit à la prolifération des lymphocytes T CD4 (LT CD4) naïfs et en leur différenciation en cellules effectrices initialement définies comme « lymphocytes helper » sous les désignations de Th1 et Th2. Cette classification première est fonction de l'implication de ces cellules effectrices dans la réponse immune contre des pathogènes intra (Th1) ou extra (Th2) cellulaires et du profil cytokinique qui leur est associé. L'identification subséquente d'autres lignages a conduit à la révision du paradigme Th1/Th2 et à élargir l'éventail des sous-populations de LT CD4 aux sous-populations T régulatrices (T-Reg), T *helper* 17 (Th17) et T *follicular helper* (T<sub>FH</sub>). La polarisation de LT CD4 effecteurs en l'un de ces lignages distincts est déterminée au cours de l'activation par les facteurs solubles caractéristiques d'un contexte environnemental donné. Cette polarisation est orchestrée par un panel singulier de facteurs de transcription. Au côté des Th1 et Th2, ces sous-populations désormais bien caractérisées, tant sur le plan génotypique que fonctionnel **figure 2**, vont influencer différemment sur le développement tumoral.

### **6.2. Lymphocytes T CD4 « helper » 1 et 2**

#### **6.2.1. Introduction : le concept de *help*, concept multidirectionnel**

Le concept de « *help* » des LT CD4 est né dans les années 1970 avec la description du « *carrier effect* » démontrant que l'activation des lymphocytes B conduisant à la production d'anticorps spécifiques de haute affinité requérait deux signaux : (i) la reconnaissance de l'antigène par les immunoglobulines de surface; (ii) l'interaction avec les LT CD4 partageant la même spécificité antigénique (Mitchison, 1971).

Dix ans plus tard, la capacité des LT CD4 à consolider la réponse immune adaptative a été élargie aux lymphocytes T CD8 (LT CD8) cytotoxiques (Keene and Forman, 1982). La fonction « *helper* » des LT CD4 envers les LT CD8 est désormais bien établie et revêt plusieurs aspects. Lors de la réponse primaire, l'activation et l'expansion des LT CD8 ont été montrées comme dépendantes d'interactions directes entre les molécules CD40 exprimées par les LTCD8 et leurs ligands, CD40L, présents à la surface des LT CD4 activés (Bourgeois et al., 2002). Cette notion contraste avec les acquis précédents qui impliquaient la reconnaissance de manière antigène spécifique par une même CPA de LT CD4 et de LT CD8. La sécrétion d'IL2 par les LT CD4, au voisinage des LT CD8, fournit alors un « *help* » conduisant à la différenciation des LT CD8 en effecteurs fonctionnels (Keene and Forman, 1982). Bien que divergents, ces deux mécanismes ne sont pas pour autant exclusifs. Les LT CD4 peuvent également conditionner les CPAs en induisant la production de cytokines, l'expression de molécules de co-stimulation et la présentation croisée d'antigènes tumoraux. Ces étapes sont indispensables à l'établissement d'une réponse LT CD8 effectrice (Ridge et

al., 1998). Parallèlement au développement de LT CD8 cytotoxiques, les LT CD4 interviennent aussi dans le maintien de la fonctionnalité et de la durée de vie des LT CD8 mémoires générés (Sun and Bevan, 2003), qui seront protecteurs lors d'une réponse secondaire.

L'orchestration de la réponse immune par les LT CD4 « helper » ne se limite pas aux seules cellules de l'immunité adaptative, ils agissent également en amont. Les LT CD4 « helper » Th1 et Th2 ont en effet, la capacité d'activer l'immunité innée anti-tumorale. La sécrétion d'IFN $\gamma$  par les Th1 favorise le recrutement au sein de la tumeur de macrophages et l'augmentation de leur production en espèces réactives oxygénées et azotées impliquées dans la lyse des cellules tumorales. Les LT CD4 Th2 vont eux permettre le recrutement de polynucléaires éosinophiles et la production par ces derniers d'*Eosinophil Cationic Protein* (ECP) et de *Major Basic Protein* (MBP) (Hung et al., 1998). Par ailleurs, les LT CD4 antigènes spécifiques pourraient jouer un rôle dans l'initiation de l'activation des cellules NK. Bihl et al., dans un modèle murin d'infection par leishmania, suggèrent qu'au sein des ganglions l'activation des cellules NK serait directement liée à la sécrétion d'IL2 par les CD4 (Bihl et al., 2010).

L'élargissement du concept de régulation des LT CD8 cytotoxiques par la fonction « helper » des LT CD4, à l'immunité tumorale repose sur la description d'antigènes tumoraux pouvant être reconnus à la fois par des LT CD4 et LT CD8 (Topalian et al., 1994). Un antigène tumoral donné est donc susceptible d'induire une réponse anti-tumorale effectrice en conjuguant l'action cytotoxique des LT CD8 au « help » fournie par les LT CD4. L'identification d'antigènes tumoraux apparaît alors cruciale pour évaluer quantitativement et qualitativement, dans le sang périphérique comme dans la tumeur, les LT CD4 « helper » spécifiques des tumeurs pouvant être générés spontanément au cours du développement tumoral (Vigneron et al., 2013).

## **6.2.2. Th1/Th2 et immunité anti-tumorale**

### **6.2.2.1. LT CD4 spécifiques de la tumeur, population de fréquence faible**

La détection de LT CD4 spécifiques des tumeurs, dans les tissus néoplasiques comme dans le sang périphérique de sujets atteints de cancer, a permis d'évaluer leur fréquence et leur fonctionnalité dans différentes pathologies. En l'absence de toute thérapie, la fréquence des LT CD4 spécifiques de la tumeur s'avère souvent très faible voire inférieure au seuil de détection des techniques employées. La quantification de ces LT CD4 impose dans ce cas une étape préalable d'amplification *in vitro* par cycles de re-stimulation. Ce procédé peut malheureusement conduire à une mésestimation de la diversité de ces cellules (Coulie et al., 1992). Dans ce système, la détection de LT CD4 spécifiques de la tumeur se limite effectivement à la détection des LT CD4 répondeurs ayant une capacité d'expansion *in vitro* dans un contexte défini, entre autres, par le milieu de culture, l'apport en cytokines ou encore la nature des CPAs (Marturano et al., 2008). Par ailleurs, la différenciation et l'amplification de précurseurs naïfs, initialement présents, peuvent également introduire un biais dans l'estimation de ces cellules. En effet, des LT CD4 dirigés contre des antigènes définis comme propres à la tumeur peuvent être détectable dans le sang périphérique de donneurs sains (Godefroy et al., 2007; Valmori et al., 2005b).

### **6.2.2.2. Valeur pronostique des Th1 et Th2 spécifiques de la tumeur**

La recherche d'une corrélation entre la présence de LT CD4 spécifiques de la tumeur et l'évolution de la maladie a pour objet de définir leur valeur pronostique. Un déséquilibre du rapport Th1/Th2 en faveur de Th2 serait une caractéristique commune des cancers et pourrait résulter soit d'un dysfonctionnement des Th1, soit d'une activation plus spécifique des Th2, ou une combinaison des deux phénomènes.

En périphérie, l'expansion de LT CD4 de profil Th1 spécifiques de la tumeur est généralement observée aux stades précoces de la maladie. Celle de LT CD4 de profil Th2 spécifiques de la tumeur semble au contraire concorder avec des stades plus avancés (Marturano et al., 2008; Slager et al., 2003; Tatsumi et al., 2002) ou être associée à des tumeurs agressives (Shimato et al., 2012).

L'étude des infiltrats tumoraux a permis de confirmer les données obtenues en périphérie. L'augmentation du nombre de LT CD4 de profil Th1 infiltrant la tumeur est effectivement associée à un bon pronostic (Fridman et al., 2012). L'influence sur l'évolution de la maladie des LT CD4 de profil Th2 présents au sein de la tumeur, semble moins évidente et suggérerait dans certaines circonstances un rôle protecteur des LT CD4 Th2, probablement par l'induction d'anticorps (Schreck et al., 2009; Yoon et al., 2010). De manière générale, les lymphocytes intra-tumoraux (TILs) sont directement exposés aux facteurs environnementaux inhérents à la composition de « l'écosystème » tumoral. L'établissement d'un lien direct entre TILs de profil Th1 et évolution de la maladie, constitue donc une preuve de concept quant à l'activité anti-tumorale de ces cellules. Or, nombre de travaux mettant en évidence cette relation ne tiennent pas compte de la spécificité antigénique de ces LT CD4 intra-tumoraux. La corrélation des données entre sang périphérique et tumeur nécessite de considérer les LT CD4 spécifiques de la tumeur, simultanément dans ces deux compartiments. Certaines études se sont attachées à cet aspect de la reconnaissance antigénique de la tumeur par les LT CD4, en l'absence de traitement. La compréhension du rôle des LT CD4 « *helpers* » dans le contrôle de la progression tumorale est indispensable au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, notamment des immunothérapies.

*Exemple dans le cancer du col de l'utérus :*

Chez des patientes atteintes de cancer du col induit par le Papillomavirus humain 18 (HPV-18) et présentant des lésions de haut grade, les LT CD4 circulants spécifiques de l'onco-protéine E6 sont capables de produire des cytokines associées aussi bien à un profil Th1 qu'à un profil Th2. En dehors de cette considération, la quantité d'IFN $\gamma$  sécrétée par les LT CD4 circulants spécifiques de la tumeur constituerait un facteur pronostique influant sur la persistance de l'infection et/ou la rechute après chirurgie. Dans la tumeur, la présence d'un nombre important de LT CD4 T-bet<sup>+</sup>, c'est-à-dire exprimant un facteur de transcription liée à la polarisation Th1, serait également associée à un meilleur pronostic. Ces résultats laissent supposer que des LT CD4 spécifiques d'E6 et produisant de l'IFN $\gamma$  seraient, d'une part, générés en réponse à l'infection par HPV18, et d'autre part, préférentiellement recrutés au sein de la tumeur pour y imprimer une immunité protectrice (Seresini et al., 2007).

*Exemple dans le cancer du pancréas :*

Dans un autre modèle de cancer, le cancer du pancréas, maladie définie comme très agressive, Tassi et al. ont observé que l'orientation de la réponse LT CD4 anti-tumorale vers un profil Th2 était dépendante de la tumeur. Les auteurs ont d'abord constaté que la réponse

antivirale relative aux LT CD4 spécifiques d'un antigène viral donné se caractérisait par la sécrétion de cytokines type Th1, indifféremment du contexte tumoral ou non tumoral, c'est à dire chez les patients comme chez les donneurs sains. Les auteurs ont ensuite montré que les LT CD4 dirigés contre l'Antigène Carcino Embryonnaire (ACE), antigène surexprimé dans les tumeurs pancréatiques, étaient de profil Th2 uniquement chez les patients. La détection de LT CD4 intra-tumoraux majoritairement GATA-3<sup>+</sup>, facteur de transcription liée à la polarisation Th2, chez ces mêmes patients, suggère que la différenciation des LT CD4 spécifiques de la tumeur en effecteurs de profil Th2, pourrait être influencée par le microenvironnement tumoral (Tassi et al., 2008).

Dans ces deux exemples, la spécificité antigénique des CD4 intra-tumoraux est extrapolée à partir des caractéristiques des LT CD4 répondeurs étudiés en périphérie, établissant indirectement, la capacité de ces derniers à gagner le site de la tumeur. Très récemment, dans les tumeurs ovariennes, Ayyoub et al. ont démontré pour la première fois, la présence *ex vivo* de LT CD4 spécifiques d'un antigène tumoral, NY-ESO-1, au sein de la tumeur. L'utilisation de tetramers NY-ESO-1 CMH classe II a permis dans cette étude, la quantification et l'isolation de ces LT CD4 à partir non seulement du sang périphérique mais également du liquide d'ascite et de la tumeur de patientes ayant développé une réponse immune spontanée à NY-ESO-1. Des travaux antérieurs ont effectivement montré que les LT CD4 spécifiques de NY-ESO-1 n'étaient présents que dans le sang périphérique de patients où une réponse anticorps spontanée à l'antigène était décelable (Redjimi et al., 2011). Les auteurs ont montré que la proportion de LT CD4 spécifiques de NY-ESO-1 parmi les LT CD4 totaux, était variable en fonction des compartiments explorés, révélant une accumulation prépondérante de ces cellules au sein de la tumeur **figure 3**. Les caractéristiques fonctionnelles de ces cellules dans le liquide d'ascite comme dans la tumeur seraient celles d'effecteurs Th1. Cette étude permet d'établir une réelle corrélation entre le sang périphérique et la tumeur. Elle suggérait de plus, que les cellules circulantes seraient en partie, le reflet de l'immunité intra-tumorale.

Ces quelques exemples mettent clairement en évidence la capacité du système immunitaire à reconnaître la tumeur et à générer des LT CD4 de nature Th1 et/ou Th2, spécifiques d'antigènes tumoraux. Cette capacité ne serait pas restreinte aux seules tumeurs viro-induites supposées plus immunogènes. Cependant, le rôle exact de ces LT CD4 Th1 ou Th2 dans la progression de la maladie reste à clarifier, leur présence n'étant pas toujours associée à un pronostic prédéfini. L'évolution de la progression tumorale est-elle à l'origine du recrutement préférentielle de sous-populations lymphocytaires ou est-ce l'infiltrat lymphoïde qui détermine l'évolution de la maladie. A ce jour, nous ne disposons pas d'éléments suffisants pour trancher entre cause ou conséquence. Le microenvironnement tumoral est un lieu d'interactions complexes entre la tumeur et les différents acteurs de la réponse immune, la part et la séquence des événements aboutissant à une activité pro ou anti tumoral demeure l'objet de recherches intensives.

## **6.3. Lymphocytes T CD4 « helper » 17**

### **6.3.1. Introduction**

#### **6.3.1.1. Découverte des LT CD4 Th17**

Les lymphocytes T « *helper* » 17 (Th17) ont été récemment identifiés comme une nouvelle sous-population de lymphocytes T « *helper* » au côté des Th1 et Th2 classiques. L'idée que des LT CD4 produisant de l'interleukine 17 (IL-17) constituaient une population distincte, différente des Th1 et Th2, a été suggérée par Infante-Duarte et al., en 2000. Dans un modèle murin d'infection par *Borrelia burgdorferi*, l'agent bactérien responsable de la maladie de Lyme, les auteurs ont défini des LT CD4 co-exprimant l'IL-17 et le TNF $\alpha$ , et ne se révélant être affiliés ni aux Th1, ni aux Th2. Ces cellules seraient soumises à un programme de différenciation différent. Parallèlement, ces auteurs ont mis en évidence la présence de LT CD4 présentant ces mêmes caractéristiques dans les liquides synoviaux de patients atteints d'« arthrite de Lyme ». La sécrétion simultanée de TNF $\alpha$  et d'IL-17 observée chez l'Homme et la souris, suggérait le rôle de l'IL-17 dans les infections conduisant à une réponse inflammatoire exacerbée (Infante-Duarte et al., 2000).

#### **6.3.1.2. Origine des LT CD4 Th17**

L'origine de ces cellules chez l'homme serait exclusivement rattachée à une sous-population de précurseurs LT CD4 exprimant à leur surface le CD161 (Cosmi et al., 2008). En effet, alors que l'IL-23 et l'IL-1 $\beta$  semblent pouvoir induire le développement de Th1 à partir des LT CD4 naïfs CD161<sup>+</sup> et CD161<sup>-</sup> issus de sang de cordon, les Th17 ne peuvent être générés qu'à partir de la fraction CD161<sup>+</sup> **figure 4**.

#### **6.3.1.3. Mécanismes régulateurs de la différenciation des LT CD4 Th17**

La génération de LT CD4 produisant de l'IL-17 à partir de précurseurs LT CD4 naïfs au cours de réponses immunes indépendamment des cytokines et des facteurs de transcription conduisant au développement et au maintien des Th1 et Th2, a été confirmée par des études *in vitro* et *in vivo* chez la souris (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005). L'IL-23, interleukine de la famille de IL-12 combinant la chaîne IL-12R $\beta$ 1 de IL-12 (chaîne p40) avec une sous-unité unique IL-23R (chaîne p19), jouerait un rôle fondamental dans la production d'IL-17 et l'expansion de ces Th17 (Langrish et al., 2005). L'expression du facteur de transcription *Orphan nuclear receptor* (ROR $\gamma$ t) serait également requise pour l'établissement de ce lignage **figure 5**. Ivanov *et al.* ont montré que les Th17 étaient absentes de la *lamina propria* intestinale des souris déficientes pour le gène ROR $\gamma$ t. Or, chez les souris sauvages elles y sont constitutivement présentes et expriment ROR $\gamma$ t (Ivanov et al., 2006).

Chez l'homme, les mécanismes régulant la différenciation des Th17 ont été étudiés *in vitro*, par l'addition de cytokines aux LT CD4 naïfs dérivés du sang de cordon. L'association de l'IL-23 à l'IL-1 $\beta$  seule (Wilson et al., 2007) ou à l'IL-1 $\beta$  combinée au TGF $\beta$  et à l'IL-6 (Volpe et al., 2009), seraient responsables de la différenciation des LT CD4 en Th17. L'IL-23 et l'IL-1 $\beta$  auraient une action synergique sur l'induction de l'expression de ROR $\gamma$ t, d'IL23R et IL12R $\beta$ 1 ainsi que sur la production d'IL-17 chez les LT CD4 naïfs. Au-delà de l'initiation

de l'engagement des LT CD4 dans la voie de différenciation Th17, l'IL-23 constituerait également un élément essentiel dans la stabilisation des LT CD4 Th17 (Romagnani et al., 2009).

#### **6.3.1.4. LT CD4 Th17 et maladies inflammatoires**

Les maladies auto-immunes et les réactions inflammatoires ont longtemps été associées à une réponse de type Th1 excessive et non contrôlée par le système immunitaire. De nombreuses études ont montré depuis que certaines de ces pathologies pouvaient résulter en l'activation de la voie Th17. Dans la sclérose en plaque, les lymphocytes Th17 péri-vasculaires localisés au niveau de lésions cérébrales sont plus abondants dans les formes actives que dans les formes quiescentes de la maladie (Tzartos et al., 2008). De même, les patients atteints de rectocolite hémorragique ou de maladie de Crohn, (deux syndromes inflammatoires chroniques de l'intestin), présentent une augmentation du niveau d'expression d'IL-17 (Fujino et al., 2003). Dans l'arthrite rhumatoïde (RA), IL-17 serait moteur du développement de la maladie dans les stades précoces et les atteintes articulaires (Kirkham et al., 2006; Lubberts, 2008). Les LT CD4 Th17 ont également été décrits comme augmentés dans le psoriasis (Teunissen et al., 1998), une maladie chronique inflammatoire cutanée. Des études cliniques de phase II, utilisant des anticorps monoclonaux neutralisants dirigés contre IL-17, dans le traitement de psoriasis ont démontré leur efficacité. Plus de 80% des patients traités réduisaient d'au moins 75% l'index de sévérité de la maladie, par comparaison à des sujets traités par placebo (Brown et al., 2014). Ces résultats confirment l'implication des Th17 dans les maladies auto-immunes et inflammatoires et le rôle délétère qu'elles y joueraient. Cependant, au regard de ces observations, les LT CD4 Th17 pourraient constituer à l'inverse un facteur favorable à l'établissement de l'immunité anti-tumorale. L'immunothérapie anti-tumorale a en effet pour objectif, que ce soit par manipulation du système immunitaire ou/et modulation de certaines fonctions immunes, d'établir des réponses dirigées essentiellement contre la tumeur assimilable en partie au « soi ».

### **6.3.2. Th17 et immunité anti-tumorale**

#### **6.3.2.1. Introduction**

Comme explicité ci-dessus, les LT CD4 Th17 constituent une composante importante de la réponse inflammatoire et leur rôle dans le développement des maladies auto-immunes a été clairement défini. Leur présence au sein du microenvironnement tumoral dans différentes pathologies cancéreuses (Fridman et al., 2012; Zou and Restifo, 2010), soulève nombre d'interrogations quant à leur contribution à l'immunité anti-tumorale et leur potentiel thérapeutique.

La caractérisation des LT CD4 Th17 intra-tumoraux issus de cancers du côlon, du foie, du pancréas, du rein, de l'ovaire et de mélanomes confirme qu'il s'agit de lymphocytes effecteurs tant par l'expression de marqueurs de surface que par la production de cytokines (Kryczek et al., 2009). La fonction effectrice de ces cellules serait déterminée par l'absence de la molécule CCR7, absence caractéristique des effecteurs, et la production d'IFN $\gamma$ , d'IL2 et de TNF $\alpha$ . Les marqueurs de « *homing* » (migration) tels que CCR6 et CXCR4 permettraient aux LT CD4 Th17 de gagner la tumeur en réponse à leurs ligands respectifs CXCL12 et

CCL20 sécrétés par les cellules tumorales. L'accumulation de LT CD4 Th17 au sein de la tumeur par comparaison au sang périphérique et aux organes lymphoïdes secondaires (ganglions), suggère en effet un recrutement préférentiel ou actif de ces cellules au sein de la tumeur **figure 6**.

### **6.3.2.2. Activité anti-tumorale des Th17**

L'activité anti-tumorale des Th17 tiendrait en leur capacité à recruter secondairement d'autres cellules effectrices de l'immunité, incluant les LT CD8, les cellules NK et potentiellement les LT CD4 Th1 (Kryczek et al., 2008). Le pourcentage de LT CD4 Th17, déterminé dans des tumeurs ovariennes, est étroitement corrélé à celui de ces différents types cellulaires en association avec leur production d'IFN $\gamma$  **figure 7**. Le mécanisme conduisant à faciliter l'accès à la tumeur des cellules de l'immunité adaptative et innée serait dépendant des LT CD4 Th17. Les cellules tumorales sous l'influence de l'IL-17 et l'IFN $\gamma$  secrétées par les LT CD4 Th17 libèreraient les chimio-attractants CXCL10 et CXCL9 permettant le recrutement de cellules immunes effectrices au site de la tumeur (Kryczek et al., 2009). L'effet anti-tumoral des LT CD4 Th17 serait en effet d'ordre indirect, l'absence de granzyme B et de perforine écartant l'éventualité d'une action cytotoxique directe de ces cellules sur les cellules tumorales. Parallèlement, dans ce même environnement, une relation inverse a été déterminée entre les T-Reg et les LT CD4 Th17, suggérant la mise en place d'une réponse anti-tumorale protectrice par les LT CD4 Th17 **figure 7**. La corrélation positive entre le niveau d'IL-17 détecté dans le liquide d'ascite des patientes atteintes d'un cancer du col de l'utérus et à la survie de ces patientes, conforte cette dernière l'hypothèse (Kryczek et al., 2009).

L'accumulation de LT CD4 Th17 associée à une meilleure survie, a également été observée dans le liquide pleural de patients diagnostiqués pour des cancers pulmonaires au stade métastatique (Ye et al., 2010). Dans cette même pathologie, Hamai et al. ont décrit, pour la première fois, la présence de LT CD4 Th17 spécifiques d'antigènes tumoraux. La spécificité anti-tumorale de ces LT CD4 Th17 intra-tumoraux démontre leur implication au sein du microenvironnement tumoral. Dans cette étude, la sécrétion différentielle d'IFN $\gamma$  et d'IL-17 observée en fonction du stade de différenciation indiquerait que les LT CD4 Th17 seraient, après stimulation antigénique, convertis en cellules effectrices produisant essentiellement de l'IFN $\gamma$ . Ce modèle de différenciation proposé par les auteurs suggère une voie alternative à l'action anti-tumorale de ces cellules précédemment évoquée (Hamai et al., 2012).

### **6.3.2.3. Activité pro-tumorale des LT CD4 Th17**

Le potentiel anti-tumoral de ces cellules reste cependant controversé, en raison des travaux établissant une corrélation négative entre la présence de cellules sécrétrices d'IL-17 au site de la tumeur et la survie des patients (Chen et al., 2010; Tosolini et al., 2011). L'origine cellulaire incertaine de l'IL-17 quantifiée dans le milieu tumoral pourrait expliquer en partie cette divergence. D'autres types cellulaires peuvent effectivement être conduits à sécréter de l'IL-17 (Wu et al., 2013) **figure 8**. En dehors de cette considération, les LT CD4 Th17 pourraient promouvoir la progression tumorale en favorisant l'angiogenèse. Plusieurs mécanismes contribuant à la néo-vascularisation des tumeurs ont été décrits dans des modèles

murins (Numasaki et al., 2003; Numasaki et al., 2005). Chez l'homme, l'importance de l'infiltrat tumoral en LT CD4 Th17 a été montré comme positivement corrélée à la densité de micro-vaisseaux des hépatocarcinomes, (Zhang et al., 2009). Dans les cancers colorectaux, la quantité d'IL-17 produite par les macrophages et/ou les LT CD4 est également associée à la micro-vascularisation qui serait la conséquence de la libération de VEGF par les cellules tumorales en réponse à l'IL-17 (Liu et al., 2011). La stimulation des cellules tumorales par IL-17 conduirait également au relargage d'IL-6 et d'IL-8 qui faciliteraient l'angiogenèse (Tartour et al., 1999). L'IL-6 induite indirectement par l'IL-17 participerait également à l'activation de la voie de signalisation Stat3 et par conséquent à l'expression de gènes impliqués dans la survie des cellules tumorales (Wang et al., 2009).

#### **6.3.2.4. Equilibre LT CD4 Th17 et lymphocytes T CD4 régulateurs**

Un autre aspect important est l'équilibre entre LT CD4 Th17 et T-Reg dans la tumeur. Chez les patients atteints de tumeurs gastriques, l'accumulation de LT CD4 Th17 au site de la tumeur semble se produire de manière concomitante à l'accumulation de T-Reg au niveau des stades précoces. L'évolution de la maladie conduit cependant à une diminution graduelle des LT CD4 Th17 coordonnée à une augmentation des T-Reg (Maruyama et al., 2010b). Une possible différenciation des T-Reg FoxP3<sup>+</sup> naïfs en Th17, avait été mise en évidence par Valmori et al. (Valmori et al., 2010), posant la question d'une plasticité réciproque entre LT CD4 Th17 et T-Reg. La conversion de LT CD4 Th17 en T-Reg Foxp3<sup>+</sup> ayant des capacités suppressives pourrait effectivement intervenir à la suite de stimulations répétitives du récepteur cellulaire T (TCR) (Ye et al., 2011). D'autres facteurs comme l'IL-2, indispensable à la survie et prolifération des T-Reg, semble inversement être défavorable au développement des LT CD4 Th17 (Kryczek et al., 2007b).

Un effort substantiel d'intégration des différents facteurs micro-environnementaux est mené afin d'établir le rôle exact de ces cellules dans le développement tumoral. La détermination d'une activité anti *versus* pro tumorale en fonction du stade, du type de tumeurs, et du contexte nécessite une caractérisation précise et distincte de ces cellules. L'expression de CD161 à leur surface, consistante avec l'origine probable de ces cellules, évoquée dans l'introduction, ainsi que l'ensemble des marqueurs explorés ne sont pas restreints aux seuls LT CD4 Th17, tout comme la sécrétion d'IL-17. La mise en évidence de marqueurs différentiels est indispensable à l'étude fonctionnelle de toute population cellulaire.

## 6.4. Les lymphocytes T CD4 folliculaires « helper »

### 6.4.1. Introduction

#### 6.4.1.1. Découverte et caractérisation des LT CD4 folliculaires « helper »

Les T<sub>FH</sub>, LT CD4 folliculaires « helper », jouent un rôle primordial dans l'immunité humorale. Identifiés chez l'Homme en 2000, dans le sang périphériques et dans un organe lymphoïde secondaire : les amygdales, ils ont été initialement définis comme une sous-population de LT CD4 exprimant le récepteur de chimiokines CXCR5 (Breitfeld et al., 2000). Dans le sang périphérique, les cellules CXCR5<sup>+</sup> co-exprimaient CD45RO et CCR7, traduisant un phénotype mémoire, alors que dans le tissu amygdalien elles exprimaient uniquement CD45RO. La perte d'expression de CCR7 suggérait leur différenciation en cellules effectrices dans les tissus lymphoïdes. Ce changement de phénotype s'accompagnait de l'acquisition des molécules de co-stimulation CD40L et ICOS. Dans cette même étude, les auteurs ont démontré qu'*in vitro*, seules les cellules CXCR5<sup>+</sup> provenant du tissu amygdalien étaient capables d'induire la production d'IgA et d'IgG chez les lymphocytes B (LB) du même tissu. L'expression de CXCR5 conférerait aux cellules la capacité de migrer préférentiellement vers les zones folliculaires des organes lymphoïdes secondaires riches en CXCL13 ligand de CXCR5. Là, elles contribueraient de manière antigène spécifique à la différenciation des LB en cellules mémoires et/ou plasmocytaires (Schaerli et al., 2000).

Par la suite chez la souris, l'expression du facteur de transcription Bcl6 a été identifiée comme essentielle à la différenciation des CD4 naïfs en T<sub>FH</sub> (Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009). Ce processus impliquerait une succession d'interactions spatio-temporelles avec différentes populations de CPAs *figure 9*. Dans la zone T des organes lymphoïdes secondaires, la présentation de l'antigène par les cellules dendritiques aux LT CD4 naïfs, concomitante à l'engagement de la molécule de co-stimulation ICOS (Inducible T cell COStimulator), induirait l'expression de Bcl6 et consécutivement celle de CXCR5. Ces modifications moléculaires permettraient la différenciation des LT CD4 en T<sub>FH</sub> et la migration de ceux-ci au niveau de la bordure T/B des organes lymphoïdes. Au niveau de cette bordure, l'interaction antigène spécifique avec les LB, toujours dépendante de l'engagement d'ICOS (Choi et al., 2011) permettrait le maintien de l'expression de Bcl6 dans les T<sub>FH</sub> et l'acquisition par ces cellules de caractéristiques phénotypiques spécifiques des effecteurs T<sub>FH</sub> présents dans les centres germinatifs (ou *germinatif center*, GC) des ganglions lymphatiques. La différenciation terminale des T<sub>FH</sub> conduirait alors à la formation de GCs où s'opère la maturation des LB par commutation de classe et hyper-mutations somatiques. Au sein des GCs, les T<sub>FH</sub> effecteurs vont permettre le développement de plasmocytes pérennes de haute affinité, et la génération de LB mémoires. Cette dernière étape serait conditionnée par la liaison de l'intégrine membranaire SAP présente sur les T<sub>FH</sub> avec son récepteur exprimé à la surface des LB (Cannons et al., 2010).

Chez l'homme, la caractérisation phénotypique des T<sub>FH</sub> valide la modélisation du processus de différenciation décrit précédemment chez la souris *figure 10*. Comme chez la souris, deux populations de T<sub>FH</sub> exprimant Bcl6 ont pu être identifiées phénotypiquement et fonctionnellement: les T<sub>FH</sub> mémoires et les T<sub>FH</sub> effecteurs présents dans les GCs (T<sub>FH</sub> GC). La distinction entre ces deux stades de différenciation s'effectuerait essentiellement par un

niveau d'expression des marqueurs classiques plus intense chez les T<sub>FH</sub> GC : CXCR5, Bcl6, ICOS, PD-1, CXCL13, CD200, et IL-21. Cependant, de même que la perte de CCR7 qui traduit le phénotype effecteur de ces cellules, l'expression de SAP constituerait une caractéristique propre aux T<sub>FH</sub> GC (Rasheed et al., 2006). Chez l'homme, les mutations inactivatrices de SAP rencontrées dans les syndromes lymphoprolifératifs liés au chromosome X, se traduisent par un déficit en immunoglobuline et l'absence de CGs ainsi qu'un dysfonctionnement des LT CD4 (Chaganti et al., 2008; Ma et al., 2005; Ma et al., 2006), renforçant le rôle primordial des T<sub>FH</sub> dans la réponse humorale.

#### **6.4.1.2. Fonction des T<sub>FH</sub>**

Le discernement du rôle fonctionnel des T<sub>FH</sub> requiert la compréhension de l'intégration collaborative des diverses voies de signalisation mise en jeu au cours de ces interactions T-B, impliquant les facteurs solubles (IL-21, IL-4 et CXCL13), les protéines de surface (CD40L, PD-1, ICOS, SAP et CXCR5) et le facteur de transcription Bcl6 *figure 11*.

- CD40L-CD40 :

CD40L est l'unique ligand de CD40. Chez l'Homme, la liaison CD40L/CD40 conduit à une diminution rapide de l'expression de CD40L à la surface des T<sub>FH</sub> de manière concomitante à son internalisation. Ce mécanisme contribuerait à la modulation de l'activation des LB (Yellin et al., 1994). La régulation de son expression complexifie la détermination de son rôle dans les interactions LT-LB chez l'Homme. Cependant, chez la souris, la perturbation des interactions CD40L/CD40 par l'administration d'un anticorps anti CD40L se traduisant par l'absence de centres germinatifs, démontre son implication dans le dialogue T<sub>FH</sub>/LB (Foy et al., 1994).

L'analyse du profil transcriptionnel des LB des centres germinatifs (ou LB GC) montrait que ces cellules étaient caractérisées par l'expression de gènes pro-apoptotiques (Klein et al., 2003). Des signaux de survie sont donc indispensables pour assurer le maintien des LB GC. L'engagement CD40L/CD40 serait critique dans le processus séquentiel permettant la survie des LB GC. En effet, chez les LB, l'engagement CD40L/CD40 conditionne à la fois l'expression de Bclx, molécule anti-apoptotique, et celle de Fas, molécule pro-apoptotique. A un stade précoce, la liaison de CD40 à CD40L induirait l'augmentation de Bclx, rendant ainsi les LB résistants à l'apoptose liée aux interactions Fas/FasL entre LB et T<sub>FH</sub>. Par la suite, l'absence concomitante de reconnaissance appropriée de l'antigène par les LB activés conduirait à une diminution du niveau de Bclx et à la mort des LB par susceptibilité Fas/FasL (Zhang et al., 1996).

- IL-21 :

IL-21 produite par les T<sub>FH</sub> serait déterminante pour la différenciation des LB en plasmocytes mais son rôle est complexe. La fixation de l'IL-21 sur son récepteur à la surface des LB induit la phosphorylation de STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), ce qui active l'expression du facteur de transcription Blimp-1 (Martins and Calame, 2008). Chez l'Homme, la présence de mutations abolissant l'expression de STAT3, empêche l'induction de Blimp-1 et donc la différenciation des LB en plasmocytes, et ce malgré une supplémentation *in vitro* en IL-21 (Avery et al., 2010). Mais, l'IL-21 sécrétée par les T<sub>FH</sub> permet également d'augmenter l'expression de Bcl6. Cette dernière propriété conférerait à l'IL-21 un rôle dans la prolifération des LB par l'intermédiaire de STAT5, permettant le

maintien et/ou l'induction de Bcl6 (Scheeren et al., 2005). IL-21 par ce mécanisme agirait de concert avec CD40L.

Par ailleurs, IL-4 pourrait circonvier aux fonctions de l'IL-21, démontrant l'interconnexion entre les différentes voies de signalisation engagées par les interactions T<sub>FH</sub>-LB GC. Chez la souris, le déficit conjoint en IL-21R et IL-4R semble être plus lourd de conséquences que l'inactivation de l'IL-21R seul, confirmant l'importance de voies alternes dans la médiation de signaux (Ozaki et al., 2002).

- PD-1/PDL-1 :

PD-1 est fortement exprimé à la surface des T<sub>FH</sub> GC. Un tel niveau d'expression pourrait refléter en partie les interactions de nature antigène spécifique qui se produisent de manière répétée entre LB et LT au sein des centres germinatifs et qui conduisent à une stimulation chronique du TCR. L'expression de PD-1 chez les lymphocytes T soumis à une stimulation antigénique constante en rapport avec une infection chronique, a en effet été décrite (Day et al., 2006; Wherry et al., 2007).

Cependant, l'expression intense de PD-1 pourrait également refléter l'implication des T<sub>FH</sub> dans des mécanismes de contrôle du développement de la réponse humorale. Comme énoncé précédemment (*section mise en évidence et caractérisation*), le niveau d'expression de PD-1 permettrait de discriminer les T<sub>FH</sub> des autres populations T « helper », mais également de déterminer le stade de différenciation des T<sub>FH</sub> en corrélation avec l'expression de CCR7. Chez l'Homme, Wang et al., en utilisant une méthode de tri par billes magnétiques basées sur le niveau d'expression de PD1, ont pu isoler à partir d'un organe lymphoïde secondaire, les amygdales, trois populations de LT CD4 avec des intensités de PD1 différentes soit les CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>++</sup> ou CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+++</sup>. Ils ont démontré que seules les cellules CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+++</sup> étaient capables d'une part, de produire de l'IL-21 et du CXCL13, et d'autre part, d'induire la production d'immunoglobulines par les LB isolés de ces mêmes tissus. Néanmoins, dans cette même étude, l'activation de PD-1 par l'addition de PDL-2 *in vitro* conduisait à la réduction notable de la sécrétion d'immunoglobuline, suggérant que PD-1 pourrait jouer un rôle modulateur de la réponse humorale (Wang et al., 2011).

La mise en évidence d'une population de T<sub>FH</sub> régulateurs (T<sub>FR</sub>) : CXCR5<sup>+</sup>Bcl6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> chez l'Homme et la souris, **figure 12** (Chung et al., 2011) a conduit à la révision du rôle de PD1 dans la réponse humorale. L'existence de telles cellules chez l'Homme avait été suggérée par le fait que chez les sujets atteints de syndrome *Immunedysregulation, Polyendocrinopathy, autoimmune Enteropathy, X-linked* (IPEX), syndrome lié à des mutations inactivatrices du gène FoxP3, une réponse humorale incontrôlée est observée.

Par ailleurs, en l'absence de détection de LT CXCR5<sup>+</sup>Bcl6<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (T<sub>FR</sub>) dans le thymus de souris, Chung et al. avaient émis l'hypothèse que ces cellules pourraient dériver de précurseurs T-Reg naturels CXCR5<sup>-</sup> provenant de la périphérie (Chung et al., 2011). Dans cette même étude, des expériences de transfert adoptif réalisées dans des souris *TCRβ*<sup>-/-</sup> ont permis de démontrer la capacité des LT CD4 T<sub>FR</sub> à contrôler la réponse humorale. En effet, le transfert de LT CD4 naïfs de souris sauvage en présence de T-Reg issus soit de souris déficientes pour le gène Bcl6, soit de souris sauvages, dans des hôtes *TCRβ*<sup>-/-</sup>, suivi d'une immunisation avec la protéine KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) conduisait à une augmentation remarquable du pourcentage de plasmocytes et du titre d'anticorps spécifiques de cette protéine, uniquement lorsque les T-Reg provenaient des donneurs Bcl6<sup>-/-</sup> (Chung et al., 2011).

Enfin, Sage et al. ont montré que l'interaction PD-1/PDL-1 affectait plus spécifiquement les T<sub>FR</sub>, en diminuant leur nombre. L'engagement de PD-1 par son ligand

permettrait le contrôle de l'inhibition des  $T_{FH}$  par les  $T_{FR}$  qui tentent normalement à limiter leur différenciation et leur fonction (Hams et al., 2011).

- SAP et ICOS :

Les interactions ICOS/ICOSL affecterait plus la différenciation des  $T_{FH}$  que leur fonction *stricto sensu* (*section mise en évidence et caractérisation*).

La signalisation conduite par SAP, quant à elle, contribuerait à stabiliser les contacts des  $T_{FH}$  avec les LB GC, contacts nécessaires à leur différenciation en plasmocytes et/ou LB mémoires (Cannons et al., 2010). Cependant, SAP pourrait également être impliqué dans les mécanismes moléculaires conduisant à la production par les  $T_{FH}$  d'IL-4 (Yusuf et al., 2010), qui aurait pour rôle, tout comme l'IL-21, de promouvoir la survie des LB GC (Ozaki et al., 2002).

- CXCR5/CXCL13 :

L'expression du récepteur CXCR5 par les  $T_{FH}$  est acquise au cours des stades précoces de différenciation des T « *helper* » en  $T_{FH}$  (*section mise en évidence et caractérisation*). Le rôle de ce récepteur est essentiel à la migration des  $T_{FH}$  vers les follicules des organes lymphoïdes secondaires riches en CXCL13 ligand sécrété par les LB GC.

L'expression de CXCL13 constitue une caractéristique singulière des  $T_{FH}$  humains mais son rôle reste à définir. La sécrétion de CXCL13 par les  $T_{FH}$  pourrait conditionner le recrutement des LB vers les follicules et la migration intra-folliculaire des LB GC vers les zones claires des follicules riches en  $T_{FH}$  et cellules dendritiques folliculaires. Parallèlement, au sein des centres germinatifs, la liaison de CXCL13 à CXCR5 à la surface des LB GC pourrait induire l'expression de  $LT\alpha 1\beta 2$ , lymphotoxine dont l'engagement avec son récepteur à la surface des cellules non hématopoïétiques du stroma est impliquée dans la maturation des cellules dendritiques folliculaires (Ansel et al., 2000). CXCL13 de manière générale serait primordiale pour définir l'architecture fonctionnelle des centres germinatifs. Les  $T_{FH}$  qui constituent une source importante de CXCL13 au sein des centres germinatifs (Gu-Trantien et al., 2013), participeraient par ce biais au maintien actif de ces structures.

## **6.4.2. Les $T_{FH}$ et l'immunité anti-tumorale**

### **6.4.2.1. Introduction**

Si un lien entre la présence de  $T_{FH}$  et certains cancers est clairement établi, la contribution de ces cellules à la réponse immune anti-tumorale reste encore à définir. Les  $T_{FH}$  associés aux cancers peuvent être séparés en deux catégories : celle où les cellules néoplasiques sont des cellules d'origine lymphocytaire et arborent elles-mêmes un phénotype de type  $T_{FH}$  et celle où les cellules tumorales sont distinctes des  $T_{FH}$  mais dans lesquelles les  $T_{FH}$  semblent jouer un rôle prépondérant.

Les lymphocytes T néoplasiques d'aspect  $T_{FH}$  ont été essentiellement décrits dans les lymphomes T dits angio-immunoblastiques (LTAI). Dans cette pathologie, la localisation préférentielle de ces cellules de type CD4 au niveau des follicules de la zone B des ganglions, aux stades précoces de la maladie, évoquait une origine  $T_{FH}$ . L'analyse phénotypique de ces cellules malignes a permis de démontrer qu'elles exprimaient effectivement un certain nombre de marqueurs de  $T_{FH}$ , dont CXCL13, CXCR5, SAP, ICOS et Bcl6 (de Leval et al.,

2007; Krenacs et al., 2006). Parallèlement, les LTAI sont souvent associés à un dysfonctionnement des LB se manifestant par une expansion de ces cellules accompagnée d'une hypergammaglobulinémie et de la présence d'auto-anticorps (de Leval et al., 2010). Dans leur ensemble, ces observations indiquent que ces cellules T malignes possèdent les caractéristiques non seulement phénotypiques mais également fonctionnelles des T<sub>FH</sub>. La présence de ces cellules a également été mise en évidence dans d'autres types de lymphomes T, les lymphomes T dits non-spécifiés (Meyerson et al., 2013; Rodriguez Pinilla et al., 2009).

Le rôle dans le développement tumoral des T<sub>FH</sub>, non pas en tant que cellules malignes mais comme cellules associées à la tumeur a été également décrit. Ahearne et al. ont montré que les patients atteints de leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) présentaient une augmentation dans le sang périphérique de CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>. *In vitro*, la supplémentation en IL-4, IL-21 et CD40L, molécules affiliées aux T<sub>FH</sub>, favorisait la prolifération et la survie des cellules leucémiques (Ahearne et al., 2013). Enfin, l'implication des T<sub>FH</sub> dans les tumeurs solides non hématologiques, était indirectement suggérée par l'infiltration de plasmocytes au sein de la tumeur, le développement de plasmocytes étant dépendant des T<sub>FH</sub>. La présence de LB définis comme cellules CD20<sup>+</sup>, associée à une meilleure survie dans certains cancers, cancer du poumon non à petites cellules (Lohr et al., 2013) cancers ovariens (Nielsen et al., 2012), mélanomes (Ladanyi et al., 2011) cancers du sein présentant une activité proliférative intense (Schmidt et al., 2008), indiquait que les T<sub>FH</sub> pourraient constituer un facteur pronostique de la progression tumorale.

#### 6.4.2.2. Implication directe des T<sub>FH</sub> dans l'immunité anti-tumorale

Ce n'est que très récemment, par les travaux de Gu-Trantien et al., que le rôle direct de T<sub>FH</sub> dans la réponse anti-tumorale a pu être mis en évidence. Cette étude a été menée chez des patientes atteintes de cancer du sein non préalablement traitées. Le profil d'expression génique des LT CD4 a été établi à partir de l'analyse simultanée des tumeurs, des organes lymphoïdes secondaires (ganglions axillaires) et du sang périphérique de ces patientes. L'objectif était de déterminer la composition de ces différents compartiments en termes de sous-populations LT CD4. Une relation directe entre la densité de l'infiltrat lymphocytaire et la présence de structures lymphoïdes tertiaires (SLT) a été mise en évidence. En effet, une forte proportion de lymphocytes intra-tumoraux était associée à un grand nombre de SLTs adjacents à la tumeur. L'architecture de ces SLTs était comparable à celle de ganglions, comprenant une zone T enrichie en CD3<sup>+</sup>, côtoyant des îlots assimilables aux follicules ganglionnaires, concentrant lymphocytes B (cellules CD20<sup>+</sup>), cellules dendritiques folliculaires (cellules CD23<sup>+</sup>), T<sub>HF</sub> (CD4<sup>+</sup>CXCL13<sup>+</sup>) et excluant les lymphocytes CD8<sup>+</sup>. Ces follicules incluaient également des centres germinatifs circonscrits par la co-localisation de cellules CD4<sup>+</sup>, BCL6<sup>+</sup>, et CXCL13<sup>+</sup> (T<sub>FH</sub> GC) et l'expression exclusive de Ki67 traduisant l'activité proliférative des LB (LB GC) **figure 13**. La production de CXCL13 apparaissait parfaitement corrélée à l'expression d'autres marqueurs de T<sub>FH</sub> tel que PD1 et CD200 **figure 14** et était proportionnelle à la fréquence des cellules CD45<sup>+</sup> dans le stroma comme dans la tumeur, suggérant que les TILs T<sub>FH</sub> pouvaient être à l'origine de la formation de ces structures tertiaires. L'analyse transcriptionnelle comparative entre les tumeurs fortement et faiblement infiltrées (statut déterminé par marquage immunohistochimique des lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> intra-tumoraux), a permis d'établir une signature génétique T<sub>FH</sub> de 8 gènes préférentiellement surexprimés dans les tumeurs infiltrées (CD200, CXCL13, PD-1, ICOS, SAP, SGPP2 : sphingosine 1-phosphatase phosphatase 2, VSTM3 : V-set and immunoglobulin domain containing 9 et FLP37440 : hypothetical protein). En extrayant les gènes spécifiques de Th1 et T<sub>FH</sub>, différenciellement exprimés en fonction de l'importance de l'infiltrat lymphocytaire, les auteurs ont évalué l'impact de ces signatures sur le taux de survie sans récurrence à 10 ans de

patientes atteintes de cancer du sein n'ayant reçu aucun traitement, ni hormonothérapie, ni chimiothérapie, avant et après chirurgie. Cette étude a permis de démontrer clairement que la signature génique  $T_{FH}$  précédemment établie était associée à une meilleure survie chez l'ensemble des patientes alors qu'un bon pronostic de la signature Th1 était restreint aux patientes dont la tumeur était de sous type  $HER^+$  **figure 15**.

La valeur pronostique de CXCL13 seule était en parfaite concordance avec celle de la signature  $T_{FH}$ , confirmant que l'expression de CXCL13 dans la tumeur était étroitement liée aux  $T_{FH}$ . De même, les auteurs ont montré que la signature  $T_{FH}$  et CXCL13, identifiées à partir de biopsies tumorales, constituaient une valeur prédictive de la réponse à une chimiothérapie préopératoire, puisque associée à un taux de réponses complètes plus important chez les patientes, spécifiquement chez celles porteuses de tumeurs de sous-type  $HER^+$  **figure 16**. Au vu de ces résultats, les  $T_{FH}$  intra-tumoraux se révéleraient être à la fois un facteur prédictif de la réponse au traitement et pronostique de l'évolution de la maladie. Par extrapolation, il pourrait en être de même pour les structures lymphoïdes tertiaires qui ont déjà été décrites dans les cancers du poumon (de Chaisemartin et al., 2011) et les cancers colorectaux (de Chaisemartin et al., 2011) comme étant de bon pronostic et affiliés à une signature génique caractéristique comprenant des gènes codant pour des chimiokines et leurs récepteurs. Dans l'étude menée par Gu-Trantien et al., la présence de structures lymphoïdes tertiaires adjacentes à la tumeur était corrélée à l'accumulation de  $T_{FH}$  sécrétant CXCL13. Ces structures pourraient être essentielles à la mise en place d'une réponse anti-tumorale durable. Les cellules de l'immunité temporairement consignée dans un environnement protecteur : les SLTs pourraient devenir opérationnelles à la suite de modifications environnementales.

Si les  $T_{FH}$  jouent un rôle fonctionnel direct sur l'inhibition de la croissance tumorale ou si leur présence reflète simplement la formation de structures lymphoïdes tertiaires et une meilleure réponse immune de manière générale, reste cependant à démontrer.

## 6.5. Les Lymphocytes T régulateurs

### 6.5.1. Mise en évidence et caractérisation

Les lymphocytes T régulateurs (T-Reg) jouent un rôle primordial dans le maintien de la tolérance périphérique. Identifiés en 1995 chez la souris par Sakaguchi *et al.*, ils ont été caractérisés chez l'homme en 2001 comme des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exprimant constitutivement et fortement la chaîne alpha du récepteur à l'interleukine 2, le CD25. (Baecher-Allan *et al.*, 2001; Sakaguchi *et al.*, 1995). Par la suite, la stabilité d'expression du facteur de transcription FoxP3 (Forkhead box3) liée à la déméthylation sélective du domaine hautement conservé TSDR (T-Reg specific demethylated region) localisé à l'intérieur du locus FoxP3, a été montrée comme propre aux T-Reg et déterminante pour leur développement ainsi que leur fonction suppressive (Fontenot *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2003; Polansky *et al.*, 2008; Roncador *et al.*, 2005). Chez l'homme, les mutations aboutissant à la perte de fonction du gène FoxP3 définissent le syndrome IPEX (Immunodysrégulation, Polyendocrinopathie, autoimmune Enteropathie, X-linked) se traduisant par des atteintes poly-endocriniennes et des entéropathies sévères ainsi que des allergies alimentaires multiples (Bennett *et al.*, 2001). Dans le sang périphérique, le niveau d'expression intermédiaire de la chaîne alpha du récepteur à l'interleukine 7, le CD127, coordonné à une forte expression de CD25, sont corrélés avec l'expression de Foxp3 et définissent les T-Reg comme des lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD127<sup>int</sup>.CD25<sup>++</sup> (Seddiki *et al.*, 2006) **figure 17**.

Deux populations de T-reg ont été définies en fonction de leur origine : les T-Reg naturelles (nT-Reg) générées au cours du développement des lymphocytes T dans le thymus et les T-Reg adaptatifs ou inductibles (iTreg) issus de la conversion de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels naïfs en situation tolérogène. L'expression du facteur de transcription HELIOS qui semble restreinte aux seuls nT-Reg, permettrait la différenciation de ces deux populations (Thornton *et al.*, 2010).

### 6.5.2. Mécanismes de suppression

Si les mécanismes cellulaires et moléculaires précis par lesquels les T-Reg exercent leur fonction régulatrice de la réponse immune restent à préciser chez l'homme, les études menées chez la souris ont permis d'identifier nombre d'entre eux **figure 18**.

L'action suppressive sur les cellules effectrices de l'immunité peut être liée à une cytotoxicité directe des T-Reg par l'intermédiaire de la voie Perforine/Granzyme ou Fas/FasL. Elle peut aussi s'exercer de manière indirecte, les T-Reg induisant le dysfonctionnement des cellules présentatrices de l'antigène (CPAs) après engagement des molécules inhibitrices CTLA-4 et/ou LAG3 exprimées à leur surface avec leurs ligands respectifs : CD80/CD86 et CMH classe II, présents à la surface des CPAs. Dans ces deux cas, un contact cellulaire direct entre T-Reg et cellules cibles est requis.

Parallèlement, la carence en IL-2, un facteur de survie, inférée par la consommation compétitive des T-Reg, 100 fois plus affins pour cette cytokine que les LT CD4 conventionnels, joue un rôle majeur dans l'établissement de la suppression.

Des facteurs solubles sont également associés à la fonction suppressive des T-Reg : l'IL-10 et le TGFβ produits directement par les T-Reg mais aussi l'Indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) dont la sécrétion par les CPAs serait conditionnée par les T-Reg.

Plus récemment, d'autres mécanismes immuno-modulateurs impliquant les T-Reg via les molécules co-inhibitrices Programmed Death-1/Programmed Death-1 Ligand (PD1:PDL-

1) et B7-H4 ont été décrits. Classiquement, au cours de l'activation, l'engagement de PD1 par son ligand PDL-1 concomitant à la transduction d'un signal TCR serait à l'origine de l'épuisement des cellules T effectrices. Ce phénomène d'« *exhaustion* » permettrait la régulation négative de leur expansion et de leurs fonctions effectrices afin de limiter la réponse immune. L'interaction PD1/PDL-1 pourrait également être impliquée dans l'induction et la maintenance de la tolérance, l'absence d'expression de PD1 chez les souris déficientes pour ce gène conduisant au développement de maladies auto-immunes (Nishimura et al., 1999). Si la molécule PDL-1 est constitutivement exprimée par les CPAs, elle peut tout comme PD1 être induite à la surface d'un grand nombre de types cellulaires, notamment en réponse aux cytokines pro-inflammatoires tel que l'interferon. Les T-Reg peuvent co-exprimer ces deux molécules et ainsi influencer le triumvirat CPAs/Effecteur/Régulateurs en faveur de la suppression. En plus d'une action inhibitrice directe par liaison de PDL-1 avec les molécules PD1 présentes à la surface des effecteurs T (Zhou et al., 2010) ou B (Gotot et al., 2012), les T-Reg permettraient d'induire la conversion en iTRegs de lymphocytes CD4 conventionnels et de maintenir la fonction suppressive de ces cellules nouvellement induites (Francisco et al., 2009). Par ailleurs, l'axe PD-1/PDL-1 pourrait être impliqué dans l'expansion de T-Regs. Ce processus a été décrit comme un mécanisme participant au non-rejet du greffon au cours de la transplantation (Krupnick et al., 2005). Krupnick et al. ont montré *in vitro* que les cellules endothéliales du greffon qui persistent après transplantation, étaient capable d'induire après activation, la prolifération de T-Regs allogéniques et que cette expansion était dépendante de PDL-1. L'interaction de PDL-1 avec la molécule B7.1 (CD80) nouvellement identifiée comme second récepteur de PDL-1, pourrait également conduire à l'expansion des T-Regs. Dans un modèle murin de réaction du greffon contre l'hôte (GVHD), l'engagement de PDL-1 à la surface d'APCs avec le récepteur B7.1 présent sur les T-Regs conditionnait la survie et l'expansion des T-Regs du donneur (Yi et al., 2011).

L'inhibition des lymphocytes T activés liée à la molécule B7H4 serait, quant à elle, en partie imputable aux T-Reg. Les T-Reg infiltrant la tumeur favoriseraient la production d'IL-10 et d'IL-6 par les macrophages environnants. Ces cytokines, par une action autocrine et paracrine, stimuleraient l'expression de B7H4 à la surface des cellules myéloïdes (cellules dendritiques, monocytes et macrophages) qui lors de leurs interactions avec les lymphocytes T activés, vont induire par le biais de cette molécule l'arrêt de la prolifération et de la sécrétion de cytokines des cellules en contact (Kryczek et al., 2007a; Sica et al., 2003).

### **6.5.3. T régulateurs et immunité anti-tumorale**

#### **6.5.3.1. Introduction**

Les T-Reg, garants de la tolérance périphérique, sont présentés comme un obstacle majeur à l'immunité anti-tumorale, qu'elle soit de nature intrinsèque, en permettant l'échappement aux mécanismes d'immunosurveillance, ou qu'elle soit extrinsèque, en prévenant les effets des immunothérapies. En effet, les cellules cancéreuses expriment des auto-antigènes (antigènes de différenciation) et/ou des antigènes associés à la tumeur (antigènes mutés ou antigènes onco testis) qui pourrait en théorie être à l'origine de développement d'éventuelles auto-immunités impliquant l'intervention des T-Reg.

Plus qu'une rupture de l'équilibre entre cellules effectrices et suppressives, ce serait la diligence des T-Reg à accéder au site de la tumeur qui serait déterminante pour imprimer une dominante suppressive favorable au développement des tumeurs (Darrasse-Jeze et al., 2009). La déplétion en T-Reg représente par conséquent une approche attractive dans le traitement

des cancers. Cependant, son manque de spécificité pourrait conduire au développement de pathologies auto-immunes et serait favorable à la conversion des cellules T CD4 conventionnels en cellules régulatrices ayant pour conséquence d'élargir le répertoire « suppresseur ». Une action plus ciblée sur les mécanismes conduisant à altérer le recrutement, la différenciation, la fonctionnalité ou encore la signalétique des T-regs est donc préférentiellement envisagée comme stratégie thérapeutique. Le contrôle de la fonction de ces cellules suppressives dans le microenvironnement tumoral sans compromettre la tolérance périphérique représente donc le véritable enjeu.

### **6.5.3.2. T-Reg et évolution tumorale**

Etant donné que la fréquence des cancers semble augmenter avec l'âge, la question de l'évolution quantitative (fréquence à l'intérieur des différents compartiments) et qualitative (spécificité et fonctionnalité) des T-Reg en fonction de l'âge, se pose naturellement (DeGregori, 2013). Chez l'Homme, en raison de l'accès restreint aux tissus, la fréquence des T-Reg en fonction de l'âge est déterminée dans le sang périphérique. Les études menées, si elles ne mettent pas en évidence d'augmentation majeure de la fréquence des T-Regs proportionnellement à l'âge, soulignent la stabilité fonctionnelle de ces cellules au cours du temps. La population T-Reg subit néanmoins un remodelage phénotypique qui suit le processus de différenciation des cellules naïves en cellules mémoires/effectrices (Santner-Nanan et al., 2008; Valmori et al., 2005a). Cette évolution s'accompagne d'une modification adaptative du répertoire TCR relative aux conditions de stimulation environnementale (Miyara et al., 2009; Vukmanovic-Stejic et al., 2006). Il est pour le moment impossible de déterminer dans quelle mesure ces variations modifient l'occurrence des tumeurs. Dans le contexte tumoral, l'évolution des T-Regs n'est évaluable que sous traitement ou comparée aux valeurs mesurées chez les sujets sains.

La caractérisation des populations T infiltrant la tumeur (TILs) constitue un élément pronostique de l'évolution de la maladie. Cette évaluation concerne non seulement le nombre de cellules T infiltrant mais le ratio entre les différentes sous-populations à l'intérieur de la tumeur (Fridman et al., 2012). Si pour les lymphocytes T CD8 la corrélation entre densité de l'infiltrat et pronostic clinique favorable semble claire, pour les T-Reg, les données sont plus controversées. L'analyse des caractéristiques du répertoire des TILs en termes de diversité et d'antigène spécificité serait des plus informatives (Linnemann et al., 2014).

### **6.5.3.3. Recrutement préférentiel**

L'augmentation du nombre de T-Regs au sein du microenvironnement tumoral est présentée comme un obstacle à l'immunité anti-tumorale. Pour exercer leur action suppressive, les T-Reg sont dépendants de leur capacité à migrer aux sites d'intérêts pour y établir des interactions cellulaires. De manière générale, ce sont les petites molécules chimio-attractantes, les chimiokines, qui régulent le trafic des différentes sous-populations de cellules T en fonction de l'expression conditionnelle de récepteurs appropriés à leur surface. Les T-Reg expriment majoritairement CCR4 mais également CCR8 à leur surface et peuvent ainsi être recrutés spécifiquement en réponse à la production des ligands CCL22 et CCL17 propre à CCR4 et CCL1 pour CCR8.

La production physiologique de CCL22 au niveau luminal par les cellules épithéliales des *acini* de la glande mammaire participerait au contrôle de l'inflammation dépendante du

cycle menstruel (Jones et al., 2005). Dans le microenvironnement tumoral, cette sécrétion peut être le fait des cellules dendritiques et des macrophages infiltrant la tumeur, comme des cellules épithéliales (Gobert et al., 2009). Le remaniement tissulaire accompagnant le processus de transformation conduit à une sécrétion diffuse non polarisée, favorisant la migration des T-Reg au site de la tumeur et l'établissement d'un environnement tolérogène **figure 19** (Curiel et al., 2004; Maruyama et al., 2010a; Mizukami et al., 2008). La sécrétion de CCL22 par les cellules tumorales s'effectuerait en réponse aux signaux de l'inflammation : IL1- $\beta$ , TNF $\alpha$  ou encore IFN $\gamma$ , produits par les cellules de l'immunité innée (Natural Killer et macrophages), senseurs précoces de la tumeur (Faget et al., 2011).

Récemment, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre CCR4, le Mogamulizumab, dans le traitement des leucémies à cellules T de l'adulte (ATL/L) induites par le virus T-lymphotrope humain de type I (HTLV-1) (Ishida et al., 2012), a permis d'établir que la proportion de CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup> incluant les cellules leucémiques mais également les effecteurs T-Regs (Miyara et al., 2009), était fortement réduite dans le sang périphérique des patients traités (Sugiyama et al., 2013). Parallèlement, les auteurs ont montré qu'à partir de PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) issus de sujets atteints de mélanomes, la déplétion *ex vivo* des cellules CCR4<sup>+</sup> induisait après stimulation *in vitro* l'expansion de LT CD4 et de LT CD8 spécifiques de l'antigène tumoral NY-ESO-1. Ces résultats démontrent que la déplétion sélective des effecteurs T-Reg contribuerait à instaurer ou à restaurer l'immunité anti-tumorale. Cette stratégie présenterait un intérêt majeur, en affectant préférentiellement les T-Reg effecteurs, elle réduirait les risques de compromettre la tolérance périphérique et l'apparition d'auto-immunité. Elle permet également d'envisager l'inversion d'un état suppresseur vers un état pro-actif anti-tumoral dans les tumeurs établies (Darrasse-Jeze et al., 2009).

Récemment, la sécrétion de CCL17 par les polynucléaires neutrophiles associés à la tumeur (TANs) a été défini comme une voie alterne ou complémentaire au recrutement des T-Regs au site de la tumeur (Mishalian et al., 2014). CCL28, chimiokine étroitement liée à l'hypoxie, sous l'action directe de HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia inductible factor-1 $\alpha$ ) pourrait également jouer un rôle dans la migration des T-Reg vers la tumeur. La croissance tumorale étant dépendante de l'apport en oxygène et en nutriments, l'activation de l'angiogenèse constitue un facteur essentiel à l'expansion tumorale. L'apoptose et la nécrose tumorales consécutives à l'hypoxie n'engendrent cependant pas la mise en place d'une réponse immune anti-tumorale escomptée. Facciabene et al. ont montré que dans les cancers ovariens, la co-expression de CCL28 et de HIF-1 $\alpha$  dans la tumeur était associée à une diminution de la survie des patientes. La sécrétion de CCL28, induite par l'hypoxie, conditionnerait le recrutement de T-Reg exprimant CCR10, ligand de CCL28, et serait indirectement responsable de l'établissement d'un microenvironnement tolérogène. Les T-Regs ainsi recrutés stimuleraient l'angiogenèse par la libération de VEGFA (Vascular Endothelial Growth Factor A) en réponse à l'hypoxie (Facciabene et al., 2011).

Les mécanismes contribuant au recrutement préférentiel des T-Reg au sein des tumeurs apparaissent multiples et variés. Le recours à un chimio-attractant précis serait directement lié au type de tumeur (présence d'acini), au stade tumoral (hypoxie) et également à la composition de l'infiltrat tumoral (présence de TAMs et TANs). Ces éléments sont à prendre en considération dans les stratégies visant à bloquer l'accès des T-Reg à la tumeur.

#### 6.5.3.4. T-Reg et développement tumoral : action pro ou anti-tumorale ?

Alors que les TILs exprimant des marqueurs de cytotoxicité sont généralement associés à un bon pronostic, les TILs identifiés comme suppresseurs (T-Reg), ont été initialement corrélés à une évolution défavorable de la tumeur. Ces résultats concordent avec l'idée générale que les T-Reg exercent une action suppressive de la réponse anti-tumorale par divers mécanismes explicités précédemment. Paradoxalement, des études ont déterminé que la présence de T-Reg dans le microenvironnement tumoral pouvait être également associée à un pronostic d'évolution favorable. La divergence entre ces résultats soulève nombre d'interrogations quant au rôle exact de ces cellules dans l'immunité tumorale. L'analyse détaillée de 58 publications relatant l'impact des T-Regs dans différentes pathologies cancéreuses, a permis d'apporter certains éléments de réponse (deLeeuw et al., 2012).

La définition phénotypique de T-Reg et une standardisation des techniques paraissent indispensables à l'évaluation de l'impact des T-Reg et plus particulièrement des T-Reg intra-tumoraux sur l'évolution de la maladie. L'expression de Foxp3 est admise de manière consensuelle comme caractéristique et discriminante de la population T-Reg. Or, en dehors des différences en termes de sensibilité et de spécificité liées au clone des anticorps utilisés pour la détection, FoxP3 peut être transitoirement exprimé au cours de l'activation des CD4 non suppresseurs (Allan et al., 2007; Wang et al., 2007). La combinaison avec d'autres marqueurs pertinents, tel Helios (Thornton et al., 2010) ou CCR4 (Baatar et al., 2007), ou encore l'étude de la méthylation de l'intron 1 de FoxP3 (Polansky et al., 2008), contribueraient à définir avec plus d'exactitude les relations établies entre l'abondance des T-Reg et l'évolution de la maladie. A titre d'exemple, dans les cancers de l'oropharynx, alors que les cellules FoxP3<sup>+</sup> dans leur ensemble n'ont pas de valeur pronostique, les CCR4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> sont significativement associés à une meilleure survie (Watanabe et al., 2010). Dans le cancer du rein, la co-expression d'Helios et de FoxP3 à la surface des CD4<sup>+</sup> périphériques a permis d'attribuer l'expansion des T-Regs observée à une origine thymique et non à un processus de conversion des CD4<sup>+</sup> dits conventionnels (Elkord et al., 2011). La détermination de l'origine des T-Regs constitue un aspect important dans la compréhension des mécanismes de tolérance mis en place lors du développement tumoral. Par ailleurs, il est nécessaire de prendre en considération que les CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> peuvent constituer une population hétérogène comprenant des cellules aux propriétés suppressives comme des cellules ayant perdu cette fonctionnalité (Miyara et al., 2009). En effet, Miyara et al. ont clairement démontré que les CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> pouvaient être classés en trois sous-populations : (1) les T-Regs non activés, naïfs CD45RA<sup>+</sup>FoxP3<sup>lo</sup>, (2) les T-Regs activés, mémoires/effecteurs CD45RA<sup>-</sup>FoxP3<sup>hi</sup>, ces deux sous-populations présentant toutes deux des fonctions suppressives, et enfin (3) les T-Regs CD45RA<sup>-</sup>FoxP3<sup>lo</sup>, effecteurs non suppresseurs capables de sécréter de l'IFN $\gamma$ , de l'IL-2 et potentiellement de l'IL-17. La définition de cette dernière population n'est pas sans rappeler la plasticité des T-Reg et leur possible conversion en Th17 évoquée dans la section Th17. Cette distinction de fonction à l'intérieur même des CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> est étayée par l'augmentation relative d'effecteurs CD45RA<sup>-</sup>FoxP3<sup>lo</sup> observée dans des formes actives de lupus érythémateux disséminé, maladie auto-immune systémique, en comparaison avec la sarcoïdose, maladie inflammatoire, et aux donneurs sains **figure 20**. En conclusion, cette étude montre que la fonctionnalité des T-Reg est sujette aux variations environnementales, et dépendante du contexte pathologique rencontré.

Dans cette perspective, le site de la tumeur, ses caractéristiques histologiques et moléculaires constitueraient des facteurs importants, pouvant orienter l'impact des T-reg sur le pronostic clinique. Dans les cancers colorectaux, Ladoire et al ont émis l'hypothèse que l'effet bénéfique des T-Regs constaté pourrait résulter du contrôle de l'inflammation

chronique promue par la translocation vers la tumeur de bactéries de la flore intestinale, translocation due à une probable augmentation de la perméabilité au niveau des jonctions serrées occasionnés par la nécrose ou l'ulcération à la surface de la tumeur (Ladoire et al., 2011a). Dans d'autres types de cancers, comme les carcinomes hépatocellulaires, la présence de T-regs semble unanimement associée à un mauvais pronostic (deLeeuw et al., 2012). Du reste, le cancer ne constitue pas une pathologie remarquable en soi mais doit être perçue comme un ensemble de maladies hétérogènes avec des profils génétiques et des altérations épigénétiques propres (Ogino et al., 2011). Les variations du retentissement des T-regs observées sur l'évolution d'un même type de tumeur pourraient par conséquent être attribuées à une hétérogénéité moléculaire intrinsèque. Cette hypothèse est confortée par les résultats obtenus dans les cancers colorectaux où l'augmentation de la fréquence de T-Regs infiltrant la tumeur est associée à une meilleure survie et constituerait un facteur prédictif indépendant uniquement chez les patients dont la machinerie de réparation des mésappariements est fonctionnelle (Frey et al., 2010). De même, dans les cancers du sein, la stratification des tumeurs en fonction de leur statut hormonal permettrait de distinguer des sous types où l'influence des T-Regs serait plus déterminante. Les patientes dont les tumeurs du sein expriment le récepteur à l'estrogène présentent un taux de T-Regs intra-tumoraux important qui définit un risque élevé de récurrence (Bates et al., 2006) **figure 21**.

L'analyse des études précédemment citées, révèlent que la détection d'un nombre élevé de cellules  $CD4^+FoxP3^+$  assimilés aux T-Regs, au sein de la tumeur, n'est pas univoque. Par conséquent, les stratégies thérapeutiques visant à effectuer une déplétion des T-Reg dans un contexte tumoral peuvent avoir un effet aussi bien bénéfique que délétère. Une meilleure caractérisation des T-Regs et une analyse systématique des paramètres environnementaux sont indispensables à la compréhension de leur rôle dans l'immunité tumorale. Au-delà d'une vision statique, l'étude du dynamisme de ces cellules au cours de la maladie permettrait de mieux comprendre leur implication dans l'évolution des cancers. Dans cette optique, le lien entre périphérie et tumeur semble incontournable, l'accès au site tumoral n'étant envisageable que lors d'exérèses chirurgicales. Un suivi longitudinal de leur évolution quantitative et qualitative, prenant en considération leur profil cytokinique, l'état de méthylation de FoxP3, la diversité de leur répertoire, ainsi que leur spécificité antigénique, constituerait une réelle avancée pour la prise en charge thérapeutique des patients.

## **6.6. Les lymphocytes T CD4 cytotoxiques**

### **6.6.1. Introduction**

Les lymphocytes T CD4 jouent un rôle prépondérant dans l'orientation de l'immunité anti-tumorale. Comme « *helpers* », ils vont contribuer à l'induction et au maintien d'une réponse immunitaire adaptative effectrice, alors qu'en tant que régulateurs ils vont constituer une entrave à l'immunité anti-tumorale. Ce rôle de pivot ne se limite pas à ces deux facettes. En effet, l'identification de LT CD4 dotés d'un potentiel cytotoxique direct (CD4 CTL) est source d'un intérêt tout particulier depuis ces dernières années. La présence dans le microenvironnement tumoral de CD4 CTL constitue un nouvel enjeu thérapeutique.

La capacité de certains LT CD4 effecteurs à présenter une activité cytotoxique dans un contexte antigénique CMH classe II restreint a été observé dans les années 1970 (Billings et al., 1977). Tout d'abord, cette nouvelle fonctionnalité fut considérée comme un artéfact, les clones CD4 à activité cytolytique étant issus de culture *in vitro* au long court (Jacobson et al., 1984) ou générés *in vivo* chez des souris déficientes en CD8 (Muller et al., 1992). Par la suite, l'identification de CD4 CTL *ex vivo* dans le sang périphérique de patients infectés de manière chronique par des virus divers tels que le Cytomegalovirus (CMV), le virus d'Epstein Barr (EBV), ou le virus de l'immuno-déficience humaine (VIH) a prouvé l'existence réelle de ces cellules (Appay et al., 2002; Casazza et al., 2006; Sun et al., 2002). La présence de ces dernières a été également mise en évidence dans d'autres pathologies, dans certaines infections bactériennes (Klucar et al., 2008), dans des maladies inflammatoires et également dans des pathologies auto-immunes (Namekawa et al., 1998). La génération de CD4 CTL ne semble donc pas liée à l'origine endogène ou exogène de la pathologie. En revanche, la présence de CD4 CTL apparaît liée à la chronicité de la maladie. Ces LT CD4 aux propriétés cytotoxiques sont d'ailleurs décrits comme présentant un phénotype de cellules « terminalement » différenciées, ce qui est caractéristique d'une stimulation antigénique chronique **figure 22**.

La fonction physiologique exacte des CD4 CTL humains reste cependant à déterminer. L'étude des CD4 CTL chez l'Homme est compliquée par le nombre limité d'épitopes restreints au CMH classe II identifiés à ce jour. Il existe donc peu d'outils d'analyse de type tétramers classe II.

À l'heure actuelle, les hypothèses qui ont été formulées sont purement spéculatives. Les CD4 CTL pourraient intervenir dans différents processus visant à renforcer l'action du système immunitaire : (i) en limitant l'extension des infections virales ayant pour cible les cellules exprimant les molécules du CMH de classe II ; (ii) en circonvenant à la perte d'expression des molécules du CMH classe I induite par certains pathogènes pour échapper à la réponse CD8 spécifique. Ce dernier mécanisme impliquerait un glissement préférentiel vers la présentation des antigènes classe II. Les CD4<sup>+</sup>CTL pourraient également constituer une sous-population de CD4 à part entière, dont la différenciation serait conditionnée par un contexte inflammatoire et d'activation définis ou encore représenter un stade de différenciation terminale de certains lymphocytes T « *helper* ».

## 6.6.2. Les CD4 CTL et l'immunité anti-tumorale

### 6.6.2.1. Introduction

La caractérisation d'épitopes classe II dérivés d'antigènes tumoraux chez l'Homme a permis d'isoler des clones de LT CD4 spécifiques de tumeurs capables de lyser des cellules tumorales dans un contexte CMH restreint *in vitro* (Manici et al., 1999; Schultz et al., 2000). La pertinence de leur rôle dans l'immunité anti-tumorale a été établie par induction d'une réponse anti-tumorale complète et durable, après réalisation, chez un patient atteint de mélanome, d'un transfert adoptif de lymphocytes T CD4 autologues spécifiques d'un antigène associé à la tumeur (Hunder et al., 2008) **figure 23**. Ces LT CD4 avaient été obtenus par expansion *in vitro* d'un clone spécifique d'un épitope de NY-ESO-1 reconnu dans un contexte CMH II restreint, DP04. NY-ESO-1 fait partie de la famille des « cancer testis antigens », exprimés dans un grand nombre de tumeurs d'origine histologique variée et absent des tissus sains, à l'exception des cellules germinales des testicules qui n'expriment pas de molécules du CMH. Bien que les mécanismes cellulaires conduisant au rejet de la tumeur restent non élucidés, une action cytotoxique directe des CD4 transférés ou générées lors du relargage d'antigènes par les corps apoptotiques au cours de la lyse tumorale ne peut être exclue. En effet, l'induction de réponses immunes contre des antigènes autres que ceux ciblés par l'immunothérapie a été précédemment démontrée par les travaux de Carnasco et al. (Carrasco et al., 2008). Hunder et al. ont montré, dans cette étude de cas, que le transfert adoptif de CD4 spécifiques de NY-ESO-1 ne modifiait pas le titre, déterminé avant traitement, des anticorps anti NY-ESO-1. Ils n'ont également pas mis en évidence d'immunoglobulines spécifique des antigènes tumoraux MART-1 et MAGE-3 à la suite de l'injection de ces LT CD4 autologues. Cependant, une réponse T de nature non déterminée, dirigée contre ces deux derniers antigènes associés à la tumeur, a été détectée dans le sang périphérique du patient après transfert adoptif. Ces éléments suggèrent que l'action des LT CD4 transférées serait de nature cytotoxique et donc que leur effet « *helper* » serait minime.

### 6.6.2.2. Caractérisation des CD4 CTL

- Chez la souris :

Très récemment, l'action tumoricide directe des CD4 a été mise en évidence dans différents modèles murins.

Dans un modèle murin de mélanome induit, Xie et al. ont montré que le transfert adoptif dans un hôte irradié, d'un faible nombre de CD4 naifs, TCR transgénique pour l'antigène de différenciation associé au mélanome : Trp1, entraînait la régression de tumeurs établies ainsi qu'une dépigmentation des souris (Xie et al., 2010). Ces CD4 Trp1<sup>+</sup> transférés étaient capables d'induire la régression tumorale en l'absence d'un apport exogène en cytokine ou de l'intervention d'autres cellules de l'immunité telles que les CD8<sup>+</sup>, B ou NK, confirmant le rôle cytotoxique de ces cellules.

Quezada et al. ont obtenus des résultats similaires qu'ils ont pu confirmer dans un second modèle murin de souris développant des mélanomes spontanés (Quezada et al., 2010). De manière semblable au modèle précédent, les auteurs ont démontré l'action cytotoxique de ces LT CD4 Trp1<sup>+</sup> capables de s'expandre, *in vivo* et de s'accumuler au site de la tumeur.

Après activation et différenciation, ces LT CD4 Trp1<sup>+</sup> induisaient la lyse de la tumeur de manière antigène spécifique dans un contexte CMH classe II restreint. Dans ce modèle, l'action anti-tumorale de ces LT CD4 cytotoxiques produisant de l'IFN $\gamma$ , du TNF $\alpha$  de l'IL-2 ainsi que du granzyme B, était fortement potentialisée par l'administration concomitante d'anti CTLA-A4, molécule de co-stimulation exprimée majoritairement à la surface des T-Reg induisant le dysfonctionnement des cellules dendritiques **figure 24**.

Le pouvoir cytotoxique des LT CD4 Trp1<sup>+</sup> a été confirmé dans un troisième modèle de lymphopénie induite par une chimiothérapie de type cyclophosphamide. Le transfert adoptif de LT CD4 Trp1<sup>+</sup>, était réalisé en combinaison avec un agoniste de la molécule de co-stimulation OX40 dans l'objectif de potentialiser la réponse effectrice (Hirschhorn-Cymerman et al., 2012). Cette approche a permis d'obtenir des réponses complètes et durables chez des souris porteuses de tumeurs avancées. L'accumulation dans le microenvironnement tumoral des LT CD4 Trp1<sup>+</sup> s'accompagne d'une augmentation du ratio Teff/T-Reg, déséquilibre décrit comme favorable à l'établissement d'une réponse immune anti-tumorale (Darrasse-Jeze et al., 2009). Ces LT CD4 Trp1<sup>+</sup> effecteurs présentent un phénotype de cellules dites « terminalement différenciées », déterminé par l'expression de KLRG1<sup>+</sup>. Leur activation serait dépendante de la voie de signalisation OX40. Leur fonction cytotoxique, caractérisée comme dans les études précédemment citées par la production de granzyme B, serait elle, sous le contrôle du facteur de transcription eomesodermin. Dans cette même étude, des réponses analogues à celles observées chez les souris porteuses de tumeurs homogènes pour l'expression de Trp1 ont été obtenues chez des souris porteuses de tumeurs chimères résultant de la co-injection au même site de lignées tumorales exprimant et n'exprimant pas Trp1<sup>+</sup> **figure 25**. L'induction locale par l'action anti-tumorale des CD4 spécifiques de Trp1<sup>+</sup>, d'un environnement inflammatoire propice au recrutement de cellules de l'immunité innée serait à l'origine de l'élimination des cellules ne présentant pas la même spécificité antigénique. Ces résultats ne sont pas sans rappeler ceux obtenus précédemment chez l'Homme par Hunder et al. . De même, ils n'excluent pas la génération de LT CD4 cytotoxiques endogènes consécutive au relargage d'antigènes tumoraux de spécificité autre lors de la lyse tumorale conduite par les CD4 Trp1<sup>+</sup>. La mise en évidence de CD4 cytotoxiques spécifiques de la tumeur d'origine endogène permettrait d'affirmer clairement la pertinence de ces cellules et démontreraient leur potentiel thérapeutique. Pour élucider ce point il aurait été intéressant, d'une part d'étudier l'expression antigénique des tumeurs chimères non rejetées **figure 25** et d'autre part d'observer la réponse immune dirigée contre ces mêmes tumeurs dans des hôtes Rag<sup>-/-</sup>.

Le potentiel cytotoxique de CD4<sup>+</sup>KLRG1<sup>+</sup> a également été corroboré dans un modèle murin de mélanomes induits traité par l'administration de cellules tumorales irradiées transduites par Flt3L : vaccin Fvax, en association avec un agoniste de 4-1BB (Curran et al., 2013). L'expression à la surface des cellules tumorales de Flt3L, facteur de croissance activateur des cellules myéloïdes favorisant le recrutement des DCs, joue ici le rôle d'adjuvant. La production de perforine ainsi que d'un grand nombre de sous types de granzyme par les cellules CD4<sup>+</sup>KLRG1<sup>+</sup> leur confèreraient un pouvoir cytotoxique élargi. La polarisation de ces LT CD4<sup>+</sup> en puissants effecteurs, médiateurs de la réponse anti-tumorale serait, comme suggéré dans l'étude précédente, déterminée par le facteur de transcription Eomesodermin. La mise en jeu de ce facteur de transcription serait conditionnée par la voie de signalisation 4-1BB. Ce membre de la famille des récepteurs aux TNF est exprimé après activation non seulement à la surface des lymphocytes mais aussi des cellules myéloïdes. Dans cette étude, les auteurs suggèrent que l'induction probable par la chimiothérapie d'un environnement cytokinique favorable à l'expansion de ces LT CD4 cytotoxiques, serait

potentialisé par l'engagement de 4-1BB à la surface des cellules myéloïdes. Cet engagement conduirait notamment à la sécrétion d'IL-27. La production d'IL-27 au côté d'autres cytokines apparaît déterminante pour le développement de ces cellules. Par ailleurs, Curran et al. ont montré par leur travaux que le spectre d'action de ces cellules pourrait être étendu à l'immunité antivirale, établissant ainsi que la génération des LT CD4 cytotoxiques n'est pas dépendante de l'origine de la pathologie. Cette dernière observation permet d'élargir le champ thérapeutique de ces cellules.

- Chez l'homme :

Comme évoqué précédemment, l'étude des CD4<sup>+</sup>CTL chez l'homme reste complexe. Le nombre limité d'épitopes spécifiques de tumeurs restreints au CMH classe II identifiés à ce jour et l'absence d'outils adéquats permettant leur caractérisation *ex vivo* tant sur le plan quantitatif que qualitatif, constitue un obstacle à la compréhension de leur développement et de leur mode d'action. La capacité des LT CD4 à acquérir des fonctions cytotoxiques semblent cependant constituer une réalité, que ce soit dans un contexte d'infections virales ou bactériennes persistantes, dans des maladies inflammatoires ou encore dans des pathologies auto-immunes. Les cancers partageant nombre de critères avec les pathologies évoquées ci-dessus : chronicité, inflammation ou encore auto-réactivité, nous nous attacherons dans ce paragraphe à identifier les caractéristiques phénotypiques pertinentes établies dans ces différents environnements afin de cibler plus spécifiquement les CD4 CTL et d'entrevoir les mécanismes moléculaires et cellulaires potentiellement impliqués dans leur développement.

La stimulation des lymphocytes CD4 induit leur différenciation en cellules effectrices présentant des caractéristiques phénotypiques singulières associées à des propriétés fonctionnelles distinctes (Sallusto et al., 2004). L'expression différentielle de CD45RA, CD45RO, CCR7 et CD27 à la surface des cellules permet la distinction entre le compartiment naïf et le compartiment « antigen experienced » soit les cellules mémoires/effectrices. De manière générale, les profils d'expression CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> et CD45RA<sup>+/+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> déterminent respectivement les phénotypes naïf, mémoire et effecteur des lymphocytes T. Classiquement, l'exposition à une stimulation chronique se traduit par l'accumulation de LT CD4 arborant un phénotype de cellules effectrices incluant les marqueurs de sénescence : KLRG1 et CD57. Elles ont alors été définies comme des cellules « terminalement différenciées » aux capacités répliquatives réduites (Strioga et al., 2011). Cependant, la caractérisation phénotypique de ces cellules effectrices telle qu'elle a été initialement établie apparaît plus complexe. En effet, la réexpression de CD45RA dans le compartiment CD27<sup>-</sup> délimiterait une sous-population de LT CD4 effecteurs dont l'activité télomérase serait inhibée en comparaison aux cellules CD45RA<sup>-</sup>, amenant à reconsidérer le caractère « exhausted » de ces LT CD4 effecteurs (Di Mitri et al., 2011). Chez des sujets infectés par le cytomégalovirus, infection persistente, la réexpression de CD45RA dans les effecteurs CD27<sup>-</sup> est coordonnée à une diminution du niveau d'expression de CD28, molécule de co-stimulation et de CD127, chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-7 **figure 26**. Ces effecteurs, fonctionnels puisque sans restriction apparente de réactivité à d'autres antigènes, présentent un fort potentiel cytotoxique révélé par l'augmentation de la production accrue de Granzyme B et de perforine (Libri et al., 2011).

La perte d'expression de CD127, évoquée précédemment, associée à l'absence d'expression de CD25, chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2, pourrait également déterminer une sous-population de LT CD4 aux propriétés cytotoxiques. L'expression différentielle au sein de la population CD4 de ces deux marqueurs, chez des patients infectés par le VIH avec une

charge virale détectable mais asymptomatiques, comme chez les donneurs sains, a permis de mettre en évidence trois sous-populations : (1) les CD127<sup>+</sup>CD25<sup>low/-</sup> sous-population incluant des CD4 de phénotype naïf, mémoire et effecteurs (2) les CD127<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> sous-population caractérisée par une forte proportion de cellules effectrices et (3) les CD127<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup> sous-population définissant les cellules T-Reg exprimant FoxP3 (Dunham et al., 2008). Indépendamment du statut viral, sujets infectés ou donneurs sains, la majorité des LT CD4, CD127<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> semblait présenter des caractéristiques communes, alliant la perte de CD28 et l'expression de perforine. Les auteurs suggéraient par la très relative corrélation observée entre l'expansion de cette population et l'augmentation de la charge virale, que ces cellules pouvaient être un indicateur de la progression de la maladie. Or, en l'absence d'une corrélation inverse directe entre la fréquence des CD4<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> et le développement d'un syndrome d'immunodéficience acquise, l'éventualité que l'expansion de ces cellules reflète une réponse antivirale active permettant de contenir efficacement la maladie à un stade asymptomatique ne peut être exclue.

Les maladies auto-immunes, telles que la sclérose en plaque et la polyarthrite rhumatoïde, représentent des pathologies dans lesquelles les lymphocytes T et notamment les CD4 jouent un rôle clé dans le déterminisme de la maladie. Les connaissances acquises sur la fonction de ces LT CD4 capables d'orchestrer une réponse immune auto-réactive échappant aux mécanismes de tolérance périphérique pourraient être transposées aux réponses anti-tumorales liées aux LT CD4 cytotoxiques. La perte d'expression de CD28, molécule de co-stimulation constitutivement exprimée à la surface des CD4 semble une caractéristique majeure des CD4 auto-réactifs. Classiquement, l'activation des CD4 entraîne une diminution transitoire de l'expression de CD28 à leur surface. Chez les patients atteints de sclérose en plaque et de polyarthrite rhumatoïde présentant un pourcentage de lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> circulants très augmenté, l'absence d'expression de CD28 semble pérenne et limitée à la population CD4 effectrice. Au-delà de la conséquence d'une stimulation chronique, cette perte d'expression suggérerait l'utilisation de voies de co-stimulation alternes. Leur mise en jeu pourrait conduire à l'acquisition de propriétés fonctionnelles singulières. Dans cette perspective, plusieurs auteurs ont mis en évidence l'acquisition de marqueurs originels des cellules NK à la surface des lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (Fasth et al., 2010; Pinto-Medel et al., 2012). Fasth et al. ont montré que 2B4, molécule de co-stimulation, était préférentiellement exprimée à la surface des CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> *figure 27*. L'expression de 2B4 est généralement associée à l'acquisition d'un phénotype effecteur et à des fonctions cytotoxiques. Elle contribuerait au maintien de l'activation et à la prolifération des lymphocytes T (Altvater et al., 2009). L'amplification du signal TCR liée à l'engagement de 2B4 permettrait de palier à des conditions d'activation suboptimales.

Antérieurement, l'augmentation de CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> a également été constatée chez un faible nombre de donneurs sains (Morishita et al., 1986; Morishita et al., 1989). Les auteurs ont montré que le répertoire de ces CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> qui co-expriment par ailleurs le CD11b, chaîne  $\alpha$  de l'intégrine  $\beta$ 2, était restreint, traduisant l'expansion oligoclonale de ces cellules. La caractérisation sur le plan morphologique de ces cellules révèle la présence d'un grand nombre de granules cytoplasmiques. Ces deux éléments laissent à penser que les CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> décrits chez les donneurs sains par Morishita et al., sont des CD4 effecteur/mémoires potentiellement cytotoxiques.

Plus récemment, l'induction de CD11b coordonnée à la perte de CD28 dans les CD4 a été décrite au cours d'infections bactériennes persistantes consécutives à l'implantation de prothèses (Kotsougiani et al., 2010). Selon les auteurs, par analogie avec les CD8 activés

CD11b<sup>+</sup> (Nielsen et al., 1994), le CD11b permettrait le recrutement de CD4 activés dans les tissus non lymphoïdes, expliquant l'accumulation de CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> au site de l'infection.

Le syndrome coronarien aigu induit également une augmentation de lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>. L'accumulation préférentielle de ces cellules au niveau des plaques d'athérome serait à l'origine des instabilités entraînant leurs ruptures. Dimitriu et al. ont montré que ces CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> exprimaient à leur surface les molécules de co-stimulation OX40 et 4-1BB. En l'absence de CD28, le signal d'activation serait transmis par l'engagement de 4-1BB et OX40. La transduction du signal via OX40 et 4-1BB permettrait la régulation de la fonction effectrice de ces cellules, se traduisant par la sécrétion des cytokines inflammatoires IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$  et par la production de molécules liées à la cytotoxicité, perforine et granzyme B. L'activation de ces lymphocytes CD4 *in vitro* par un anti-CD3 entraîne une diminution du niveau de granzyme B et de perforine corrélée à l'expression de CD107a, protéine lysosomiale associée à la membrane. Cette observation démontre la capacité de ces cellules à relarguer leur granules, pré-requis indispensable à la cytolyse. La combinaison d'un anti-CD3 avec un anticorps bloquant dirigé contre les molécules OX40 ou 4-1BB va inhiber l'expression de Cd107a tout en restaurant le niveau de production de granzyme B et de perforine démontrant l'implication de ces molécules de co-stimulation dans la fonction cytotoxique de ces CD4 et notamment dans l'induction de la dégranulation **figure 28 et 29**. Les ligands respectifs d'OX40 et de 4-1BB exprimés à la surface des monocytes et des cellules composant les plaques d'athérome pourraient être responsables de la lyse spécifique des plaques en déclenchant la dégranulation des CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>.

Ces résultats établissent un lien entre les CD4 cytotoxiques caractérisés chez les souris (Hirschhorn-Cymerman et al., 2012; Quezada et al., 2010) dans un contexte tumoral et les CD4 cytotoxiques identifiés chez l'Homme, et mettent en avant certains mécanismes moléculaires. Cependant se pose la question de l'antigène spécificité de ces cellules, même si l'activité lytique de ces cellules semble nécessiter une stimulation du TCR. L'intégration de ces données permet de mieux discerner les particularités phénotypiques des CD4 cytotoxiques chez l'Homme et la diversité de leur champ d'action **table 1**. Elle permet également de concilier, en partie, les caractéristiques émanant de l'étude des LT CD4 après transferts adoptifs dans un contexte tumoral chez la souris, et celles observées chez l'Homme, dans des situations pathologiques diverses. Ces caractéristiques comprennent : (i) l'expression d'OX40, de 4-1BB et de la présence de molécules directement cytotoxiques (granzyme, perforine) ; (ii) un phénotype effecteurs évoquant un stade de différenciation terminale. Cependant, de nombreuses interrogations subsistent quant aux mécanismes conduisant à la différenciation de CD4 cytotoxiques chez l'Homme. Chez la souris, le facteur de transcription eomesodermin semble jouer un rôle critique dans l'établissement et/ou la fonction de CD4 aux propriétés cytotoxiques. Chez l'Homme, son implication dans la polarisation des CD4 n'est que suggérée, l'induction d'eomesodermin ayant été observée qu'*in vitro* après stimulation de clones CD4 spécifiques de NY-ESO-1 par OX40 (Hirschhorn-Cymerman et al., 2012). Le contrôle de la différenciation en CTL des lymphocytes CD4 par la modulation de facteurs de transcription reste à définir et sera discuter dans la section discussion et perspectives. De même, la signification de la perte ou de la non-expression de certains marqueurs (CD28, CD127, CD25) et inversement, de l'expression ou la ré-expression spécifiques de certaines molécules (2B4, CD11b, CD45RA) reste à définir. Sont-elles une cause ou une conséquence du processus de différenciation ? Par exemple, la perte de CD28 identifiée dans des conditions de stimulation chronique, pourrait être perçue comme un mécanisme compensatoire et/ou protecteur, reflétant une adaptation aux variations

environnementales mais aussi comme une prédisposition de certains LT CD4 à développer des caractéristiques cytotoxiques.

**Table 1**

<b>Marqueurs</b>	<b>Fonctions putatives suggérées</b>
CD45RO <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> CCR7 <sup>-</sup>	Définition d'un phénotype effecteur
KLRG1 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup> ?	Définition d'effecteurs différenciés de manière terminale
CD45RA <sup>+</sup> (réexpression)	Maintien et survie lié à une réduction de l'activité télomérase
CD28 <sup>-</sup>	(1)Caractéristique des effecteurs différenciés de manière terminale (2)Réponse à une stimulation chronique (3)Réponse à un déficit de la voie classique d'activation lié à un défaut de maturation des CPAs (4)Inhibition coordonnée à la mise en place de voies de co-stimulation alternes orchestrée par un facteur de transcription ou autre mécanisme régulateurs ?
OX40 <sup>+</sup> 4-1BB <sup>+</sup>	(1)Voies de co-stimulation alternes (2)Initiateur de la cytotoxicité
2B4 <sup>+</sup>	Maintien du signal TCR en réponse à une activation suboptimale
CD127 <sup>-</sup> CD25 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>-</sup>	Délinéament d'effecteurs cytotoxiques
CD11b <sup>+</sup>	(1)Migration vers les tissus non lymphoïdes (2)Marqueur d'activation récente
Perforine, Granzyme B et granules cytotoxiques	Cytotoxicité directe

## **6.7. Conclusion : les LT CD4 et l'immunité anti-tumorale naturelle**

### **6.7.1. Les LT CD4 : populations plurifonctionnelles adaptatives**

L'étude de l'immunité anti-tumorale naturelle dépendante des LT CD4 souligne le rôle plurifonctionnel de ces cellules dans le développement tumoral. La tumeur constitue un tissu où les LT CD4 aux côtés des autres cellules de l'immunité adaptative et innée, vont exercer leurs propriétés pro ou anti-tumorales. La nature opposée de ces actions résulte en partie, en la capacité adaptative de ces cellules, dotées d'une plasticité fonctionnelle leur permettant de répondre aux facteurs environnementaux. L'analyse des infiltrats tumoraux et du sang périphérique indique clairement que la diversité qualitative et quantitative des LT CD4 est dépendante du type de tumeur et de son stade d'évolution. Les préceptes selon lesquels les LT CD4 seraient limités à un rôle de soutien de la réponse immune, par leur aide au développement et à l'instauration d'une mémoire CD8 spécifique, ainsi que par leur participation à la maturation des cellules dendritiques et à la différenciation des LB en plasmocytes, ont été transcendé par la mise en évidence de sous-populations distinctes des Th1 et Th2 : les Th17, T<sub>FH</sub> et T-Reg. Les T-Regs naturels sont considérés comme une population à part entière du fait de leur origine thymique et de l'expression stable du facteur de transcription FoxP3 contrairement aux autres sous-populations, Th1, Th2, Th17 et T<sub>FH</sub> qui résultent de la différenciation en périphérie de précurseurs naïfs : LT CD4 Th0. L'acquisition de propriétés fonctionnelles singulières dépendraient d'une succession d'étapes conduisant les cellules d'un état instable vers un état stable (Knosp and Johnston, 2012; Oestreich and Weinmann, 2012) *figure 30*.

#### **6.7.1.1. Stabilité des facteurs de transcription**

Le circuit transcriptionnel qui contribue à renforcer ou à déstabiliser l'expression de facteurs de transcription spécifiques d'une sous-population pourrait être à l'origine de déséquilibres conditionnant l'activité pro ou anti-tumorale des sous-populations LT CD4. La conversion entre sous-populations dépendrait de la stabilité des facteurs de transcription. La génération de T-Regs induits à partir de CD4 naïfs ou la conversion de Th17 en Th17 Foxp3+ en sont des exemples.

#### **6.7.1.2. Influence de l'environnement**

La polarisation des LT CD4 en une population distincte est déterminée par les composantes moléculaires et cellulaires du microenvironnement dans lequel ces cellules se trouvent. Cytokines et molécules de co-stimulations sont des facteurs essentiels à la différenciation des sous-populations de LT CD4 en effecteurs aux propriétés singulières. En effet, la sécrétion de cytokines est modulée par les voies de signalisation mise en jeu lors des interactions entre LT CD4 et CPAs, impliquant les molécules de co-stimulation exprimées à la surface de ces deux types cellulaires. Par exemple, l'IL2 et l'expression d'ICOS pourrait être déterminants dans l'engagement vers la voie Th1 ou T<sub>FH</sub> (Oestreich et al., 2012) *figure 31*. Le microenvironnement tumoral jouerait un rôle majeur dans le déterminisme des populations présentes au sein de la tumeur. Il pourrait influencer la différenciation des LT CD4 des structures lymphoïdes tertiaires adjacentes à la tumeur.

La composition de l'infiltrat lymphoïde dans la tumeur pourrait également être régulée par d'autres facteurs solubles, les chimiokines, qui conditionneraient le recrutement préférentiel d'une sous-population particulière. En effet, la sécrétion de CCL20 et CXCL12 par les cellules tumorales, favoriserait le recrutement des Th17 (Bell et al., 1999; Kryczek et al., 2005). De même, CCL22, CCL17 ou encore CCL28 sont déterminants pour la migration de T-Regs au sein de la tumeur (Facciabene et al., 2011; Faget et al., 2011; Mishalian et al., 2014). Le trafic des Th1 vers la tumeur est principalement conduit par CXCL9, lui-même inductible par la sécrétion d'IL-17 par les Th17 (Kryczek et al., 2009). Dernièrement, CXCL13, chimioattractant des T<sub>FH</sub>, a été défini comme un facteur pronostique de l'évolution des cancers du sein (Gu-Trantien et al., 2013).

## **6.7.2. Les lymphocytes T CD4 dans les cancers**

Dans cette première partie le rôle des LT CD4 dans l'immunité tumorale a été mis en lumière. Cependant, à l'exception des Th1 (Fridman et al., 2012), l'activité pro ou anti-tumorale de chacune des sous-populations de LT CD4, n'est pas complètement élucidée et parfois soumise à controverse. Dans le sang périphérique, la variation quantitative des sous-populations lymphocytaires au cours de la maladie n'est mesurable que sous traitement. La corrélation entre l'évolution de la maladie et les lymphocytes circulants ou intra-tumoraux, est établie en fonction du grade de la tumeur. En raison de ces contraintes, la détermination du rôle des sous-populations de LT CD4 dans la progression tumorale est souvent parcellaire, mais permet néanmoins de souligner les éléments essentiels à une meilleure compréhension de la séquence des événements pouvant influencer sur le développement tumoral.

### **6.7.2.1. Distribution**

L'analyse coordonnée des sous-populations dans les différents compartiments, sang périphérique, tumeurs et ganglions lymphatiques, permet de définir la répartition des LT CD4. L'accumulation ou la diminution dans l'un ou l'autre de ces compartiments en fonction du stade de la tumeur, renseigne sur la capacité de certaines sous-populations à gagner plus spécifiquement la tumeur et ainsi leur concours dans l'évolution de la maladie. Curiel et al., en caractérisant les T-reg dans la tumeur, l'ascite et le sang périphérique des patientes atteintes de cancer de l'ovaire, ont pu montrer une accumulation de T-Reg dans la tumeur en fonction de son grade. La proportion de T-Reg était inversement proportionnelle entre tumeurs et ganglions, suggérant que le recrutement des T-regs, potentiellement expansés dans les ganglions, serait un événement majeur contribuant à l'immunosuppression, favorable au développement de la tumeur (Curiel et al., 2004).

### **6.7.2.2. Coopération**

La coopération entre les différentes sous-populations lymphocytaires constitue également un facteur important dans l'établissement de l'immunité anti-tumorale. La variation du ratio entre les différents sous-populations ou l'accumulation concomitante de populations définissant une activité pro ou anti-tumorale, permettent de discerner les relations entre sous-types lymphocytaires. Dans les tumeurs de l'ovaire, Kryczek et al., ont montré que la présence de Th17 dans l'environnement tumorale était étroitement corrélée à l'augmentation de LT CD4 et CD8 produisant de l'IFN $\gamma$ , et inversement proportionnel au

pourcentage de T-Regs infiltrant la tumeur, suggérant le rôle coopératif des Th17 dans le recrutement de LT CD4 et CD8 effecteurs au sein de la tumeur (Kryczek et al., 2009).

### **6.7.2.3. Spécificité antigénique**

L'identification de LT CD4 spécifiques de la tumeur permet d'établir un lien direct entre l'expansion d'une sous-population et la tumeur. Le manque d'outils (tétramers classe II) et la faible fréquence de cellules répondeuses, en l'absence de traitement, limitent considérablement leur mise en évidence. Cependant, dans les cancers ovariens, Ayyoub et al., ont pu montrer, pour la première fois, dans l'ascite et la tumeur des patientes en comparaison au sang périphérique, une accumulation de LT CD4 de profil Th1, spécifiques de l'antigène tumoral NY-ESO-1. Cette étude, souligne clairement que des LT CD4 spécifiques de la tumeur peuvent être générés au cours du développement tumorale et rejoindre la tumeur.

### **6.7.2.4. Structures lymphoïdes associées à la tumeur**

L'architecture de la tumeur définie par l'intensité de l'infiltrat lymphocytaire et la présence de structures lymphoïdes tertiaires (SLT) associée, constitue une composante important de l'immunité tumorale. Dans les cancers du sein, Gu-Trantien et al., ont mis en évidence la corrélation entre densité de l'infiltrat lymphocytaire et de SLTs. Ces observations étaient en relation avec l'évolution de la maladie. En effet, dans cette étude, la présence de T<sub>FH</sub> qui représentent un constituant cellulaire majeur des SLTs puisqu'à l'origine du développement de centres germinatifs, définissait un facteur de bon pronostic (Gu-Trantien et al., 2013).

L'ensemble de ces informations souligne le rôle fondamental des LT CD4 dans l'orchestration de la réponse immune anti-tumorale. Un déséquilibre entre les différentes populations qui les composent, serait décisif quant à l'évolution de la maladie.

## **6.7.3. CD4 cytotoxiques parmi les autres sous-populations**

Les mécanismes conduisant à la différenciation de LT CD4 cytotoxiques chez l'Homme ne sont pas connus et de nombreuses questions restent encore en suspens : (i) Cette population représente-t-elle un stade de différenciation terminale des Th1 ou bien une voie de différenciation distincte des LT CD4 ? (ii) L'acquisition de propriétés cytotoxiques implique-t-elle une modulation ou une expression spécifique de certains facteurs de transcription? Si le facteur de transcription eomesodermin semble jouer un rôle critique dans l'établissement et/ou la fonction de ces LT CD4, les mécanismes moléculaires conduisant à son expression ne sont pas définis (Curran et al., 2013; Hirschhorn-Cymerman et al., 2012).

La synthèse des études où les LT CD4 cytotoxiques sont impliquées, a permis de sélectionner des marqueurs d'intérêts pouvant potentiellement permettent de les distinguer des autres populations de LT CD4. Ces caractéristiques phénotypiques permettront de mieux définir ces cellules et d'en évaluer le rôle dans les cancers, ce qui constitue l'objectif de ce travail. Leur présence dans nombre de pathologies chroniques, suggère qu'elles pourraient jouer un rôle décisif dans l'évolution des cancers. Leur capacité à induire la régression de tumeurs a été démontrée chez la souris mais, chez l'Homme, leur fonction dans l'immunité anti-tumorale demeure hypothétique.

## **7. Chimiothérapie et LT CD4 effecteurs : modulation de l'immunité anti-tumorale naturelle**

L'objectif de ce travail était également d'évaluer l'impact de la chimiothérapie sur le système immunitaire. Ce chapitre permettra d'extraire de la littérature les informations relatives aux interactions d'un traitement par des agents chimiques avec l'immunité anti-tumorale.

### **7.1. Introduction**

L'analyse des différentes sous-populations de lymphocytes CD4 effecteurs « pro-inflammatoires » ou directement cytotoxiques dans un contexte tumoral, démontre le rôle crucial de ces cellules dans la réponse immune anti-tumorale effectrice. Parallèlement, les propriétés immuno-stimulatrices des chimiothérapies conventionnelles mises en exergue ces dernières années, montrent que certains de ces agents antinéoplasiques constituent une composante importante dans la stimulation de l'immunité anti-tumorale naturelle *figure 32*. L'intégration de ces informations pourrait concourir à mieux définir les mécanismes moléculaires et cellulaires contribuant à l'activité anti-tumorale du système immunitaire. Une immunité protectrice et durable permettrait d'assurer le contrôle de la progression tumorale et/ou la prévention de récives, parallèlement aux effets de la chimiothérapie. La maîtrise de ces éléments est essentielle à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques combinant immunothérapies et chimiothérapies. Dans cette optique, nous tenterons de déterminer l'impact des chimiothérapies sur le phénotype et la fonction des LT CD4.

### **7.2. Les mécanismes de modulation de la réponse immune par les chimiothérapies**

#### **7.2.1. Induction d'une mort dite immunogénique des cellules tumorales**

La majorité des chimiothérapies dites « classiques » ou « conventionnelles » ont pour principe actif des molécules antiméitotiques qui vont cibler préférentiellement les cellules néoplasiques présentant un fort taux de prolifération, induisant ainsi leur destruction. Certains agents antinéoplasiques ont été décrits comme pouvant induire une mort « immunogénique » des cellules tumorales (ICD : Immunogenic Cell Death)(Vacchelli et al., 2012a). La mort immunogénique des cellules tumorales est caractérisée par l'émission de signaux suivant une séquence spatio-temporelle définie. Reconnus par le système immunitaire, ils pourront initier une réponse anti-tumorale active *figure 33*. L'exposition de protéines intracellulaires à la surface des cellules tumorales au stade pré-apoptotique augmenterait la capacité de phagocytose des corps apoptotiques par des cellules dendritiques. Les protéines impliquées dans ce mécanisme sont la Calreticuline et l'ERp57 (Obeid, 2008; Obeid et al., 2007), protéines chaperonnes du réticulum endoplasmique, et les protéines de choc thermique : HsP90, HsP70 (Fucikova et al., 2011). Pendant la phase précoce du processus d'apoptose, les cellules tumorales vont libérer de l'ATP qui va interagir avec le récepteur purinergique

P2RX7 des cellules dendritiques. Cette interaction permet l'activation et l'oligomérisation de la protéine NLRP3 en inflammasome. L'activité protéolytique du complexe caspase-1 des inflammasomes NLRP3 formés permettra le clivage de la forme inactive de l'IL-1 $\beta$  : la pro-IL-1 $\beta$ , en forme active, l'IL-1 $\beta$  qui sera sécrétée. L'IL-1 $\beta$ , cytokine pro-inflammatoire, va alors conduire à la production d'IFN $\gamma$  essentielle à l'activation du système immunitaire (Aymeric et al., 2010; Elliott et al., 2009). Plus tardivement, l'initiation du processus d'apprêtement et de présentation croisée des antigènes tumoraux de manière efficiente par les cellules dendritiques sera conditionner par la fixation sur leurs Toll Like Receptor de type 4 de la molécule HMGB1 (High Mobility Group Box 1), relarguée par les cellules tumorales post-apoptotiques (Apetoh et al., 2007). La plupart de ces mécanismes décrits, ont été établis à partir de modèles murins ou d'essais *in vitro* utilisant des lignées cellulaires. Des études chez l'Homme, tendent cependant à confirmer l'effet de certaines chimiothérapies dans l'établissement d'une réponse immune anti-tumorale par l'induction d'une mort immunogénique des cellules tumorales. La perte de fonction de TLR-4 et P2RX7 lié au polymorphisme est associée à un risque accru de récurrences métastatiques chez les patientes atteintes de cancer du sein traitées par une chimiothérapie adjuvante (post-chirurgicale) à base d'anthracycline (Apetoh et al., 2007; Ghiringhelli et al., 2009). De même, dans des stades avancés de cancer du côlon traité par oxaliplatine, la survie sans progression ainsi que la survie globale étaient diminuées chez les patients présentant une fonction de TLR-4 altérée en comparaison aux patients où cette fonction était conservée (Tesniere et al., 2010). En revanche, dans les cancers du poumon non à petites cellules traités par cisplatine, cette perte de fonction allélique ne semble pas affecter l'évolution clinique des patients (Vacchelli et al., 2012b). Ces résultats suggèrent que l'induction de la mort immunogénique par la chimiothérapie pourrait être dépendante de la chimiothérapie et/ou du type de tumeur.

### 7.2.2. Augmentation de l'immunogénicité des cellules tumorales

D'autres mécanismes ancillaires liés aux drogues antinéoplasiques peuvent également stimuler l'immunogénicité des cellules tumorales. En effet, la chimiothérapie peut conduire à l'augmentation de l'expression d'antigènes tumoraux et de molécules du CMH classe I. *In vitro*, des essais de compétition mélangeant des cellules tumorales issues de lignées de cancer du sein ou du poumon traitées ou non par le 5-fluorouracile, et marquées au chrome radioactif, ont permis de démontrer que la lyse des cellules tumorales par des clones T spécifiques était dépendante de l'expression de l'antigène à la surface des cellules tumorales et que cette dernière était conditionnée par le 5-fluorouracile (Correale et al., 2003). La chimiothérapie peut également moduler l'expression à la surface des cellules tumorales de molécules inhibitrices, telle que PDL-1 récepteur de la molécule PD1 impliquée dans l'inhibition des lymphocytes T. Ghebeh et al ont montrés qu'*in vitro*, le traitement par la doxorubicine de cellules tumorales issues de lignée de cancer du sein, induisait une diminution de l'expression de PDL-1 à leur surface. Ils ont confirmé ces résultats dans un modèle de xénogreffe chez la souris. Les auteurs ont montré que l'effet de la doxorubicine conduisait en réalité à une redistribution de l'expression de PDL-1 qui se trouvait augmentée dans le noyau des cellules tumorales après traitement. Cette localisation nucléaire entraînait l'apoptose spontanée des cellules tumorales et accroissait leur sensibilité à la doxorubicine. La sensibilité des cellules tumorales à la doxorubicine favoriserait l'activation et l'action des cellules de l'immunité en modulant l'expression de PDL-1. Ces données suggèrent un lien entre la chimiorésistance et l'immuno-résistance des cellules tumorales. (Ghebeh et al., 2010). Enfin, la chimiothérapie pourrait aussi augmenter la sensibilité des cellules tumorales à la lyse par des clones T spécifiques de faible affinité selon des mécanismes dépendant de FAS et du couple perforine/granzyme B. *In vitro*, le 5-fluorouracile conduirait à l'expression de FASL,

le récepteur de FAS, à la surface de cellules tumorales, les rendant ainsi plus sensibles à la lyse par des lymphocytes T spécifiques présentant un TCR de faible affinité pour l'antigène (Yang and Haluska, 2004).

### **7.2.3. La modulation de l'immunosuppression**

Pour échapper à l'immunosurveillance naturelle ou à l'action d'immunothérapies, la tumeur peut mettre en place des dispositifs qui vont contribuer à atténuer la réponse immune anti-tumorale. La subversion du système immunitaire par la tumeur peut impliquer des mécanismes passifs tels que la perte d'expression à la surface des cellules tumorales de molécules du CMH classe I, ou d'antigènes tumoraux. L'induction et/ou le recrutement préférentiel de cellules immunitaires à vocation immunosuppressive comme les T-Regs ou les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) constituent également un moyen d'atténuer activement la réponse anti-tumorale (Hanahan and Weinberg, 2011). Certaines chimiothérapies peuvent potentialiser l'immunité anti-tumorale en inhibant l'activité des cellules immunosuppressives.

L'effet des chimiothérapies sur les MDSC est controversé et les données de la littérature tendant à montrer la capacité de certaines drogues antinéoplasiques à éliminer ces cellules immunosuppressives ou à favoriser leur polarisation vers un phénotype « M1-like » (phénotype des macrophages de type 1 aux propriétés anti-tumorales à l'inverse des macrophages de type 2 « M2-like » contribuant à la progression tumorale) sont uniquement issues d'études de modèles murins (Kodumudi et al., 2010; Nakahara et al., 2010; Vincent et al., 2010).

L'inhibition de l'activité suppressive des T-regs par de faibles doses de cyclophosphamide a été suggérée dans les années 1980 par les travaux de North et al. (Awwad and North, 1988; North, 1982). La sensibilité des T-Regs au cyclophosphamide serait liée à l'expression plus importante de molécules pro-apoptotiques à leur surface, en comparaison aux autres types de lymphocytes T (Kasprowicz et al., 2005) et à leur capacité de renouvellement élevée (Miyara et al., 2009), rendant ainsi les T-Reg plus susceptibles à l'apoptose.

Chez l'homme, l'administration de faibles doses de cyclophosphamide à intervalles réguliers, schéma thérapeutique qualifié de métronomique, a montré l'efficacité de cette molécule dans le traitement de cancers métastatiques (Samaritani et al., 2007). Son effet immunomodulateur sur les T-Regs a été démontré par l'immunomonitoring phénotypique et fonctionnel des T-Regs chez 9 patients porteurs de tumeurs métastatiques avancées, d'origines diverses, et traités par l'administration métronomique de cyclophosphamide. Dans le sang périphérique de ces patients, le nombre de T-Regs ainsi que leur fonction inhibitrice étaient considérablement diminués après un mois de traitement. Parallèlement, la capacité proliférative des lymphocytes T et les propriétés cytotoxiques des cellules NK apparaissaient stimulées (Ghiringhelli et al., 2007). Dans cette étude, la dose de cyclophosphamide administrée s'est révélée déterminante pour la déplétion sélective de T-Regs. A des doses plus élevées, le cyclophosphamide entraînait une lymphopénie touchant indistinctement les populations lymphocytaires CD4 et CD8. D'autres chimiothérapies ont été identifiées comme ayant un effet inhibiteur sur les T-Regs. Dans les leucémies lymphoïdes chroniques, une diminution significative de la fréquence et de la fonction des T-Regs a été observée chez les patients traités par fludarabine en comparaison aux patients non traités (Beyer et al., 2005). Le paclitaxel serait également capable d'induire une diminution sélective du taux de T-Regs dans les cancers avancés du poumon non à petites cellules (Zhang et al., 2008). L'impact réel sur le développement tumoral de l'inhibition quantitative et qualitative des T-Regs induite par ces

chimiothérapies reste à définir. Néanmoins, la mise en évidence de ces propriétés additionnelles sur les T-Reg, désigne ces molécules comme des molécules de choix dans la définition des stratégies visant à associer immunothérapie et chimiothérapie.

#### **7.2.4. La prolifération homéostatique induite par la lymphopénie consécutive à la chimiothérapie**

Parmi les altérations quantitatives décrites chez les patients recevant une chimiothérapie, la lymphopénie est fréquemment observée notamment aux stades avancés (20-30% des tumeurs métastatiques). Dans différents type de tumeurs, une lymphopénie sévère a été associée à une diminution de la survie chez les patients (Ray-Coquard et al., 2009). La lymphopénie consécutive à la chimiothérapie pourrait également constituer un facteur de mauvais pronostic lié à une diminution de la survie (Balmanoukian et al., 2012). Les traitements standards utilisant des agents antinéoplasiques cytotoxiques peuvent conduire à la suppression de la réponse immune par cytotoxicité directe sur les cellules de l'immunité. La co-administration de glucocorticoïdes permettant de limiter les effets secondaires des chimiothérapies, notamment des taxanes, s'oppose également à l'établissement de réponses immunes, la corticotérapie engendrant par elle-même une immunosuppression profonde.

Paradoxalement, la lymphodéplétion induite par la chimiothérapie a été envisagée comme pouvant stimuler la réponse immune après vaccination anti-tumorale. Chen et al. ont référencé nombre d'essais cliniques associant chimiothérapie et vaccination anti-tumorale selon diverses modalités. La classification de ces essais en fonction de la dose relative de chimiothérapie montre que la chimiothérapie ne s'oppose pas obligatoirement au développement d'une réponse immune. L'intensité de la chimiothérapie mais également le schéma thérapeutique associant chimiothérapie et immunothérapie, sont des paramètres clé à définir afin d'obtenir des réponses immunes anti-tumorales efficaces (Chen and Emens, 2013). Le bénéfice de la lymphodéplétion induite par la chimiothérapie ou la radiothérapie a également été démontré dans le traitement des mélanomes métastatiques par transfert adoptif de lymphocytes T infiltrant la tumeur. Le pré-conditionnement des patients avant transfert adoptif par l'association de cyclophosphamide et fludarabine ou par irradiation corporelle complète (2 ou 12 Gy) a permis d'obtenir un taux de réponse objectives compris entre 50 et 70% (Dudley et al., 2008). Le potentiel immunostimulant de la lymphodéplétion pourrait résulter de l'effet synergique : (i) de la création d'une « niche », c'est à dire d'un espace propice à l'implantation de cellules T nouvellement générées, et (ii) de l'augmentation de la disponibilité des facteurs de croissance, favorisant la prolifération la différenciation et la survie des cellules T. Dudley et al. ont en effet observé une augmentation de la concentration plasmatique en IL-7 et IL-15 concomitante à la lymphodéplétion. Ces cytokines sont déterminantes dans la prolifération homéostatique consécutive à la survenue de lymphopénie (Goldrath et al., 2002; Jaleco et al., 2003; Morre and Beq, 2012). La prolifération homéostatique est décrite comme un mécanisme compensatoire nécessaire au maintien du « pool » de cellules T, indispensable à l'intégrité du système immunitaire (Goldrath et al., 2000; Min et al., 2005). La prolifération homéostatique dans un contexte exempt de suppression et favorable à la présentation d'antigènes tumoraux pourrait donner lieu au développement de réponses immunes spontanées.

Une meilleure connaissance de la cinétique de recouvrement des cellules T après chimiothérapie et l'étude de la diversité du répertoire de ces sous-populations assureraient une meilleure compréhension de l'effet des chimiothérapies sur le système immunitaire. Ces informations permettraient peut-être de réajuster les protocoles de chimiothérapie afin de

créer les conditions favorables au développement d'une réponse immune spontanée pour un effet protecteur durable.

Le statut immun des patients sous chimiothérapie n'est que peu documenté. L'impact des traitements sur la diversité et la fonctionnalité des différentes sous-populations lymphocytaires est indispensable pour définir des fenêtres thérapeutiques permettant l'introduction d'immunothérapies.

## **7.3. Chimiothérapies conventionnelles et LT CD4**

### **7.3.1. Introduction**

Le traitement des cancers par chimiothérapie dite « classique » ou « conventionnelle » résulte le plus souvent en une combinaison d'agents chimiques permettant de potentialiser leur action cytotoxique sur la tumeur. Cette association conduit à un effet additif ou synergique. La combinaison de drogues aux mécanismes d'action différents a pour objectif de prévenir l'émergence de clones résistants. Par conséquent, chez l'Homme, l'impact de la chimiothérapie sur les populations lymphocytaires, ne résulte pas de l'effet d'un agent mais de plusieurs drogues. Cependant, cet aspect n'est pas pris en considération dans les différents modèles animaux de tumeurs transplantées ou induites et nécessite plus ample explorations. Avant la mise en place d'essais précliniques et cliniques, les drogues sont sélectionnées *in vitro* à la suite du criblage de molécules actives sur des cellules cancéreuses animales ou humaines, permettant de définir leurs mécanismes d'action primaire. De telles études sur les cellules immunitaires n'ont pas été envisagées. Elles permettraient d'évaluer la cytotoxicité, certes d'une manière toute relative, de ces agents en fonction du type cellulaire et potentiellement de mettre évidence des mécanismes de résistances et des modifications moléculaires différentielles. La chimiothérapie conventionnelle reste le traitement de référence des cancers. Si elle permet d'obtenir des taux de réponse élevés, elle ne prévient pas la survenue de rechutes chez nombre de patients. Dans ce contexte thérapeutique, la compréhension des interactions entre les drogues et le système immunitaire serait donc essentielle à l'élaboration d'une stratégie optimale permettant l'intégration de nouvelles thérapies ciblant le système immunitaire, afin d'augmenter le bénéfice clinique des chimiothérapies conventionnelles chez les patients.

### **7.3.2. Quelques définitions**

#### **7.3.2.1. Chimiothérapie adjuvante et néo-adjuvante**

Une chimiothérapie adjuvante, intervient en complément d'une autre forme de traitement, le plus souvent une chirurgie, pour en augmenter les effets à long terme. En l'absence d'autres traitements appropriés, tels que l'hormono-thérapie, elle permet de prévenir d'éventuelles récurrences liées à la présence de cellules tumorales disséminées et non détectables. A l'inverse, une chimiothérapie dite néo-adjuvante est une chimiothérapie administrée avant un traitement locorégional chirurgical ou radiothérapeutique. Elle a pour objectif de réduire la taille de la tumeur à opérer ou à irradier. Elle est proposée en général dans le cas de tumeurs non opérables d'emblée et par conséquent à des stades avancés, mais elle peut être également envisagée comme thérapie « conservatrice ». A titre d'exemple, dans le cancer du sein, elle permettra d'éviter une exérèse complète du sein.

#### **7.3.2.2. Facteur pronostique et prédictif**

Un facteur pronostique est un facteur qui permet d'estimer le potentiel évolutif d'un processus tumoral particulier. Il est évalué chez des patients n'ayant reçu aucune thérapie particulière. Un facteur prédictif, à l'inverse, est associé à un protocole thérapeutique

spécifique et permet de prédire l'efficacité d'un traitement. Par exemple, dans le cancer du sein, l'expression de HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) est un facteur de mauvais pronostic puisque associé à une évolution défavorable de la maladie, mais constitue un facteur prédictif à la réponse à l'herceptine (anticorps monoclonal dirigé contre HER2), le traitement permettant d'augmenter la survie globale chez les patients HER2<sup>+</sup>.

### **7.3.3. Effet des chimiothérapies néo-adjuvantes (CNA)**

#### **7.3.3.1. Introduction**

Les CNAs représentent un modèle de prédilection pour l'étude de la coopération entre chimiothérapie et système immunitaire. Les CNAs permettent, en effet, d'évaluer rapidement et avec précision la réponse au traitement à partir de l'examen des pièces de résection post CNA. Une réponse complète, c'est-à-dire l'absence de cellules tumorales après traitement, est un critère pouvant se substituer à la survie sans récurrence ou la survie globale qui sont les deux paramètres classiques d'évaluation de la réponse aux chimiothérapies adjuvantes (CA). En contrepartie, l'absence de matériel pré-thérapeutique, c'est à dire de biopsies diagnostiques, ou de matériel post-chirurgical, en cas de réponse complète peuvent être deux facteurs limitant à l'étude de la réponse immune à partir des infiltrats lymphoïdes intra-tumoraux. Par ailleurs, la comparaison entre tumeurs provenant de chirurgie première, pré-CA, et tumeurs post-CNA peut constituer une source de biais. Comme évoqué précédemment, chacune de ces deux thérapies, CA et CNA, s'adressent à des stades de développement de tumeur différents.

#### **7.3.3.2. CNA et lymphocytes intra-tumoraux dans les cancers du sein**

- Les lymphocytes intra-tumoraux (TILs), facteur prédictif :

Dans les cancers du sein, la présence de TILs au sein de la tumeur, que ce soit au niveau du stroma ou de la tumeur elle-même, a été identifiée comme pouvant représenter un facteur prédictif indépendant de la réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante. Denkert et al., à partir de biopsies pré-thérapeutiques, ont observé une corrélation entre la présence de TILs et le taux de réponse complète au traitement alliant anthracycline et taxane. Le pourcentage de réponse variait de 7% à 40% respectivement entre les tumeurs définies comme fortement infiltrées et celles peu infiltrées. Dans cette étude, les TILs ont été caractérisés par le niveau d'expression d'ARN codant pour CD3 et de CXCL9. CXCL9 est une molécule inductible par l'IFN $\gamma$  impliquée dans le chimiotactisme des lymphocytes T exprimant à leur surface son récepteur, CXCR3. Cette signature génique spécifique d'un infiltrat de cellules T, a été confirmée au niveau protéique (Denkert et al., 2010). Ces résultats ont été confortés par ceux de Yamaguchi et al., qui, sur le même principe, ont pu mettre en évidence que l'infiltrat en cellules T des biopsies pré-thérapeutiques était associé à une meilleure réponse au traitement, spécifiquement chez les patientes dont la tumeur sur-exprimaient le récepteur aux facteurs de croissance épidermiques humains, HER2 (Yamaguchi et al., 2012). Récemment, d'autres études basées sur l'établissement de signatures géniques soulignent l'importance de la présence des lymphocytes au site de la tumeur dans la réponse aux CNAs (Sota et al., 2014; Stoll et al., 2014). Cependant, l'ensemble de ces données ne permettent pas d'attribuer un rôle décisif à une population de lymphocytes en particulier. Les lymphocytes CD4 Th1 et T<sub>FH</sub>

pourraient néanmoins s'avérer cruciaux dans la détermination d'un environnement immunitaire favorable à une réponse clinique à la chimiothérapie (Gu-Trantien et al., 2013) (*cf section implication directe des  $T_{FH}$  dans l'immunité anti-tumorale*). Parallèlement, la présence de TILs FoxP3<sup>+</sup> assimilés aux lymphocytes T régulateurs (T-Reg), pourrait constituer un facteur prédictif indépendant de la réponse au traitement néo-adjuvant de cancer du sein. Oda et al. ont montré que l'infiltration concomitante de cellules FoxP3<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> étaient déterminante pour la réponse au traitement. Un ratio FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> plus élevé serait associé à un taux de réponse complète plus important, suggérant que la CNA stimulerait l'immunité en inhibant l'immunosuppression et en potentialisant la réponse effectrice. Cette hypothèse serait soutenue par un plus fort taux de réponse constaté chez les patients dont les tumeurs exprimaient plus fortement Ki67, un indicateur de prolifération active, ainsi qu'un nombre important de cellules FoxP3<sup>+</sup>. Par définition, les chimiothérapies sont potentiellement plus actives sur les tumeurs prolifératives, et présenteraient également une activité cytotoxique sélective sur les T-Reg. Ensemble ces mécanismes pourraient favoriser la levée de l'immunosuppression et stimuler la réponse immune anti-tumorale. Hornychova et al. qui avaient antérieurement établi une corrélation TILs/réponses complètes, avait également montré une augmentation de lymphocytes CD3<sup>+</sup> dans les résections des tissus tumoraux post-CNA des patients ne présentant pas de réponses complètes, suggérant que la chimiothérapie pouvait contribuer à des modifications de la composition de l'infiltrat tumoral (Hornychova et al., 2008). Cette étude, souligne l'importance de considérer le potentiel pronostique des CNAs par comparaison des variations immunes au sein de la tumeur avant et après administration du traitement.

- Les lymphocytes intra-tumoraux (TILs), facteur pronostique :

L'analyse de l'évolution des populations lymphocytaires dans la tumeur après CNA a largement contribué à mettre en évidence les propriétés immuno-stimulatrices des chimiothérapies. Ladoire et al. ont montré que les tumeurs définies comme étant de mauvais pronostic, c'est-à-dire présentant un grade élevé associé à un envahissement ganglionnaire et à l'absence d'expression de récepteurs hormonaux, étaient majoritairement envahies par des cellules CD8<sup>+</sup> et FoxP3<sup>+</sup> *figure 34*.

L'administration d'une CNA occasionnait une diminution importante des cellules Foxp3<sup>+</sup> infiltrant la tumeur alors qu'elle semblait ne pas affecter les lymphocytes CD3<sup>+</sup> de manière générale ni les cellules CD8<sup>+</sup>. L'analyse des résections post-CNAs a permis d'établir une corrélation positive entre réponse complète au traitement et maintien des lymphocytes CD8<sup>+</sup> en l'absence complète de détection de cellules FoxP3<sup>+</sup>. Confortant l'hypothèse d'une action immuno-stimulatrice de la chimiothérapie, les auteurs ont mis en évidence une augmentation de granzyme B, granule cytotoxique, et de TiA1, protéine de liaison à l'ARN induisant la fragmentation de l'ADN, parallèlement à la présence de cellules CD8<sup>+</sup> dans les résections post-CNA (Ladoire et al., 2008). Ces observations suggèrent fortement une inhibition de l'immunosuppression et une stimulation de la réponse effectrice par les CNAs et sont en parfaite adéquation avec les résultats obtenus par Oda et al. Dans une étude postérieure, les auteurs ont pu démontrer que la présence de cellules CD8<sup>+</sup> et une diminution conséquente des cellules Foxp3<sup>+</sup> après traitement dans les reliquats opératoires était associé non seulement à une augmentation de la survie sans récurrence mais également à une meilleure survie globale des patients traités indépendamment du statut HER2 de la tumeur. Un ratio CD8<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> élevé après CNA dans les tissus résiduels constituait un facteur pronostique indépendant de la

survie des patients atteints de cancer du sein (Ladoire et al., 2011b). Récemment, Dieci et al., en évaluant la densité de TILs dans les tumeurs résiduelles après CNA chez des patientes triples négatives, c'est à dire n'exprimant ni de récepteurs hormonaux ni HER2, ont pu déterminer qu'une infiltration importante de TILs constituait un élément majeur d'une évolution favorable de la maladie se traduisant par l'absence d'apparition de métastases et une meilleure survie. Les auteurs ont constaté que la valeur pronostique des TILs était majorée dans les maladies résiduelles caractérisées par la présence de ganglions envahis et une taille plus importantes des tumeurs (>2 mm), paramètres évocateurs d'une maladie active. Cette dernière observation suggère que les TILs générés ou réactivés par la CNA, permettraient de contrôler efficacement la tumeur résiduelle (Dieci et al., 2014).

De manière générale, loin de s'opposer à l'établissement d'une réponse immune anti-tumorale, la chimiothérapie néo-adjuvante pourrait en être l'instigatrice, par des effets synergiques modulant à la fois l'immunosuppression et immunité effectrice. L'ensemble de ces données révèlent que la nature des relations entre chimiothérapie et système immunitaire est complexe et met en œuvre simultanément ou séquentiellement les différents mécanismes décrits dans l'introduction.

### **7.3.3.3. CNA et TILs dans d'autres types de cancers**

Dans les cancers du poumon non à petites cellules, un faible ratio FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> dans les prélèvements pré-thérapeutiques des tumeurs était prédictif de la réponse à la CNA, étant associé un plus fort taux de réponses partielles ou complètes. Ce résultats en contradiction apparente avec ceux obtenus dans le cancer du sein (Ladoire et al., 2008; Ladoire et al., 2011b; Oda et al., 2012) pourrait signifier que la réponse à la chimiothérapie est également dépendante du type de tumeur et de la chimiothérapie elle-même.

Dans les cancers de la tête et du cou, regroupant les cancers de la cavité buccale, du pharynx et larynx, pour 90%, et les cancers des fosses nasales, des sinus et glandes salivaires, les effets de la radiochimiothérapie néo-ajuvante semblent être de même ordre que ceux observés dans les cancers du sein (Ladoire et al., 2011b). La comparaison de la composition cellulaire de la tumeur avant et après radiochimiothérapie néo-ajuvante, a permis d'établir que le traitement avait un effet modéré sur les cellules CD8<sup>+</sup> et la production de granzyme B alors qu'il affectait plus spécifiquement les T-Reg FoxP3<sup>+</sup>. L'association de la présence de granzyme B et d'un ratio de cellules T/Foxp3<sup>+</sup> élevé corrélait avec une meilleure survie et était par conséquent de pronostic favorable (Tabachnyk et al., 2012). Ces travaux confirment le rôle potentiel de traitement néo-adjuvants dans l'activation de la réponse immune anti-tumorale établi par les études précédentes dans les cancers du sein. Cependant, ni dans cette étude, ni dans les précédentes, la participation de la radiothérapie à ce rôle n'a pu être déterminée.

L'impact d'une CNA sur l'infiltrat lymphocytaire des tumeurs résiduelles a également été évalué dans les cancers de l'œsophage. L'analyse de la composition cellulaire du stroma et de la tumeur en terme de lymphocytes CD4, CD8 et T-Regs (FoxP3<sup>+</sup>) chez les patients traités a été comparée à celle observée dans les tissus tumoraux provenant de chirurgie de première intention. L'importance de l'infiltrat lymphocytaire était en lien direct avec la chimiothérapie néo-adjuvante. Le nombre de LT CD4 présents dans le stroma et le lit de la tumeur était significativement plus important dans les tumeurs des patients ayant reçus une chimiothérapie préopératoire. L'augmentation du nombre de CD8 était quant à lui, limité au stroma. Les T-Regs ne semblaient pas subir de variation d'effectifs (Tsuchikawa et al., 2012). Comme indiqué dans l'introduction des chimiothérapies néo-adjuvantes, la comparaison entre tumeurs

primitives, c'est à dire en l'absence de traitement, et tumeurs traitées peut-être source de biais. Néanmoins, ces résultats suggéraient que la chimiothérapie alliant le 5-fluorouracile et le cisplatine occasionnerait un recrutement préférentiel des LT CD4. La présence additionnelle dans le stroma d'une accumulation de LT CD8 par rapport au stroma des tumeurs non traitées, pourrait indiquer soit un recrutement des lymphocytes, soit une prolifération *in situ*, dans d'éventuelles structures lymphoïdes tertiaires (SLT). Les différents signaux moléculaires liés aux modifications induites par la chimiothérapie pourraient orchestrer un recrutement séquentiel des cellules immunes provenant de la périphérie ou des STLs.

#### **7.3.3.4. CNA et lymphocytes circulants**

L'impact des CNAs sur les sous-populations lymphocytaires circulantes, facilement accessibles, n'est que peu documenté. Un intérêt plus grand est porté sur les modifications intra-tumorales pouvant être plus à même de refléter une réponse immune spécifique relative au traitement de la tumeur. Cependant, le sang périphérique constitue un lieu de transition entre structures lymphoïdes et tissus, et la nécessité de confronter les résultats entre tumeur et sang périphérique est primordiale pour la compréhension de la dynamique de la réponse immune (*cf section Th1/Th2 et immunité anti-tumorale*). La mise en évidence, directement dans le sang périphérique, de modifications corrélées à la réponse clinique permettrait de définir des facteurs pronostiques et/ou prédictifs limitant les gestes invasifs.

Murta et al., en étudiant les variations avant et après traitement de sous-populations lymphocytaires circulantes dans les cancers du sein, ont constaté que la sensibilité aux agents chimiques différait entre LT CD4 et CD8, le nombre absolu de LT CD4 étant plus sévèrement diminué après chimiothérapie. Ils ont également établi qu'un ratio LT CD4/CD8 élevé avant CNA pouvait représenter un facteur prédictif de la réponse au traitement (Murta et al., 2000). Au diagnostic, la proportion de LT CD4 par rapport au LT CD8 était augmentée dans les tumeurs du sein typées HER2 positives par rapport à celles n'exprimant pas HER2, suggérant une liaison entre ce paramètre et le caractère agressif de la tumeur (Muraro et al., 2011). Ces observations concordent avec les données issues de l'étude des tumeurs (Ladoire et al., 2008; Ladoire et al., 2011b; Oda et al., 2012), bien que dans le sang périphérique la nature régulatrice des CD4 (cellules FoxP3<sup>+</sup>) ne soit pas précisée. Après CNA, l'augmentation de la production de certaines cytokines, notamment l'IL-2, IFN $\gamma$  et le GM-CSF, dans le sérum des patientes et une réponse plus importante des lymphocytes à une stimulation autologue évaluée *in vitro*, par RLA, c'est à dire réaction lymphocytaire autologue, indiquerait que les cellules circulantes pourraient, ainsi que les TILs, être des marqueurs de la réponse immune anti-tumorale stimulée par la chimiothérapie. En effet, la CNA pourrait ne pas être un obstacle à l'établissement d'une réponse immune, une augmentation du nombre absolu de CD4 et CD8 ayant été mesurée au cours de traitement alliant doxorubicine et paclitaxel chez des patientes atteintes de cancer du sein (Melichar et al., 2001).

#### **7.3.4. Effet des chimiothérapies adjuvantes (CA)**

Les bénéfices d'une chimiothérapie adjuvante (CA), administrée après une chirurgie première, sont évalués par l'amélioration de la survie globale et/ou la survie sans récurrence qu'elles peuvent apporter. L'effet sur le système immunitaire d'un tel traitement n'a été que peu étudié, se justifiant par la potentielle absence de stimulation antigénique en l'absence de tumeur. Cependant, les modifications occasionnées pourraient ne pas être sans conséquences sur le système immunitaire, les CA pouvant conduire à moduler la susceptibilité aux infections post-chirurgie et/ou une réponse anti-tumorale protectrice à long terme. En effet,

les travaux de Zielinski et al. montrent qu'une réponse immune primaire liée à une infection pouvait être compromise par la CA. Cet essai consistait à déterminer la réactivité du système immunitaire de patientes atteintes de cancer du sein après une vaccination anti-méningoencéphalite à tique, avant et après CA. La méningoencéphalite à tique est une encéphalite virale transmise par la morsure de tiques due à un Arbovirus de la famille des *Flaviviridae*. Vaccinées sous chimiothérapie ou dans la période suivant le traitement, les patientes avaient perdu la capacité à monter une réponse immunitaire primaire. A l'inverse, la réponse secondaire consécutive à une seconde vaccination au cours du traitement de patientes ayant préalablement reçu le vaccin avant ou après le diagnostic de leur cancer, n'était pas affectée par la chimiothérapie (Zielinski et al., 1986). Ces résultats suggèrent que la CA ne remettrait pas en cause une immunité anti-tumorale préétablie lors du développement tumorale primaire mais pourrait s'opposer à l'immunité dirigée contre l'apparition de variant lors de récurrences métastatiques.

Une étude longitudinale de la variation quantitative des sous-populations lymphocytaires après CA associée à la radiothérapie (CA plus RT) dans les cancers du sein, montrent une toxicité et/ou une capacité de recouvrement à des valeurs similaires à celles de donneurs sains différentes en fonction des sous-populations T. Les LT CD4 demeurent largement diminués un an après traitement alors que le nombre absolu des LT CD8 est comparable à celui de sujets sains après CA+RT (Mozaffari et al., 2009). Une meilleure compréhension des effets des CA sur le système immunitaire par des études longitudinales prenant en compte les valeurs initiales observées chez les patients avant traitement et comprenant une caractérisation plus détaillée des populations lymphocytaires est nécessaire avant d'envisager leur association avec des immunothérapies voir leur substitution par ces dernières dans le but de diminuer les risques de récurrences.

### **7.3.5. Chimiothérapie : effet sur les sous-populations de LT CD4**

#### **7.3.5.1. T-Regs et chimiothérapie**

L'impact spécifique des chimiothérapies sur les lymphocytes T régulateurs est le plus documenté, les T-Regs étant considérés comme les acteurs principaux de l'immunosuppression et donc comme un obstacle majeur à l'établissement d'une immunité anti-tumorale. L'action de l'administration métronomique de cyclophosphamide dans les cancers métastatiques de diverses origines ou de fludarabine dans le traitement des leucémies lymphoïdes chroniques ou encore de paclitaxel dans les cancers du poumon, détaillée dans la section *modulation de l'immunosuppression*, conduisait à une diminution quantitative et qualitative des T-Regs (Beyer et al., 2005; Ghiringhelli et al., 2007; Samaritani et al., 2007; Zhang et al., 2008). L'identification d'actions ciblées sur une population précise permet d'envisager leur association avec les immunothérapies et de définir de nouveaux schémas thérapeutiques.

#### **7.3.5.2. Equilibre Th1/Th2 et chimiothérapie**

Dans le traitement des cancers du poumon non à petites cellules, parallèlement à son action inhibitrice directe sur les T-Regs conduisant à la diminution de la fonctionnalité et du nombre de ces cellules, le paclitaxel semble augmenter l'immunité cellulaire de type Th1. En périphérie, l'augmentation du nombre de LT CD4 produisant de l'IL2 et de LT CD8 produisant de l'IFN $\gamma$ , s'accompagne de l'expression à la surface de ces deux types cellulaires

de la molécule CD44, marqueur d'activation. Ces résultats suggèrent que le paclitaxel pourrait avoir un rôle activateur de la réponse immune anti-tumorale (Zhang et al., 2008). Les cytokines Th1 : IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  et GM-CSF favoriseraient la polarisation des macrophages infiltrant la tumeur (TAMs) vers un sous type défini TAM-1. Les TAM-1, en plus de leurs propriétés cytotoxiques, exerceraient une activité anti-tumorale par la production de cytokines pro-inflammatoires et une présentation de l'antigène aux cellules de l'immunité plus efficace. A l'inverse les TAM de type 2 promu par les cytokines Th2 auraient une action pro-tumorale (Mantovani and Locati, 2009). DeNardo et al. ont démontré dans un modèle murin de tumeur du sein, que le paclitaxel pouvait induire des modifications du microenvironnement tumoral conduisant à une libération importante par les cellules tumorales de *Colony Stimulating Factor 1* (CSF-1), molécule considérée comme un « signal de danger », en réponse à l'action cytotoxique du paclitaxel. Le CSF-1 serait impliqué dans le recrutement actif de TAM exprimant le récepteur au CSF-1 (CSF-1R), recrutement favorable au développement tumoral. Les auteurs ont montré que le blocage de la voie CSF-1/CSF-1R augmentait considérablement l'infiltration des tumeurs par les LT CD4 et CD8 et consécutivement, conduisait à la diminution de la croissance tumorale et de l'apparition de métastases (DeNardo et al., 2011). Ces données expriment la diversité des effets des chimiothérapies sur le système immunitaire et la tumeur. Certaines associations, à déterminer avec précision, seraient décisives dans le basculement d'une activité pro-tumorale vers une activité anti-tumorale du système immunitaire.

### **7.3.5.3. Th17 et chimiothérapie**

Le cyclophosphamide, en administration orale métronomique (c'est à dire de faibles doses à intervalles réguliers), pourrait promouvoir la différenciation de LT CD4 en Th17. En effet, l'administration de cyclophosphamide induisait une augmentation de la quantité d'IL-17 produite spécifiquement par les LT CD4 du sang périphérique, des patients au stade métastatique de la maladie ou porteurs de tumeurs solides localement avancées. Le rôle de ces Th17 dans l'évolution de la maladie n'est pas déterminé. Le potentiel anti-tumoral des Th17 restant controversé, l'induction de Th17 par de faibles quantités de cyclophosphamide, qui semble être confirmée chez la souris dans cette même étude, nécessite plus ample exploration. Cependant, les auteurs ont également montré que les LT CD4 issus des ascites de tumeurs de l'ovaire exprimaient des quantités croissantes d'IL-17 et d'IFN $\gamma$  au cours du traitement (Viaud et al., 2011). Cette observation pourrait coïncider avec le modèle de différenciation suggéré par Hamai et al., où l'augmentation d'IFN $\gamma$  serait liée à la conversion après activation des cellules Th17 en effecteurs produisant essentiellement de l'IFN $\gamma$  (Hamai et al., 2012) (*cf section th17 et immunité anti-tumorale*). Dans ce cas, l'induction de Th17 par le cyclophosphamide pourrait constituer une des caractéristiques immunes de la réponse au traitement.

### **7.3.5.4. T<sub>FH</sub> et chimiothérapie**

Bien que les T<sub>FH</sub> fassent partie des derniers arrivants dans la grande famille des LT CD4, leur rôle dans la réponse anti-tumorale n'en est pas moins réduit. Plusieurs signatures géniques définis récemment par l'étude de biopsies tumorales avant chimiothérapie mettent en avant l'expression de CXCL13 comme une composante majeure de l'immunité tumorale (Denkert et al., 2010; Gu-Trantien et al., 2013; Stoll et al., 2014). Dans les tumeurs du sein, CXCL13 a été défini comme un facteur prédictif de la réponse à la CNA (Gu-Trantien et al., 2013). Les T<sub>FH</sub> intra-tumoraux représentaient la principale source de CXCL13 et seraient

essentiels au maintien et/ou à la formation de structures lymphoïdes tertiaires (*cf section lymphocytes CD4 folliculaires et immunité anti-tumorale*). La fonction des T<sub>FH</sub>, associée à la conservation de ces structures fonctionnelles sous chimiothérapie et l'impact du traitement sur le trafic et/ou la génération de cellules immunitaires effectrices au sein de ces structures restent cependant à déterminer.

#### **7.3.5.5. CD4 CTL et chimiothérapie**

Il apparaît évident au vu des résultats des études citées chez la souris dans la section *les lymphocytes T CD4 cytotoxiques et l'immunité anti-tumorale* que la chimiothérapie joue un rôle essentiel dans le développement de ces cellules (Hirschhorn-Cymerman et al., 2012; Quezada et al., 2010; Xie et al., 2010). En effet, dans chacun de ces modèles, la lymphopénie semble être une étape fondamentale à la différenciation et l'expansion de ces cellules. La nécessité de créer une niche, nécessaire à l'expansion de ces cellules, la levée de l'immunosuppression pouvant contribuer à leur fonctionnalité ou encore les modifications environnementales conduisant à la libération de facteurs solubles, potentiellement indispensable à leur prolifération, sont autant d'éléments qui pourraient intervenir pour permettre une réponse immune efficace, associée aux LT CD4 cytotoxiques, chez l'Homme. Cependant, avant de définir le poids respectif de chacun de ces paramètres, il est primordial d'identifier avec précision ces cellules, dans le sang périphérique et au sein de la tumeur des patients.

#### **7.4. Conclusion : chimiothérapie et LT CD4 effecteurs, modulation de l'immunité anti-tumorale naturelle**

De cette partie il émane clairement que l'administration de chimiothérapie n'est pas sans conséquences sur le système immunitaire. Elle peut exercer un effet direct en inhibant spécifiquement la fonction et/ou le nombre de certaines sous populations. Les LT CD4 de manière générale et plus particulièrement les T-Regs paraissent plus sensibles à la chimiothérapie que les LT CD8. Cependant, les répercussions des effets des chimiothérapies sur la cinétique de recouvrement de ces cellules pendant et après traitement, ainsi que sur leur fonction et la diversité de leur répertoire demeurent inconnues. De même, le rôle du conditionnement du microenvironnement tumoral par la chimiothérapie n'est pas totalement élucidé. La dissection des mécanismes au cours du traitement sont nécessaires à la compréhension de l'implication de l'immunité dans la réponse au traitement. La tumeur n'étant accessible que lors de chirurgie première ou en fin de traitement, un suivi des paramètres immunologiques périphériques est indispensable. Pour répondre à cet objectif, la mise en place d'études longitudinales visant à l'évaluation des sous-populations lymphocytaires à la fois quantitatives et qualitatives, en termes de spécificité d'antigène et de répertoire, est nécessaire. Sur le plan clinique, une évaluation systématique et précise de la taille des cibles tumorales selon des critères préétablis est également indispensable. Elle permettrait de quantifier avec plus de précision la régression tumorale sous CNA ou d'effectuer une classification, pour un même type de tumeur, de la masse tumorale en fonction des réponses immunologiques. La standardisation des mesures de l'ensemble de ses critères permettra d'obtenir des données comparatives qui aideront à adapter les traitements pour une meilleure efficacité.

## 8. Résultats

### 8.1. Présentation

Historiquement, les LT CD8 cytotoxiques ont été considérés comme la seule composante cellulaire du système immunitaire nécessaire et suffisante pour l'élimination de cellules infectées par des virus ou transformées, les LT CD4 ne jouant qu'un rôle auxiliaire, dans le développement et le maintien de la réponse immune effectrice, ou modulateur par la fonction suppressive des T-Reg. Aux côtés, de ces fonctions auxiliaires ou suppressive, nombre de données indiquaient que les LT CD4 pouvaient également exercer une activité cytotoxique directe.

Nos travaux ont permis par l'analyse chez l'Homme, de l'expression des récepteurs  $\alpha$  à l'IL-2 (CD25) et à l'IL-7 (CD127) à la surface des LT CD4 du sang périphérique d'identifier une population singulière de LT CD4 caractérisée par l'absence de ces deux molécules. Ces LT CD4, CD25<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup>, faiblement représentées chez les sujets sains, entre 0,2-2% des LT CD4 totaux du sang périphérique, étaient fortement augmentées, entre 2-20% dans les infections chroniques VIH et Tuberculose, et notamment dans les cancers incluant les mélanomes uvéaux métastatiques (Mum) et les cancers du sein. Puisque prédominant dans des situations de stimulation chronique, ces LT CD4 ont été définis comme des LT CD4 chroniquement stimulés : chCD4. Dans le sang périphérique de patients atteints de cancer comme chez les sujets sains, la majorité de ces chCD4 arboraient un phénotype mémoire/effecteur (CD45RO<sup>+</sup>). Cependant, dans les Mum et les cancers du sein la proportion de chCD4 effecteurs (CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) était fortement augmentée. Par ailleurs, si la plus part de ces cellules effectrices apparaissaient à un stade de différenciation terminale (CD57<sup>+</sup>), elles présentaient toutes les mêmes caractéristiques phénotypiques distinctes, définies par l'absence d'expression de la molécule de co-stimulation CD28 coordonnée à l'expression à leur surface de l'intégrine CD11b et du récepteur NK, 2B4. Dans les chCD4 effecteurs, nous avons également mis en évidence la présence spécifique de granules cytoplasmiques concentrant granzyme B et perforine, molécules impliquées dans la cytotoxicité directe de cellules cibles. Cette propriété fonctionnelle a été démontrée par des tests de cytotoxicité redirigée et était restreinte aux chCD4 effecteurs en comparaison aux autres sous-populations effectrices de LT CD4 conventionnels et T-Reg. L'analyse du profil de sécrétion de cytokines, révèle l'absence total de production d'IL-17 et un profil orienté Th1, soulevant la question du lignage de cette population particulière. L'absence d'expression de Ki67, marqueur des cellules en cycle, au sein de cette population de LT CD4 cytotoxiques, parallèlement à leur accumulation, suggérait qu'elles seraient capables de persister à l'état quiescent chez les patients. Par ailleurs, dans les Mum, nous avons mis en évidence que l'augmentation importante du nombre de chCD4 chez les patients, concordait avec la présence d'expansions oligoclonales au sien de cette population, et démontré une corrélation positive entre le pourcentage des cellules effectrices, chCD4 et LT CD8, LT CD8 parmi lesquels nous avons déterminé une fréquence élevée de cellules répondeuses spécifiques d'antigènes tumoraux associés à la tumeur. Nos travaux ont également permis d'évaluer l'impact de la chimiothérapie sur les populations lymphocytaires dans le sang périphérique. Chez les patientes atteintes de cancer du sein, traitées par chimiothérapie néo-adjuvante, c'est-à-dire préopératoire, nous avons constaté une augmentation du nombre de chCD4 chez 17/22

patientes. Nous avons mis en évidence que cette augmentation sous traitement était fortement corrélée au pourcentage de régression tumorale. L'ensemble de ces résultats apporte une nouvelle vision des LT CD4 dans l'immunité tumorale. Ils suggèrent pour la première fois, chez l'Homme, le potentiel cytotoxique des LT CD4 anti-tumoraux et le rôle crucial qu'ils pourraient jouer dans la réponse au traitement et dans l'établissement d'une réponse immune durable et protectrice.

## 8.2. Article

Published OnlineFirst February 17, 2014; DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2269

---

*Microenvironment and Immunology*

**Cancer  
Research**

### **High Numbers of Differentiated Effector CD4 T Cells Are Found in Patients with Cancer and Correlate with Clinical Response after Neoadjuvant Therapy of Breast Cancer**

Isabelle Péguillet<sup>1,2</sup>, Maud Milder<sup>1,2</sup>, Delphine Louis<sup>1,2</sup>, Anne Vincent-Salomon<sup>2,3</sup>, Thierry Dorval<sup>2,4</sup>, Sophie Piperno-Neumann<sup>2,4</sup>, Suzy M. Scholl<sup>2,4</sup>, and Olivier Lantz<sup>1,2,5</sup>

---

## 9. Discussion

Le rôle des LT CD4 dans l'immunité tumorale a été clairement établi par de nombreux exemples au cours de l'introduction et notamment par l'obtention d'une réponse complète et durable après transfert adoptif de LT CD4 autologues spécifiques d'un antigène associé à la tumeur chez un patient atteint de mélanome (Hunder et al., 2008). Dans notre étude, la caractérisation, dans différents types de cancers, mais également dans des pathologies où une stimulation chronique est suspectée (VIH, et tuberculose), d'une population élargie définie comme des lymphocytes T CD4 chroniquement stimulés, les chCD4 : CD127<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, souligne l'importance des LT CD4 dans l'orchestration de la réponse immune de manière générale et permet de mettre en évidence son rôle majeur dans l'immunité anti-tumorale chez l'Homme.

### 9.1. ChCD4 et immunité anti-tumorale

L'adjonction d'une immunothérapie à des chimiothérapies classiques nécessite, d'une part, de démontrer que parallèlement au développement tumoral, le système immunitaire est capable de développer une réponse anti-tumorale spécifique, et d'autre part, de déterminer l'impact des chimiothérapies conventionnelles sur le système immunitaire. Notre étude, par l'analyse des sous populations lymphocytaires dans différents types de cancers, mélanomes cancers du sein mais également cancers gastriques et œsophagiens, avant et après traitement permet de répondre partiellement à ces interrogations.

#### 9.1.1. Immunité anti-tumorale naturelle dans les mélanomes uvéaux métastatiques non traités (Mum) : les chCD4 aux côtés des LT CD8

Des données de la littérature antérieures à notre travail, chez la souris, montraient que l'échappement à l'immuno-surveillance des tumeurs Mum ne dépendait pas uniquement de l'incapacité du système immunitaire à reconnaître la tumeur (Lin et al., 2009). Dans notre étude, la détection dans le sang périphérique de patients atteints de Mum, de LT CD8 spécifiques de la tumeur à une fréquence élevée, en l'absence de tout traitement, confirmait ces résultats. Parallèlement à cette réponse CD8 spontanée, nous avons caractérisé sur le plan fonctionnel et phénotypique une population de chCD4 effecteurs ayant subi une expansion chez les patients atteints de Mum par comparaison à des donneurs sains. Nous avons démontré que cette population possédait des propriétés cytotoxiques par la présence de granules cytoplasmiques concentrant perforine et granzyme B d'une part; et par la capacité de ces cellules à lyser des cellules cibles lors de test de cytotoxicité redirigée d'autre part. En outre, l'analyse du répertoire TCR V $\beta$  des sous-populations de CD4, montrait que les expansions oligoclonales observées, caractérisées par la prédominance de LT CD4 associés à une chaîne V $\beta$  spécifique, étaient restreintes aux chCD4. Ces résultats suggéraient fortement que les chCD4, effecteurs cytotoxiques, partageaient la même spécificité antigénique et étaient potentiellement dirigés contre la tumeur. Enfin, nous avons observé une corrélation stricte entre la fréquence des effecteurs chCD4 et celle des effecteurs CD8, incluant une forte proportion de cellules spécifiques de la tumeur, ce qui évoquait le développement d'une réponse coordonnée entre LT CD8 et CD4 dirigée contre la tumeur dans les Mum. Ces

résultats soulignent que le système immunitaire est capable de développer une réponse immune effectrice anti-tumorale en dehors de tout traitement et suggère pour la première fois, chez l'Homme le potentiel cytotoxique des LT CD4 anti-tumoraux.

### **9.1.2. L'impact de la chimiothérapie adjuvante (CA) et néo-adjuvante (CNA) sur les chCD4 dans les cancers du sein**

Cette étude a permis d'évaluer l'impact de la chimiothérapie sur les populations lymphocytaires en présence de la tumeur, ce qui est le cas dans les traitements par CNA, ou en l'absence de tumeur, situation de l'administration d'une CA dans les cancers du sein.

#### **9.1.2.1. Impact de la CNA**

Au cours de notre travail, nous avons étudié la variation du nombre de lymphocytes circulants entre la fin et le début de la CNA et constaté que, d'une manière générale, une lymphopénie consécutive au traitement affectait plus spécifiquement les LT CD4 que les LT CD8. Ces résultats sont en concordance avec les données de la littérature (Murta et al., 2000). Cependant, l'analyse de l'impact des CNA sur les sous-populations CD4 : T-Reg, LT CD4 conventionnels et chCD4 révèle que les chCD4 sont capables de proliférer indépendamment de la cytotoxicité apparente des agents chimiques sur les lymphocytes T. En effet, sur les 22 patientes atteintes de cancer du sein et traitées par une CNA, 17 présentaient sous traitement une augmentation conséquente du nombre de leurs chCD4. Dans les Mum, nous avons établi la corrélation entre la fréquence de chCD4 effecteurs et celle des LT CD8 effecteurs. Chez les patientes atteintes de cancer du sein, la corrélation entre les populations effectrices LT CD8 et chCD4 n'est apparente qu'après la CNA. Or, nous n'avons pas constaté d'évolution significative du nombre de LT CD8 effecteurs entre la fin et le début du traitement. Ces observations suggèrent que dans les cancers du sein avancés l'augmentation des chCD4 est un événement secondaire consécutif aux effets de la chimiothérapie. La CNA induirait des modifications du microenvironnement tumoral qui conduirait à l'augmentation des chCD4. Enfin, une corrélation positive entre le taux de réponse au traitement et l'augmentation du nombre de chCD4 au cours du traitement, suggère que les chCD4 pourraient jouer un rôle crucial dans la réponse au traitement et dans l'établissement d'une réponse immune durable et protectrice. Cette étude ne permet pas pour le moment de déterminer si ces cellules représentent un facteur prédictif de la réponse au traitement ou pronostique de la survie globale ou sans récurrence des patients après traitement. Les mécanismes moléculaires conduisant à l'expansion des chCD4 en périphérie et leur éventuelle capacité à gagner la tumeur pour y exercer leur fonction cytotoxique reste à déterminer. Néanmoins, le relargage d'antigènes tumoraux lors de la lyse tumorale induite par les agents antinéoplasiques, la levée de l'immunosuppression par une cytotoxicité préférentielle de la CNA sur les T-Regs et la création d'une niche liée à la lymphopénie sont des arguments sous-tendus par notre étude.

#### **9.1.2.2. Impact de la CA**

Dans les cancers du sein, après chirurgie première, la chimiothérapie n'induit pas de modifications significatives sur le nombre de chCD4 circulants, ceci montrant que les chCD4 sont résistants à la toxicité cellulaire induite par la chimiothérapie. Cette observation concorde avec la capacité de ces cellules à proliférer sous chimiothérapie en présence de la tumeur et donc potentiellement en présence d'une source d'antigène. En accord avec ces données, la

relation entre les LT CD8 effecteurs et les chCD4 est maintenue au cours du traitement. L'existence de cette corrélation avant traitement pourrait être liée aux caractéristiques de la tumeur elle-même. En effet, la CA s'adresse à des tumeurs de meilleur pronostic, en générale, des tumeurs opérables donc de petite taille non associées à un envahissement ganglionnaire. A l'inverse, la CNA est prescrite le plus souvent, en dehors de chirurgies à visée conservatrice, chez des patientes présentant une masse tumorale plus importante donc potentiellement des tumeurs de stades plus avancés où la réponse immune naturelle pourrait être compromise par des modifications au sein du microenvironnement tumoral. La valeur prédictive des chCD4 dans ce type de pathologie n'a pu être établie en raison du recul insuffisant pour évaluer la survie des patients et les récurrences après traitement.

## **9.2. Influence de la charge tumorale sur les chCD4**

Cette étude a également permis de percevoir l'impact de la dynamique tumorale sur les sous-populations lymphocytaires et plus particulièrement sur les LT CD8 et les chCD4. La résection de la tumeur avant CA induisait une diminution du nombre de chCD4, suggérant comme évoqué précédemment, le lien direct entre la tumeur et ces cellules. Les LT CD8 effecteurs ne sont pas affectés par le retrait de la tumeur. Ces données sont en accord avec la littérature. En effet, Rabenstein et al. ont démontré, chez la souris, que l'expansion clonale de LT CD4 requerrait une stimulation antigénique continue alors que les LT CD8 pouvaient poursuivre leur division après une stimulation TCR discontinue (Rabenstein et al., 2014). Ces résultats confirment le lien potentiel entre tumeur et chCD4, ces cellules étant augmentées par rapport aux donneurs sains. Par ailleurs, une diminution du nombre de chCD4 circulants est observée chez les patientes porteuses de tumeurs plus agressives, patientes éligibles à une CNA. Les LT CD8 effecteurs augmentés en comparaison aux donneurs sains, ne varient pas en fonction du stade tumoral. Cette différence pourrait résulter de la combinaison de plusieurs mécanismes. Premièrement, des modifications intrinsèques consécutives au développement de la tumeur peuvent contribuer à l'établissement d'un microenvironnement suppresseur s'opposant à l'immunité anti-tumorale naturelle. Le recrutement spécifique de T-Regs, une perte d'immunogénicité par la diminution de l'expression d'antigènes, la sécrétion de facteurs solubles favorisant la différenciation ou la migration de cellules dendritiques suppressives ou de TAM favorable au développement de la tumeur, pourraient compromettre le maintien des chCD4 à l'image de la résection tumorale chez les patientes soumise à une CA. Deuxièmement, la diminution des chCD4 circulants, dans les stades plus avancés de tumeurs, pourrait également résulter d'une accumulation de ces cellules au sein de la tumeur. Dans les cancers du sein, il a été observé que la densité de l'infiltrat lymphocytaire pouvait être dépendante du stade de la tumeur (Ladoire et al., 2011b), les tumeurs de haut grade présentant un infiltrat plus important. Récemment, Gu-Trantien et al. ont démontré qu'un fort infiltrat lymphocytaire dans les cancers du sein reflétait la formation de structures lymphoïdes tertiaires adjacentes à la tumeurs (Gu-Trantien et al., 2013). Ces données suggéraient que les chCD4, par un tropisme préférentiel à déterminer, migreraient au sein de ces structures propices à leur maintien, pouvant expliquer la diminution de ces cellules en périphérie dans les tumeurs de plus haut grade. Bien que non démontrée dans cette étude, la capacité des chCD4 à gagner la tumeur est légitimée par une étude récente ayant mis en évidence la présence d'un infiltrat de lymphocytes T  $CD4^+CD127^+CD25^-Foxp3^-$ , phénotype caractéristique des chCD4, dans les papillomatoses respiratoires récidivantes (Hatam et al., 2012). Par conséquent, l'hypothèse d'une recirculation des chCD4 en périphérie après CNA, consécutive à l'involution des structures lymphoïdes tertiaires, lors de la régression tumorale, ne peut être complètement écartée mais ne s'oppose pas à leur contribution dans la réponse à

la chimiothérapie. Chez les patientes atteintes de cancers du sein traitée par CNA, la mise en évidence d'une augmentation, en périphérie, des T<sub>FH</sub>, constituants des structures lymphoïdes tertiaires, et/ou de la proportion de plasmocytes et du taux d'anticorps dirigés contre des antigènes tumoraux circulants pourraient contribuer à apporter un élément de réponse.

### **9.3. Les chCD4 effecteurs, LT cytotoxiques antigène spécifique soumis à un programme distinct de différenciation ?**

Notre travail a permis, pour la première fois chez l'Homme, de mettre en évidence une sous-population de LT CD4 aux propriétés cytotoxiques qui pourraient jouer un rôle déterminant dans la réponse à la CNA et dans l'établissement d'une réponse immune durable et protectrice dans les cancers du sein. Ces chCD4 semblent se différencier des autres sous-populations effectrices classiquement décrites à la fois sur le plan morphologique, phénotypique et fonctionnel.

#### **9.3.1. LT CD4 cytotoxiques**

Dans différents types de cancers, cancers du sein, gastriques, œsophagiens et Mum, les chCD4 effecteurs se distinguent des autres sous-populations de LT CD4 effecteurs, T-Reg et LT CD4 conventionnels, par la présence de granules cytoplasmiques caractéristiques des LT CD8 cytotoxiques. La capacité des chCD4 effecteurs à lyser des cibles P815 après activation du TCR et la co-localisation de granzyme B et de perforine à l'intérieur de ces granules, à l'image des granules contenue dans les LT CD8, confirme le potentiel cytotoxique de ces cellules. De nombreux éléments issus de l'analyse détaillée de ces cellules, notamment la mise en évidence d'expansions oligoclonales dans les Mums et la corrélation positive entre le taux de réponse au traitement et l'augmentation du nombre de chCD4 sous CNA dans les cancers du sein, suggèrent fortement que la spécificité antigénique de ces cellules soit dirigée contre la tumeur. Par ailleurs, chez les patients atteints de Mum, où le nombre de chCD4 effecteurs était fortement augmenté, nous avons constaté l'absence d'expression de Ki67, marqueur des cellules en cycle, dans cette population de LT CD4 cytotoxiques. Si leur augmentation en nombre dans le sang périphérique de patients non traités concordant avec la présence d'expansions oligoclonales parmi ces cellules reflète leur prolifération au cours de la progression tumoral, l'absence d'expression de Ki67<sup>+</sup> évoque leur capacité à persister après prolifération à l'état quiescent chez les patients. Leur fonctionnalité, c'est-à-dire la lyse spécifique de cellules tumorales, nécessiterait leur stimulation de manière antigène spécifique probablement dans un environnement moléculaire favorable, que pourrait induire la chimiothérapie.

#### **9.3.2. chCD4 et T-Regs, deux lignages distincts**

*In vitro*, l'inhibition de la prolifération de CD4 conventionnels autologues par les chCD4 effecteurs ne leur confère pas pour autant des propriétés suppressives (résultats non publiés). En effet, elle pourrait être liée à une consommation compétitive de facteurs de croissance et/ou une toxicité indirecte par relargage des granules cytotoxiques après activation du TCR. Si les chCD4 effecteurs se caractérisent par la perte de la molécule de co-stimulation : CD28, à leur surface, les T-Regs maintiennent son expression indépendamment de leur stade de différenciation, naïf, mémoire ou effecteur. Parallèlement, l'absence de

sécrétion d'IL-10, après stimulation, et d'expression des facteurs de transcription Foxp3 et Helios par les chCD4 indiquent clairement que ces cellules ne sont ni des T-Regs naturels ni des T-Regs induits.

### 9.3.3. chCD4 effecteurs Th1-like ?

Le potentiel cytotoxique et une expression très hétérogène de PD-1 à la surface de chCD4 écartent toute filiation avec les T<sub>FH</sub>. L'expression de CD57 à la surface des chCD4 effecteurs après prolifération reflèterait plus une différenciation terminale qu'elle n'établirait une relation avec les T<sub>FH</sub>. En effet, chez l'Homme, Rasheed et al. ont démontré que les T<sub>FH</sub> pouvaient être restreints à une population sur-exprimant CXCR5 et ICOS et que leur fonction était indépendante de l'expression de CD57 (Rasheed et al., 2006). Par ailleurs, l'analyse du profil de sécrétion de cytokines montre que les chCD4 effecteurs ne produisent ni IL-17, ni IL-4 et de faibles quantités d'IL-13 et IL-5 en comparaison avec les LT CD4 conventionnels dans les Mum. Ces cellules conservent cependant la capacité de produire de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-2. Ces résultats sont en faveur d'une origine Th1 des chCD4 bien que la possible perte d'expression d'IL-17 au profit de d'IFN $\gamma$ , au cours du processus de différenciation des Th17, n'exclut pas une origine Th17 (Hamai et al., 2012).

### 9.3.4. chCD4 population à part entière ?

La polarisation de LT CD4 en sous-populations effectrices distinctes est consécutive à une stimulation antigénique spécifique des LT CD4 naïfs. Leur différenciation dans un contexte environnemental précis est à l'origine de l'activation d'un panel singulier de facteurs de transcription contribuant à stabiliser la sous-population effectrice établie. Les chCD4 effecteurs résultent-ils d'une voie de différenciation distincte contrôlée par des facteurs de transcriptions spécifiques mis en jeu dans un contexte particulier ou bien les chCD4, de manière générale, constituent-ils une sous population à part entière, à l'instar des T-Regs naturels, caractérisée par l'expression stable du facteur de transcription Foxp3 de cellules dérivant directement du thymus ? Dans cette étude, aucun argument direct ne permet d'établir un lien de filiation entre les chCD4 et les LT CD4 conventionnels. Néanmoins, les chCD4 (CD127<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>) pourraient se distinguer des LT CD4 conventionnels. En effet, ils ont la particularité de définir, chez les donneurs sains comme chez les patients, une sous-population comprenant non seulement des cellules effectrices et mémoires mais également des cellules naïves. En quoi les LT CD4 naïfs, CD127<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>, diffèrent-elles des CD4 naïfs dits conventionnels, CD127<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ? L'expression différentielle de Ki67, marqueur des cellules en cycle, en fonction du stade de différenciation cellulaire, a permis de déterminer que les cellules naïves chCD4 présentaient une proportion de cellules Ki67<sup>+</sup> importante en comparaison aux autres sous-populations naïves y compris les T-Regs qui sont généralement définis comme des cellules ayant une capacité proliférative plus importante (Booth et al., 2010; Miyara et al., 2009). Chez les patients et les donneurs sains, la forte proportion de Ki67 au sein d'une population naïve - déterminant en générale des cellules quiescentes -, n'exprimant pas le CD127, dont la régulation négative transitoire chez les LT CD4 conventionnels traduit une activation des cellules (Mazzucchelli and Durum, 2007), suggérait que les chCD4, LT CD4 CD127<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> pourraient constituer une population indépendante. Cette hypothèse est soutenue par l'identification, chez les sujets sains, d'effecteurs présentant des granules cytoplasmiques, caractéristiques morphologiques des chCD4 des patients,

uniquement dans la fraction CD127<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>. Ces résultats suggèrent que ces cellules résulteraient de la différenciation des LT CD4 CD127<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> en effecteurs cytotoxiques.

#### **9.4.ChCD4 effecteurs associés au phénotype : CD28<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>2B4<sup>+</sup>**

Dans la *section LT CD4 cytotoxique* de l'introduction, les caractéristiques phénotypiques émanant de l'étude de LT CD4 potentiellement cytotoxiques dans divers pathologies où elles exerceraient une fonction déterminante : infections virales ou bactériennes persistantes, maladies inflammatoires ou pathologies auto-immunes, ont permis de définir un ensemble de marqueurs discriminants correspondant aux phénotypes des chCD4 effecteurs identifiés dans les cancers. Cependant, la définition de phénotype cytotoxique-like soulève un grand nombre d'interrogations quant à la signification de l'expression ou la perte d'expression de ces marqueurs à la surface des chCD4 effecteurs. L'absence de CD28, caractéristique des stimulations chroniques, pourrait survenir en réponse à une activation continue des chCD4, cependant elle n'est pas coordonnée à une expression de PD-1, suggérant que ce mécanisme pourrait intervenir dans la sélection des chCD4 cytotoxiques répondeurs sous des conditions environnementales particulières. L'expression concomitante de 2B4 dans ces circonstances, pourraient être essentielle dans le renforcement du signal TCR nécessaire à la fonction des chCD4 effecteurs (Altvater et al., 2009). L'induction de voies de stimulation alterne consécutive ou causale à la perte d'expression de CD28 n'a pas été explorée au cours de cette étude, mais serait utile à la compréhension de la séquence des événements conduisant à la différenciation de ces cellules. Morishita et al. ont montré l'existence, chez des donneurs sains, d'une sous-population de CD4 effecteur cytotoxiques où l'expression de CD11b et CD28 étaient réciproquement et mutuellement exclusive (Morishita et al., 1986; Morishita et al., 1989). Ces résultats, confirmés par l'étude phénotypique des chCD4 effecteurs, suggèrent que l'expression différentielle de CD11b et CD28 dans les chCD4 serait contrôlée par un mécanisme moléculaire commun. Par analogie de fonction chez les LT CD8 (Nielsen et al., 1994), le CD11b pourraient être impliqué dans la migration des chCD4 effecteurs vers le site de l'inflammation. Il aurait pour rôle de faciliter la diapédèse. Cette étude a permis de démontrer en reliant chacun de ces paramètres à une seule et unique sous-population, que les LT CD4 cytotoxiques, préalablement identifiés chez l'Homme dans un contexte non tumoral, joueraient un rôle important dans l'immunité anti-tumorale et notamment dans la réponse aux CNA. Elle établit pour la première fois une relation entre la réponse immune tumorale et celle occasionnée à la suite d'une stimulation chronique lors d'infections virales ou bactériennes, ou lors du développement de pathologies auto-immunes. L'établissement d'un tel parallèle est fondamental pour la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant à stimuler spécifiquement ces cellules et pourra secondairement conduire à leur utilisation dans le traitement des cancers. Les chCD4 pourraient représenter une cible de choix pour des immunostimulants comme les anti-4-1BB ou anti-OX40 mais également représenter une population d'intérêt en thérapie cellulaire.

## 10. Perspectives

L'ensemble de ce travail montre l'importance d'études longitudinales chez les patients dans le suivi de la réponse immune anti-tumorale. Elles permettent d'augmenter la puissance statistique des données à partir d'effectifs minimum. Cette approche a permis de mettre en évidence une augmentation des LT CD4 cytotoxiques en lien avec la tumeur et le rôle immuno-stimulateur de la CNA dans les cancers du sein. Elle a également permis d'évaluer l'impact de la dynamique tumorale sur les lymphocytes circulants en dehors de tout traitement soulignant l'importance de l'immunogénicité des tumeurs dans la réponse immune. Parallèlement, elle a permis de confirmer l'effet différentiel d'agents chimiques combinés sur les différentes sous-populations lymphocytaires. L'absence de renseignements sur le microenvironnement tumoral et notamment sur la diversité cellulaire qui l'habite, représente néanmoins un obstacle à la compréhension de la cinétique du développement ou de la recirculation des chCD4 en cours de traitement. Pour répondre à ce manque, il est indispensable d'envisager des études rétrospectives des tumeurs concernées et de mettre en place des études prospectives sur des tumeurs fraîchement isolées, dans les différentes situations thérapeutiques que représentent les traitements par CA et CNA. De telles études nécessitent une logistique adaptée. En effet, l'évaluation systématique et précise de la taille des cibles tumorales selon des critères standardisés est indispensable à la quantification exacte des régressions tumorales sous CNA et à la classification des tumeurs en fonction de la masse tumorale dans CA.

### 10.1. Analyse rétrospective des tumeurs

La capacité des chCD4 à infiltré les tissus a été démontré par la mise en évidence récente, de la présence de LT  $CD4^+CD127^+CD25^-Foxp3^-$ , dans les papillomatoses respiratoires récidivantes (Hatam et al., 2012). Cette étude permet d'envisager positivement la détection de chCD4 dans les tumeurs. Cependant, l'identification des chCD4 intra-tumoraux, de manière rétrospective sur les échantillons disponibles par technique immuno-histologique, nécessite de disposer d'un ou plusieurs marqueurs discriminant afin de distinguer avec certitude ces cellules des autres types cellulaires infiltrant la tumeur. Par conséquent, la quantification des chCD4 au sein de la tumeur apparait complexe. En effet, l'absence d'expression des marqueurs CD127, CD25, CD28 et CD27 (mais également de FoxP3 et Helios) et l'expression de 2B4, CD11b et CD45RO marqueurs non restreints aux chCD4, limitent considérablement le champ d'exploration par les techniques immuno-histologiques, la détection des chCD4 *in situ*, nécessitant une combinaison minimum d'anticorps incluant systématiquement des anticorps dirigés contre le CD3 et le CD4. Dans notre étude, l'expression de 2B4 et CD11b à la surface des chCD4 effecteurs a été déterminée dans le sang périphérique des patients. Le maintien de leur expression dans les tissus où les cellules sont potentiellement soumises à une activation constante, est à démontrer. Des études préliminaires sur des tissus infiltrés provenant de pathologies chroniques telles que les papillomatoses respiratoires récidivantes, permettraient de définir la combinaison de marqueurs la plus pertinente. La mise en évidence de marqueurs spécifiques de ces cellules et des éventuels facteurs de transcriptions indispensables à leur développement implique de concentrer les efforts sur la compréhension de l'ontogénie de ces cellules.

## **10.2. Analyse prospective des tumeurs**

Elle présente l'avantage de pouvoir étudier la composition cellulaire des tumeurs et de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à l'établissement d'une réponse immune anti-tumorale. L'utilisation d'outils d'analyses multiparamétriques, comme la cytométrie en flux pouvant combiner jusqu'à 14 marqueurs dans un même panel, permet à partir d'un nombre restreint de cellules d'explorer quantitativement les sous-populations présentes dans le microenvironnement tumorale.

### **10.2.1. Tumeurs non traitées**

Dans les cancers du sein, l'accès à la tumeur dans sa totalité avant traitement est possible chez les patientes éligibles à une chimiothérapie adjuvante. L'analyse phénotypique et histologique des tumeurs dans ce contexte, permet de définir des relations entre structure et composition cellulaire de la tumeur. La corrélation entre la densité de l'infiltrat et la présence de structures lymphoïdes tertiaires a déjà été mise en évidence par Gu-Trantien et al. et semble constituer une caractéristique majeure dans l'évolution de la maladie. La prédominance d'une population lymphocytaire avant traitement, dans la tumeur, permet de définir sa valeur prédictive. L'impact de TILs sur l'évolution de la maladie sous traitement est évalué par la survie globale et la survie sans récurrences. En raison du temps relativement long nécessaire à la détermination de ces paramètres, nombre d'études ont été menées de manière rétrospective et sont basées sur des signatures géniques. Cependant, en dehors de la détermination d'une valeur prédictive, l'étude des TILs en relation avec les sous-populations lymphocytaires présentes en périphérie avant et après résection de la tumeur permettraient de définir plus précisément si la tumeur conditionne le maintien et/ou le développement de certaines sous-populations lymphocytaires.

### **10.2.2. Tumeurs traitées**

L'évaluation de paramètres biologiques sous chimiothérapie néo-adjuvante présente l'avantage de pouvoir être corrélés directement à la réponse clinique. La résolution complète de la tumeur après traitement est un critère qui peut se substituer à la survie sans récurrence ou la survie globale. Seulement comme évoqué précédemment, les études comparant les effets de la chimiothérapie sur le système immunitaire au cours du traitement sont limitées par l'accès à la tumeur avant traitement et la disponibilité de matériel après la chirurgie post-chimiothérapie. Avant traitement, la tumeur n'est accessible que sous forme de biopsies pré-thérapeutiques, par conséquent l'analyse de l'infiltrat lymphocytaire est restreinte à des études immuno-histologiques et génétiques. En fin de traitement, l'absence de cellules tumorales dans les pièces de résection ne signifie pas obligatoirement la disparition de tout infiltrat lymphocytaire dans les tissus cicatriciels et devrait être soumise à une analyse systématique. Ces études sont primordiales sur plusieurs points. (i) L'analyse phénotypique et histologique des pièces de résection après CNA, permettrait de déterminer la persistance de certaines populations lymphocytaires ainsi que de structures différenciées dans les tissus cicatriciels ou la tumeur résiduelle. Si la formation de structures lymphoïdes tertiaires adjacentes à la tumeur est une constituante de l'environnement tumorale, leur involution après CNA n'a jamais été explorée. (ii) La comparaison de l'évolution de sous-populations intra-tumorales à celle du sang périphérique est essentielle à la compréhension de la dynamique de la réponse immune au cours du traitement. Le sang périphérique est le compartiment reliant structures lymphoïdes et

tissus. L'identification de modifications qualitatives et quantitatives des populations lymphocytaires circulantes en corrélation avec la composition des infiltrats lymphoïdes présents dans tumeur, permettrait de définir des facteurs pronostiques et prédictifs qui limiteraient les gestes invasifs.

Ces études prospectives auraient pour objectif principale de définir la place exacte des chCD4 dans l'immunité anti-tumorale. Or, avant leur mise en place il est nécessaire d'approfondir nos connaissances sur la caractérisation de ces cellules ainsi que les mécanismes régulateurs auxquels elles peuvent être soumises.

### **10.3. Spécificité antigénique des chCD4**

L'étude menée sur les chCD4 a permis de démontrer le potentiel cytotoxique de ces cellules par la présence de granules cytoplasmiques concentrant perforine et granzyme B capable d'être mobilisées lors de tests de cytotoxicité redirigée pour lyser des cellules cibles. Cette expérience utilisant des microbilles bispécifiques capable de liées d'une part les cellules cibles et d'autre part le TCR des effecteurs, disposent les cellules dans une conformation spatiale qui implique une lyse par la libération de granules cytotoxiques plutôt qu'une induction de FAS/FASL par contact direct. Cependant, la spécificité antigénique de ces cellules envers la tumeur, fortement suggérée dans les Mum par l'analyse du répertoire des chCD4, comme dans les cancers du sein par l'impact de la résection tumorale avant CA et l'expansion sous CNA, n'a pu être directement mise en évidence en l'absence d'outils et de connaissance suffisante de la tumeur. L'identification de chCD4 spécifiques d'antigènes tumoraux permettrait de prouver sans équivoque, l'activité anti-tumorale de ces cellules. Cependant, à l'heure actuelle plusieurs obstacles s'opposent à cette démonstration. (i) Les protocoles de monitoring de la réponse immune dans les cancers du sein et dans les Mum qui ont conduit à la caractérisation des chCD4 n'intégraient pas le recueil des tumeurs fraîches. Dans ces conditions, il n'a pu être établi de lignées tumorales autologues pouvant servir à des tests de cytotoxicité directe. (ii) Les expériences de re-stimulation *in vitro* des chCD4 effecteurs isolés des patients entreprises jusqu'à maintenant, n'ont pas permis d'aboutir à la prolifération de ces cellules, nécessaire à l'établissement de clones stables. Leur incapacité à s'expandre *in vitro*, pourrait être lié aux propriétés intrinsèques des cellules ou aux conditions expérimentales. En effet, les chCD4 effecteurs pourraient représenter le stade ultime de différenciation des chCD4 et seraient donc limitées à leur stricte fonction effectrice. Leur accumulation dans le sang périphérique traduirait alors leur capacité à persister après différenciation. Parallèlement, le besoin spécifique de ces cellules en facteurs de croissance et/ou de l'activation de voies de co-stimulation particulières, pourraient être à l'origine de l'absence d'expansion *in vitro*.

#### **10.3.1. Quantification des chCD4 spécifiques de la tumeur**

Le séquençage des TCR des chCD4 partageant la même chaîne V $\beta$  permettrait la détermination de la variation des régions CDR3 et d'évaluer la proportion d'expansion monoclonal parmi ces cellules. Classiquement, l'utilisation de tétramers conjugués à un fluorochrome en cytométrie de flux, permet l'identification de clones T reconnaissant un antigène donné dans un contexte CMH précis. Cette méthode de quantification implique la connaissance des antigènes associés à la tumeur, de leur expression par les cellules tumorales ainsi que la disponibilité d'outils de détection appropriés (tétramers class II). En l'absence de

ces renseignements, la séquence de TCR dominants dans une sous-population T, aisément accessible grâce aux nouvelles techniques de séquençage au débit, constitue une alternative à la quantification de clones T expansus *in vivo* (Emerson et al., 2013).

### 10.3.2. Détermination de la spécificité antigénique

Les méthodes classiques d'identification de peptides d'intérêts consistent à évaluer la capacité d'un clone T à répondre de manière spécifique à une stimulation par un peptide donné dans un contexte CMH restreint, cette stimulation conduisant à la production de cytokines par le clone T considéré et/ou sa prolifération. La détermination de la séquence d'un TCR peut être à l'origine du développement d'outil servant à l'identification des antigènes reconnus par les LT exprimant ce TCR. En effet, la génération de TCR solubles sous forme de multimères conjugués à un fluorochrome (Kappler et al., 1994), au même titre que les tétramères, peuvent permettre le criblage de banque de peptides associées à une molécule de CMH *figure 35*. La constitution de banques de peptides associées à une molécule de CMH est réalisée à partir de cellules d'insecte infectées par des baculovirus, transfectés par des plasmides codant pour une molécule de CMH classe II modifiée afin que son expression soit retenue à la membrane des cellules d'insecte et pour des peptides dont les séquences peuvent être déterminées par des logiciels de prédiction d'épitopes classe II à partir de protéines tumorales données (Birnbaum et al., 2012; Crawford et al., 2006). Les TCR multimériques solubles vont se fixer spécifiquement sur les molécules de CMH classe II présentant des peptides d'intérêt dans la bonne conformation et permettre leur identification. L'intensité du signal étant proportionnel au nombre de molécules de CMH classe II présentes à la surface des cellules d'insecte, une expression homogène peut permettre une estimation de l'affinité et/ou de l'avidité relative du TCR pour le complexe CMH/peptide. La caractérisation d'antigènes tumoraux est primordiale pour le développement de tétramères classe II et pour la quantification d'expansions clonales liées au phénotype particulier des chCD4.

### 10.3.3. Différenciation en CD4 cytotoxiques liée à la stimulation antigénique

Dans l'hypothèse où les chCD4 constitueraient un stade ultime de différenciation des chCD4, s'opposant à leur prolifération, la connaissance de leur spécificité antigénique pourrait contribuer à identifier les mécanismes conduisant à la différenciation de ces cellules. En effet, l'activation de LT CD4 mémoires de patients partageant la même spécificité antigénique, provenant soit de chCD4 soit LT CD4 conventionnels, permettrait de définir si comme précédemment envisager, les chCD4 effecteurs dérivent de la différenciation de chCD4 et constituent un lignage distinct. Dans ces conditions, seules les chCD4 mémoires devraient conduire à la polarisation d'effecteurs cytotoxiques. Pour suivre leur différenciation *in vitro*, l'isolement des cellules répondeuses en fonction de leur phénotype peut s'effectuer en sélectionnant les LT CD4 exprimant CD40L à leur surface après activation selon le protocole décrit par Chattopadhyay et al. (Chattopadhyay et al., 2006). Cette méthode présente l'avantage de ne pas interagir directement avec le TCR.

#### 10.4. Potentiel thérapeutique des chCD4

L'identification, chez l'Homme, de LT CD4 aux propriétés cytotoxiques place désormais les LT CD4 sur le même plan que les LT CD8 dans l'immunité anti-tumorale et contribue à élargir le potentiel thérapeutique de ces cellules. La détection de chCD4 cytotoxiques chez les patients atteints de cancer, pourrait constituer un marqueur de l'immunogénicité des tumeurs, conduisant à adapter les traitements des cancers pour en potentialiser les effets bénéfiques. En dehors de tout traitement, la présence coordonnée d'effecteurs chCD4 et LT CD8 permettrait de sélectionner les patients éligibles à une immunothérapie visant à consolider la réponse immune anti-tumorale spontanée. L'immunothérapie pourrait alors être considérée comme une alternative à la chimiothérapie adjuvante.

Le rôle exacte de la chimiothérapie néo-adjuvante sur l'expansion des chCD4 n'est pas complètement déterminé, mais résulte probablement de la combinaison de plusieurs facteurs : l'induction d'une lymphopénie, la stimulation de l'immunogénicité, la levée de l'immunosuppression et la modification du microenvironnement tumoral. La génération de chCD4 effecteurs pourrait permettre d'identifier les patients pour lesquels l'association chimiothérapie/immunothérapie serait bénéfique.

Pour stimuler la réponse anti-tumorale spontanée, il est important d'identifier les mécanismes de régulation de la fonction des chCD4 et l'impact des thérapies ciblées, notamment des immunostimulants qui pourraient contribuer à moduler leur action.

En effet, les immuno-modulateurs constituent une nouvelle approche thérapeutique dans le traitement des cancers. L'utilisation d'anticorps monoclonaux ou de protéines recombinantes de fusion ciblant spécifiquement les molécules impliquées dans la transmission de signaux cellulaires à la surface des cellules de l'immunité permettrait d'orienter favorablement la réponse immunitaire vers une réponse anti-tumorale efficace et d'inverser l'hypo-réactivité constatée du système immunitaire envers les tumeurs. Les immuno-modulateurs peuvent être classifiés en deux groupes : les molécules antagonistes qui vont bloquer ou neutraliser les interactions entre récepteurs et ligands (anti PD-1, anti PDL-1, anti CTLA-4, anti-LAG-3, anti-GITR) et les molécules agonistes qui vont stimuler les voies de signalisation en mimant l'action de ligands sur leurs récepteurs (anti-OX40, anti-4-1BB, anti-CD40). L'expression spatio-temporelle de ces molécules au cours de l'activation de la réponse immune et leur rôle distinct dans l'infléchissement de l'immunité anti-tumorale, nécessite la compréhension précise des mécanismes individuels engageant leurs voies de signalisation afin d'optimiser leur effet thérapeutique et de minimiser les effets secondaires potentiels.

L'approbation en 2011 par la *Food and Drug Administration* (FDA) de l'utilisation d'un anti-CTLA4, l'Ipilimumab dans le traitement des mélanomes métastatiques constitue un tournant dans la prise en charge médicamenteuse des cancers (Hodi et al., 2010) ([www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm1193237.htm](http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm1193237.htm)). Dans divers types de cancer réfractaire aux traitements conventionnels, l'obtention de réponses objectives et durables chez des patients traités par un anti PD-1 confirme l'importance de ces nouvelles thérapies dans le traitement des cancers (Topalian et al., 2012) **figure 36**. Les travaux menés par Topalian et al., révèlent que l'expression de PDL-1, ligand de PD-1 par les cellules tumorales représente un marqueur moléculaire de choix pour la sélection des patients éligibles à une immunothérapie anti-PD-1, les auteurs n'ayant décelé de réponses objectives que chez les patients dont les tumeurs exprimaient PDL-1. Parallèlement, Brahmer et al. ont montré que l'administration d'un anti-PDL-1 chez des patients porteurs de tumeurs avancées,

présentait une activité clinique similaire au traitement par anti-PD-1 (Brahmer et al., 2012). Ces résultats valident le rôle de la voie de signalisation PD-1/PDL-1 dans les mécanismes de résistance mise en place par la tumeur afin d'échapper à l'immunosurveillance.

#### 10.4.1. PD-1/PDL-1 et lymphocytes CD4 effecteurs

PDL-1 (B7H1) est une protéine de surface qui est constitutivement exprimée sur les cellules présentatrices de l'antigène, mais qui est également inductible en réponse aux cytokines pro-inflammatoires, dans une large variété de tissus et de types cellulaires telles les cellules épithéliales et endothéliales. Initialement identifié dans le processus d'apoptose des hybridomes impliquant la mort cellulaire programmée (Ishida et al., 1992), son récepteur PD-1 est induit lors de l'activation, à la surface des cellules immunes (Agata et al., 1996). Le rôle de PD-1, dans le contrôle de l'activation des lymphocytes T et la maintenance de la tolérance périphérique, a été établi chez la souris. La délétion du gène codant pour PD-1 chez les souris, conduisait au développement de pathologies auto-immunes, se manifestant en fonction du modèle murin par le développement d'auto-anticorps et/ou l'expansion de cellules T auto-réactives (Nishimura et al., 1999; Okazaki et al., 2003; Wang et al., 2005). Ces résultats suggèrent que la voie de signalisation impliquant PD-1 pourrait constituer un mécanisme clé de la régulation de la réponse immune touchant tout particulièrement les LT CD4.

La voie de signalisation PD-1/PDL-1 serait à l'origine de l'épuisement, ou « exhaustion » des cellules T. L'« exhaustion » consiste en la perte de fonctionnalité des cellules T antigène-spécifiques. Elle serait consécutive à une exposition persistante à l'antigène et se traduirait par une diminution de la sécrétion de cytokines, de la cytotoxicité et de la capacité proliférative de ces cellules. Ce mécanisme régulateur de la réponse immune a été initialement décrit pour les CD8 dans des modèles murins d'infection virale chronique (Zajac et al., 1998) et associé à une signature génétique singulière mettant en évidence la surexpression de gènes codant pour des récepteurs inhibiteurs, incluant PD-1 (Wherry et al., 2007). Des études subséquentes ont montrées que les LT CD4 pouvaient être également affectés par ce mécanisme régulateur. Dans le VIH, l'expression de PD-1 sur les LT CD4 était positivement corrélé à la charge virale et inversement corrélé au nombre des LT CD4. L'inhibition *in vitro* de la voie de signalisation PD-1/PDL-1 par un anticorps bloquant anti PDL-1 permettait de restaurer la capacité proliférative des LT CD4 spécifiques du VIH (Day et al., 2006). PDL-1 étant exprimé sur grand nombre de tumeurs humaines d'origine tissulaire différente (Zou and Chen, 2008) ce mécanisme pourrait permettre aux tumeurs d'échapper à l'immunosurveillance anti-tumorale. Récemment, dans un modèle murin de mélanome induit, Goding et al. ont démontré que T-Regs et « exhaustion » des LT CD4 effecteurs pouvaient être des éléments conditionnant la survenue de récives et que le blocage de l'axe PD-1/PDL-1 contribuait à restaurer la fonctionnalité des LT CD4 spécifiques de la tumeur (Goding et al., 2013). Les auteurs ont montrés que la régression de tumeurs récidivantes requérait l'association d'un anti-PDL-1 à la déplétion effective des T-Regs. La co-administration d'un anti-LAG3 avec l'anti-PDL-1 conduisait au même effet thérapeutique. La synergie entre anti PDL-1 et anti-LAG-3, molécules ciblant chacune des récepteurs inhibiteurs distincts, pourrait contrecarrer la mise en place de mécanismes compensatoires liés au blocage d'une seule voie. En effet, l'augmentation de la sécrétion d'IFN $\gamma$  consécutive au blocage de la voie PD-1/PDL-1, conduirait à stimuler l'expression de molécules de CMH classe II, ligand de LAG-3 molécule exprimée à la surface des T-Reg, et à promouvoir l'immunosuppression. (Goding et al., 2013).

La voie de signalisation PD-1/PDL-1 intervient également dans la suppression de la réponse immune par les T-Regs et la régulation des T<sub>FH</sub>, mécanismes détaillés précédemment dans l'introduction (section T-Reg : mécanismes de suppression et section T<sub>FH</sub> : fonction des T<sub>FH</sub>). Par ailleurs, la voie PD-1/PDL-1 pourrait constituer un obstacle à l'action des chCD4 dans la régression tumorale. Cette hypothèse est sous-tendue par l'expression hétérogène de PD-1 à la surface des chCD4 dans les Mm et les cancers du sein (données non publiées).

Les résultats encourageants des essais de monothérapie menés chez l'Homme, nécessitent d'explorer le rôle de ces molécules dans l'expansion des chCD4 effecteurs. L'inhibition de la voie de signalisation PD-1/PDL-1 par des traitements anti-PD1 ou anti-PDL-1, pourrait contribuer à stimuler la réponse immune anti-tumorale potentiellement orchestrée par les chCD4.

## **10.5. Modèle hypothétique du mécanisme de différenciation des chCD4**

La caractérisation phénotypique des chCD4 soulève nombre d'interrogations quant aux mécanismes conduisant à leur différenciation et leur polarisation en LT CD4 effecteurs cytotoxiques. La perte de la molécule de co-stimulation CD28 pérenne chez les effecteurs de la population CD4<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> (chCD4), semble une caractéristique propre à leur différenciation en cellules effectrices cytotoxiques.

### **10.5.1. Relation entre CD25 et CD28 dans les chCD4 à partir du modèle T-Reg**

Dans la population T-Reg, l'expression de CD25 est considérée comme une caractéristique phénotypique majeure. La voie de signalisation engageant l'IL-2R $\alpha$  (CD25) n'est pas directement requise pour l'exercice de leur fonction suppressive, mais elle est indispensable au maintien de leur homéostasie permettant de garantir la tolérance périphérique, et contribue à renforcer l'expression de FoxP3. En effet, chez la souris, le déficit en l'IL-2R $\alpha$ , diminue le nombre de LT CD4 FoxP3<sup>+</sup> et induit le développement d'auto-immunités (Fontenot et al., 2005; Sakaguchi et al., 1995). Chez des souris génétiquement modifiées où la protéine FoxP3 n'est pas fonctionnelle, l'étude du développement et de la fonction des T-Reg démontre que l'activité suppressive des T-Regs est régie par FoxP3 (Lin et al., 2007). Dans ce modèle, bien que diminué l'expression CD25 est conservée suggérant que d'autres facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation de cette molécule.

L'expression de CD28 à la surface des T-Reg est maintenue indépendamment du stade de différenciation (données non publiées) contrairement ce que nous avons observé chez les chCD4. Chez la souris, Zhang et al. ont montré récemment que l'expression de CD28 était nécessaire à leur activité immuno-suppressive. La délétion conditionnelle de cette molécule dans des T-Reg n'influe pas de manière quantitative sur leur développement, le nombre de T-Reg étant équivalent à celui de souris sauvages en périphérie, mais conduisait à une perte de fonction favorisant l'apparition d'auto-immunités (Zhang et al., 2013). Les travaux de Tang et al. sur le rôle de CD28 dans l'homéostasie des T-Reg périphérique, a permis d'établir l'existence d'une relation entre CD25 et CD28. L'engagement de CD28 à la surface des T-Reg contribuerait en effet, à l'expression de CD25 (Tang et al., 2003). L'ensemble de ces données suggèrent l'existence d'un mécanisme de régulation contrôlant simultanément l'expression de ces deux molécules.

Le facteur de transcription Dec1 pourrait remplir en partie cette fonction. En effet, Dec1 en association avec le facteur de transcription Runx1 serait impliqué dans le

renforcement de l'expression de CD25 dans les T-Reg. Miyazaki et al. ont montré que les T-reg provenant de souris déficientes pour le gène *Dce1* présentaient une diminution drastique de l'expression de CD25. Dans ce modèle, ces souris développaient avec l'âge un syndrome lymphoprolifératif, concordant avec les observations relevées chez les souris *IL-2R<sup>-/-</sup>*. La fixation du complexe *Dce1/Runx1* à des éléments régulateurs du locus *IL-2R $\alpha$*  a permis de confirmer l'implication de *Dce1* dans la régulation de l'expression de CD25 dans les T-Reg (Miyazaki et al., 2010).

Outre la régulation de CD25, *Dce1* serait également dépendant de la voie de signalisation engageant CD28. Chez la souris, Bour-Jordan et al. ont démontré que CD28 était essentielle au développement et à la survie des T-Regs (Bour-Jordan et al., 2011). Ces résultats suggéraient une relation entre CD28 et *Dce1* dans les T-Reg, et donc un potentiel lien entre l'expression de CD25 et CD28 impliquant le facteur de transcription *Dce1*. Les travaux de Martinez-Llordella et al. ont eux permis d'établir que l'expression de *Dce1* était liée à la voie de signalisation mettant en jeu la molécule de co-stimulation CD28 (Martinez-Llordella et al., 2013). Dans un modèle murin d'encéphalomyélite, maladie auto-immune du système nerveux centrale, les auteurs ont observé que les souris déficientes en *Dce1* ne développaient pas la maladie, alors que les souris hétérozygotes n'étaient que partiellement protégées. Ces résultats tendraient à prouver que la signalisation par l'engagement de CD28 est primordiale dans la phase d'apprêtement des lymphocytes T CD4 auto-réactifs, permettant d'assurer leur expansion.

La compréhension des mécanismes moléculaires contribuant à la régulation de CD25 et CD28 dans les T-Reg suggère que le facteur de transcription *Dce1* pourrait jouer un rôle dans l'établissement du phénotype particulier des chCD4. Cependant, dans cette population, la perte d'expression de CD28 étant secondaire à celle de CD25. L'inactivation de *Dce1* conduisant à la perte d'expression de CD25 pourrait résulter de la répression d'autres facteurs de transcription coopérant avec *Dce1*. Dans les T-Reg Miyazaki et al. ont montré que la formation du complexe *Runx1/Dce1* était impliqué dans le contrôle de l'*IL-2R $\alpha$* . Dans l'hypothèse où la régulation de CD25 et CD28 dans les chCD4 serait contrôlée par les mêmes mécanismes transcriptionnels décrits dans les T-Reg, la répression de *Runx1* pourrait être considérée comme un évènement précoce.

### **10.5.2. Hypothétique programme de transcription conduisant à la fonction cytotoxique des chCD4**

Il a été démontré que la différenciation des LT CD8 en effecteurs cytotoxiques impliquait la coopération des facteurs de transcription *Runx3* et *Eomes* (T-box). Ensemble, ils orchestrent la régulation d'un réseau transcriptionnel complexe conduisant à l'acquisition de propriétés cytotoxiques. Le facteur de transcription T-bet serait rapidement induit après l'activation du TCR en présence de signaux de co-stimulations, conduisant à la production d'*IFN $\gamma$* , production soutenue secondairement par *Runx3*, présent dans les LT CD8 naïfs. *Runx3* permettrait également la production de granzyme B et aurait pour fonction de réprimer *Runx1* d'une part et d'activer *Eomes* nécessaire à l'expression de perforine d'autre part (Cruz-Guillot et al., 2009).

Ce schéma de différenciation pourrait potentiellement être transposé aux chCD4. L'expression potentielle de *Runx3* dans les chCD4 pourrait contribuer à l'inhibition de *Runx1*, proposée précédemment comme un mécanisme conduisant à la perte d'expression de CD25. Ce modèle corroborerait également l'hypothèse qu'*Eomes* dans les chCD4 serait à

l'origine de l'acquisition de caractéristiques cytotoxiques, notamment de l'expression de granzyme B et perforine.

Les travaux de Mucida et al. et de Reis et al. menés chez la souris, permettraient de concilier ces différentes hypothèses (Mucida et al., 2013; Reis et al., 2013). Les auteurs ont récemment mis en évidence que les facteurs de transcription impliqués dans le développement thymique des populations de LT pouvaient influencer de manière décisive sur leur fonction en périphérie. Au niveau du thymus, l'expression de ThPOK et de Runx3 sont mutuellement exclusives. A partir de précurseurs double positifs,  $CD4^+CD8^+$ , l'expression de ThPOK détermine le lignage des LT CD4, alors que Runx3 contrôle le développement des LT CD8.

Mucida et al. ont démontré qu'en réponse à une stimulation antigénique chronique, les LT CD4 matures pouvaient se différencier en effecteurs cytotoxiques fonctionnels. L'acquisition de ces propriétés fonctionnelles serait consécutive à la perte d'expression du facteur de transcription ThPOK qui constitue normalement la signature génique des LT CD4. Cette étude tend à prouver que les LT CD4 cytotoxiques ne représenteraient pas un stade de différenciation terminale des Th1 mais une population d'effecteurs distincte, caractérisée par la perte de ThPOK qui serait un évènement post-thymique mettant probablement en jeu la réactivation de l'élément régulateur, répresseur du gène ThPOK. Dans la muqueuse intestinale exposée à un grand nombre d'antigènes, pouvant potentiellement constituer des stimuli à l'origine de réactions inflammatoires, les auteurs ont constaté une accumulation de LT CD4 ThPOK<sup>-</sup>. Ces cellules présentaient la particularité d'être doublement positives pour l'expression des marqueurs CD4 et CD8, l'expression de CD8 étant toutefois restreinte à la seule chaîne  $\alpha$ . Ces lymphocytes  $CD4^+ThPOK^-CD8\alpha^+CD8\beta^-$ , à l'inverse des  $CD4^+ThPOK^+$  et à l'instar des LT CD8, étaient dotés de propriétés cytotoxiques. En effet, ces cellules exprimaient spécifiquement les molécules granzyme B et LAMP1 et étaient capables d'induire la lyse de cibles lors de tests de cytotoxicité redirigée. La caractérisation phénotypique et génotypique de ces cellules a également révélé l'expression d'Eomes, de perforine, de 2B4 et d'IFN $\gamma$ , molécules classiquement impliquées dans la fonction cytotoxique des LT CD8. Ces données suggèreraient que la perte spécifique de ThPOK serait à l'origine de la « dé-répression » d'un réseau de gènes normalement impliqués dans la fonction cytotoxique des LT CD8. Les auteurs ont également montré que les LT  $CD4^+ThPOK^-$  accumulés dans la muqueuse intestinale, résultaient d'une expansion, mais y persistaient à l'état quiescent. En effet, ces cellules étaient marquées positivement par le BrDU, marqueur de prolifération, d'une part et n'exprimaient pas Ki67, marqueur des cellules en cycle, d'autre part. Par ailleurs, leur réactivation *in vitro*, était conditionnée par la présence d'IL-15.

Reis et al. ont eux démontré que la perte de ThPOK dans cette population de LT CD4 cytotoxiques était concomitante à l'expression de Runx3, établissant que le mécanisme de différenciation des LT CD4 en effecteurs cytotoxiques était similaire à celui décrit chez les LT CD8. Ces travaux confirment les résultats obtenus par Mucida et al., et fournissent un certain nombre d'éléments nouveaux permettant une meilleure compréhension dans l'établissement de ce lignage. (i) La suppression post-thymique de ThPOK serait conditionnée par l'expression de Runx3. En effet, l'utilisation de protéines de fusion Runx3-YFP et ThPOK-GFP, n'a pas permis de mettre en évidence de LT CD4  $Runx3^-ThPOK^-$  alors que des LT  $CD4^+Runx3^+ThPOK^+$  ont pu être détectés en faible nombre, suggérant que la perte de ThPOK était secondaire à l'acquisition de Runx3 dans ces cellules. (ii) Cependant, le maintien de ThPOK n'était pas totalement effectif après la délétion conditionnelle de Runx3, évoquant la nécessité de facteurs additionnels dans le processus de modulation de ThPOK. (iii) Des expériences menées *in vivo* et *in vitro* ont montrés également que le développement de  $CD4^+Runx3^+ThPOK^-CD8\alpha^+$  pouvait être assujéti à la présence de TGF $\beta$  et/ou d'acide rétinoïque. (iv) En concordance avec la caractérisation des  $CD4^+ThPOK^-$ , l'acquisition de

Runx3 était associée à l'expression de 2B4 et de granzyme B. L'absence de FoxP3 et d'IL-17 permettait de distinguer les  $CD4^+Runx3^+ThPOK^-CD8\alpha^+$ , des Th17 et des T-Regs colonisant la muqueuse intestinale.

L'absence d'une signature génique spécifique constitue un obstacle majeur à la compréhension de l'ontogénie des chCD4 effecteurs. Les éléments décrits précédemment offrent de nouvelles pistes à explorer et pourraient potentiellement conduire à l'identification de marqueurs spécifiques de cette population et à définir leur mécanisme de différenciation.

## 11. Conclusion

Ce travail a permis la mise en évidence d'une nouvelle sous-population de LT CD4 : les chCD4. Ces cellules préexistantes chez les sujets sains seraient amenées à s'expandre et à se différencier en effecteurs cytotoxiques dans diverses situations pathologiques où une stimulation antigénique chronique est avérée. Leur rôle bénéfique ou délétère dépendrait du contexte : cancer ou auto-immunité, à l'inverse des T-Reg, suggérant qu'ils pourraient représenter leur contrepartie et seraient donc essentiels à l'équilibre général de l'immunité.

La description phénotypique extensive de ces cellules a également permis de mettre en évidence que la perte pérenne de CD28 et l'expression de 2B4 constitueraient des caractéristiques spécifiques de leur différenciation en effecteurs cytotoxiques.

Leur expansion dans les cancers de manière générale et plus particulièrement sous chimiothérapie néo-adjuvante en corrélation avec à la réponse clinique, soulève nombre d'interrogations quant aux conditions nécessaires à leur développement. A partir du modèle de différenciation précédemment proposé, la présence de TGF $\beta$ , facteur moléculaire important de l'immunosuppression favorable au développement tumorale, pourrait conditionner leur différenciation. La lymphopénie consécutive à la chimiothérapie, pourrait être alors perçue comme un évènement secondaire, indispensable à leur expansion, par la création d'une niche potentielle. Par ailleurs, la chimiothérapie pourrait contribuer directement au développement de chCD4 effecteurs en induisant une toxicité préférentielle sur T-Regs et/ou un relargage d'antigènes tumoraux lors de la lyse de la tumeur.

L'accès des ChCD4 effecteurs au site de la tumeur reste un élément important à définir. En effet, l'activité cytotoxique de ces cellules pourrait potentialiser l'effet cytotoxique de la chimiothérapie et également modifier le microenvironnement tumorale afin d'en faciliter l'accès aux autres composantes cellulaires de l'immunité anti-tumorale. La cinétique de la régression tumorale en fonction de l'évolution du ratio chCD4/CD8 au sein de la tumeur au cours de la chimiothérapie permettrait d'élucider ce dernier point. Difficilement envisageable chez l'homme, cette perspective s'adresse à des modèles animaux. Néanmoins, nos travaux suggèrent une coopération entre chCD4 et LT CD8. En effet, ils ont permis d'établir une corrélation positive entre les effecteurs LT CD8 et chCD4, corrélation en place sous chimiothérapie adjuvante, mais secondaire à la chimiothérapie néo-adjuvante.

L'étude des chCD4 dans un contexte tumoral, des plus informatives quant au rôle de l'immunité dans les cancers, souligne cependant la nécessité de concentrer les efforts sur la définition de nouveaux antigènes tumoraux et notamment d'épitopes classe II. Le développement de tétramers associés, permettra une meilleure compréhension de l'interconnexion des différentes sous-populations de LT CD4 entre elles et de suivre avec plus de précisions leur développement et leur localisation. La détermination des facteurs de transcription pouvant réguler leur ontogénie, permettrait d'identifier des marqueurs spécifiques et autoriserait des études rétrospectives pour en définir la valeur prédictive et/ou pronostique. De même, l'identification des mécanismes de régulation qui gouverne ces cellules est essentielle au contrôle de leur expansion et permettrait de prévenir les éventuelles effets indésirables.

La mise en évidence de LT CD4 cytotoxiques spécifiques de la tumeur représente une nouvelle alternative aux traitements des cancers que ce soit en thérapie cellulaire ou dans l'élaboration d'immunothérapies.

## 12. Bibliographie

Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., and Honjo, T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International immunology* 8, 765-772.

Ahearne, M. J., Willimott, S., Pinon, L., Kennedy, D. B., Miall, F., Dyer, M. J., and Wagner, S. D. (2013). Enhancement of CD154/IL4 proliferation by the T follicular helper (Tfh) cytokine, IL21 and increased numbers of circulating cells resembling Tfh cells in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 162, 360-370.

Allan, S. E., Crome, S. Q., Crellin, N. K., Passerini, L., Steiner, T. S., Bacchetta, R., Roncarolo, M. G., and Levings, M. K. (2007). Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *International immunology* 19, 345-354.

Altwater, B., Landmeier, S., Pscherer, S., Temme, J., Juergens, H., Pule, M., and Rossig, C. (2009). 2B4 (CD244) signaling via chimeric receptors costimulates tumor-antigen specific proliferation and in vitro expansion of human T cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 58, 1991-2001.

Ansel, K. M., Ngo, V. N., Hyman, P. L., Luther, S. A., Forster, R., Sedgwick, J. D., Browning, J. L., Lipp, M., and Cyster, J. G. (2000). A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 406, 309-314.

Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M. C., Ullrich, E., Saulnier, P., *et al.* (2007). Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13, 1050-1059.

Appay, V., Zaunders, J. J., Papagno, L., Sutton, J., Jaramillo, A., Waters, A., Easterbrook, P., Grey, P., Smith, D., McMichael, A. J., *et al.* (2002). Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *Journal of immunology* 168, 5954-5958.

Avery, D. T., Deenick, E. K., Ma, C. S., Suryani, S., Simpson, N., Chew, G. Y., Chan, T. D., Palendira, U., Bustamante, J., Boisson-Dupuis, S., *et al.* (2010). B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans. *The Journal of experimental medicine* 207, 155-171.

Awwad, M., and North, R. J. (1988). Cyclophosphamide (Cy)-facilitated adoptive immunotherapy of a Cy-resistant tumour. Evidence that Cy permits the expression of adoptive T-cell mediated immunity by removing suppressor T cells rather than by reducing tumour burden. *Immunology* 65, 87-92.

Aymeric, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Martins, I., Kroemer, G., Smyth, M. J., and Zitvogel, L. (2010). Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. *Cancer research* 70, 855-858.

- Baatar, D., Olkhanud, P., Sumitomo, K., Taub, D., Gress, R., and Biragyn, A. (2007). Human peripheral blood T regulatory cells (Tregs), functionally primed CCR4<sup>+</sup> Tregs and unprimed CCR4<sup>-</sup> Tregs, regulate effector T cells using FasL. *Journal of immunology* *178*, 4891-4900.
- Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J., and Hafler, D. A. (2001). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood. *Journal of immunology* *167*, 1245-1253.
- Balmanoukian, A., Ye, X., Herman, J., Laheru, D., and Grossman, S. A. (2012). The association between treatment-related lymphopenia and survival in newly diagnosed patients with resected adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Invest* *30*, 571-576.
- Bates, G. J., Fox, S. B., Han, C., Leek, R. D., Garcia, J. F., Harris, A. L., and Banham, A. H. (2006). Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *24*, 5373-5380.
- Bell, D., Chomarat, P., Broyles, D., Netto, G., Harb, G. M., Lebecque, S., Valladeau, J., Davoust, J., Palucka, K. A., and Banchereau, J. (1999). In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *The Journal of experimental medicine* *190*, 1417-1426.
- Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F., and Ochs, H. D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* *27*, 20-21.
- Beyer, M., Kochanek, M., Darabi, K., Popov, A., Jensen, M., Endl, E., Knolle, P. A., Thomas, R. K., von Bergwelt-Baildon, M., Debey, S., *et al.* (2005). Reduced frequencies and suppressive function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood* *106*, 2018-2025.
- Bihl, F., Pecheur, J., Breart, B., Poupon, G., Cazareth, J., Julia, V., Glaichenhaus, N., and Braud, V. M. (2010). Primed antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells are required for NK cell activation in vivo upon *Leishmania major* infection. *Journal of immunology* *185*, 2174-2181.
- Billings, P., Burakoff, S., Dorf, M. E., and Benacerraf, B. (1977). Cytotoxic T lymphocytes specific for I region determinants do not require interactions with H-2K or D gene products. *The Journal of experimental medicine* *145*, 1387-1392.
- Birnbaum, M. E., Dong, S., and Garcia, K. C. (2012). Diversity-oriented approaches for interrogating T-cell receptor repertoire, ligand recognition, and function. *Immunological reviews* *250*, 82-101.
- Booth, N. J., McQuaid, A. J., Sobande, T., Kissane, S., Agius, E., Jackson, S. E., Salmon, M., Falciani, F., Yong, K., Rustin, M. H., *et al.* (2010). Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4<sup>+</sup> regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO. *Journal of immunology* *184*, 4317-4326.
- Boshoff, C., and Weiss, R. (2002). AIDS-related malignancies. *Nat Rev Cancer* *2*, 373-382.

Bour-Jordan, H., Esensten, J. H., Martinez-Llordella, M., Penaranda, C., Stumpf, M., and Bluestone, J. A. (2011). Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/ B7 family. *Immunological reviews* 241, 180-205.

Bourgeois, C., Rocha, B., and Tanchot, C. (2002). A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science* 297, 2060-2063.

Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q., Hwu, W. J., Topalian, S. L., Hwu, P., Drake, C. G., Camacho, L. H., Kauh, J., Odunsi, K., *et al.* (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *The New England journal of medicine* 366, 2455-2465.

Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., and Forster, R. (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *The Journal of experimental medicine* 192, 1545-1552.

Brown, G., Malakouti, M., Wang, E., Koo, J. Y., and Levin, E. (2014). Anti-IL-17 phase II data for psoriasis: A review. *J Dermatolog Treat*.

Burnet, F. M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13, 1-27.

Cannons, J. L., Qi, H., Lu, K. T., Dutta, M., Gomez-Rodriguez, J., Cheng, J., Wakeland, E. K., Germain, R. N., and Schwartzberg, P. L. (2010). Optimal germinal center responses require a multistage T cell:B cell adhesion process involving integrins, SLAM-associated protein, and CD84. *Immunity* 32, 253-265.

Carrasco, J., Van Pel, A., Neyns, B., Lethe, B., Brasseur, F., Renkvist, N., van der Bruggen, P., van Baren, N., Paulus, R., Thielemans, K., *et al.* (2008). Vaccination of a melanoma patient with mature dendritic cells pulsed with MAGE-3 peptides triggers the activity of nonvaccine anti-tumor cells. *Journal of immunology* 180, 3585-3593.

Casazza, J. P., Betts, M. R., Price, D. A., Precopio, M. L., Ruff, L. E., Brenchley, J. M., Hill, B. J., Roederer, M., Douek, D. C., and Koup, R. A. (2006). Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4+ T lymphocytes with cellular maturation. *The Journal of experimental medicine* 203, 2865-2877.

Chaganti, S., Ma, C. S., Bell, A. I., Croom-Carter, D., Hislop, A. D., Tangye, S. G., and Rickinson, A. B. (2008). Epstein-Barr virus persistence in the absence of conventional memory B cells: IgM+IgD+CD27+ B cells harbor the virus in X-linked lymphoproliferative disease patients. *Blood* 112, 672-679.

Chapman, J. R., Webster, A. C., and Wong, G. (2013). Cancer in the transplant recipient. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3.

Chattopadhyay, P. K., Yu, J., and Roederer, M. (2006). Live-cell assay to detect antigen-specific CD4+ T-cell responses by CD154 expression. *Nat Protoc* 1, 1-6.

Chen, G., and Emens, L. A. (2013). Chemoimmunotherapy: reengineering tumor immunity. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 62, 203-216.

- Chen, X., Wan, J., Liu, J., Xie, W., Diao, X., Xu, J., Zhu, B., and Chen, Z. (2010). Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. *Lung Cancer* *69*, 348-354.
- Choi, Y. S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, T. C., Johnston, R. J., Monticelli, L., Lao, C., and Crotty, S. (2011). ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity* *34*, 932-946.
- Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R. I., Martinez, G. J., Rawal, S., Wang, Y. H., Lim, H., Reynolds, J. M., Zhou, X. H., *et al.* (2011). Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med* *17*, 983-988.
- Clark, W. H., Jr., Elder, D. E., Guerry, D. t., Braitman, L. E., Trock, B. J., Schultz, D., Synnestvedt, M., and Halpern, A. C. (1989). Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* *81*, 1893-1904.
- Correale, P., Aquino, A., Giuliani, A., Pellegrini, M., Micheli, L., Cusi, M. G., Nencini, C., Petrioli, R., Prete, S. P., De Vecchis, L., *et al.* (2003). Treatment of colon and breast carcinoma cells with 5-fluorouracil enhances expression of carcinoembryonic antigen and susceptibility to HLA-A(\*)02.01 restricted, CEA-peptide-specific cytotoxic T cells in vitro. *Int J Cancer* *104*, 437-445.
- Cosmi, L., De Palma, R., Santarlasci, V., Maggi, L., Capone, M., Frosali, F., Rodolico, G., Querci, V., Abbate, G., Angeli, R., *et al.* (2008). Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *The Journal of experimental medicine* *205*, 1903-1916.
- Coulie, P. G., Somville, M., Lehmann, F., Hainaut, P., Brasseur, F., Devos, R., and Boon, T. (1992). Precursor frequency analysis of human cytolytic T lymphocytes directed against autologous melanoma cells. *Int J Cancer* *50*, 289-297.
- Crawford, F., Jordan, K. R., Stadinski, B., Wang, Y., Huseby, E., Marrack, P., Slansky, J. E., and Kappler, J. W. (2006). Use of baculovirus MHC/peptide display libraries to characterize T-cell receptor ligands. *Immunological reviews* *210*, 156-170.
- Cruz-Guilloty, F., Pipkin, M. E., Djuretic, I. M., Levanon, D., Lotem, J., Lichtenheld, M. G., Groner, Y., and Rao, A. (2009). Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *The Journal of experimental medicine* *206*, 51-59.
- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., *et al.* (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* *10*, 942-949.
- Curran, M. A., Geiger, T. L., Montalvo, W., Kim, M., Reiner, S. L., Al-Shamkhani, A., Sun, J. C., and Allison, J. P. (2013). Systemic 4-1BB activation induces a novel T cell phenotype driven by high expression of Eomesodermin. *The Journal of experimental medicine* *210*, 743-755.

- Darrasse-Jeze, G., Bergot, A. S., Durgeau, A., Billiard, F., Salomon, B. L., Cohen, J. L., Bellier, B., Podsypanina, K., and Klatzmann, D. (2009). Tumor emergence is sensed by self-specific CD44<sup>hi</sup> memory Tregs that create a dominant tolerogenic environment for tumors in mice. *The Journal of clinical investigation* *119*, 2648-2662.
- Day, C. L., Kaufmann, D. E., Kiepiela, P., Brown, J. A., Moodley, E. S., Reddy, S., Mackey, E. W., Miller, J. D., Leslie, A. J., DePierres, C., *et al.* (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* *443*, 350-354.
- de Chaisemartin, L., Goc, J., Damotte, D., Validire, P., Magdeleinat, P., Alifano, M., Cremer, I., Fridman, W. H., Sautes-Fridman, C., and Dieu-Nosjean, M. C. (2011). Characterization of chemokines and adhesion molecules associated with T cell presence in tertiary lymphoid structures in human lung cancer. *Cancer research* *71*, 6391-6399.
- de Leval, L., Gisselbrecht, C., and Gaulard, P. (2010). Advances in the understanding and management of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br J Haematol* *148*, 673-689.
- de Leval, L., Rickman, D. S., Thielen, C., Reynies, A., Huang, Y. L., Delsol, G., Lamant, L., Leroy, K., Briere, J., Molina, T., *et al.* (2007). The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood* *109*, 4952-4963.
- DeGregori, J. (2013). Challenging the axiom: does the occurrence of oncogenic mutations truly limit cancer development with age? *Oncogene* *32*, 1869-1875.
- deLeeuw, R. J., Kost, S. E., Kakal, J. A., and Nelson, B. H. (2012). The prognostic value of FoxP3<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: a critical review of the literature. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *18*, 3022-3029.
- DeNardo, D. G., Brennan, D. J., Rexhepaj, E., Ruffell, B., Shiao, S. L., Madden, S. F., Gallagher, W. M., Wadhwani, N., Keil, S. D., Junaid, S. A., *et al.* (2011). Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer discovery* *1*, 54-67.
- Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., Roller, M., Muller, B. M., Komor, M., Budczies, J., Darb-Esfahani, S., Kronenwett, R., Hanusch, C., *et al.* (2010). Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *28*, 105-113.
- Di Mitri, D., Azevedo, R. I., Henson, S. M., Libri, V., Riddell, N. E., Macaulay, R., Kipling, D., Soares, M. V., Battistini, L., and Akbar, A. N. (2011). Reversible senescence in human CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> memory T cells. *Journal of immunology* *187*, 2093-2100.
- Dieci, M. V., Criscitiello, C., Goubar, A., Viale, G., Conte, P., Guarneri, V., Ficarra, G., Mathieu, M. C., Delaloge, S., Curigliano, G., and Andre, F. (2014). Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Ann Oncol* *25*, 611-618.

- Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R. M., Marincola, F. M., Leitman, S. F., Seipp, C. A., *et al.* (2002). A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 25, 243-251.
- Dudley, M. E., Yang, J. C., Sherry, R., Hughes, M. S., Royal, R., Kammula, U., Robbins, P. F., Huang, J., Citrin, D. E., Leitman, S. F., *et al.* (2008). Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26, 5233-5239.
- Dunham, R. M., Cervasi, B., Brenchley, J. M., Albrecht, H., Weintrob, A., Sumpter, B., Engram, J., Gordon, S., Klatt, N. R., Frank, I., *et al.* (2008). CD127 and CD25 expression defines CD4<sup>+</sup> T cell subsets that are differentially depleted during HIV infection. *Journal of immunology* 180, 5582-5592.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology* 3, 991-998.
- Elkord, E., Sharma, S., Burt, D. J., and Hawkins, R. E. (2011). Expanded subpopulation of FoxP3<sup>+</sup> T regulatory cells in renal cell carcinoma co-express Helios, indicating they could be derived from natural but not induced Tregs. *Clin Immunol* 140, 218-222.
- Elliott, M. R., Chekeni, F. B., Trampont, P. C., Lazarowski, E. R., Kadl, A., Walk, S. F., Park, D., Woodson, R. I., Ostankovich, M., Sharma, P., *et al.* (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461, 282-286.
- Emerson, R. O., Sherwood, A. M., Rieder, M. J., Guenthoer, J., Williamson, D. W., Carlson, C. S., Drescher, C. W., Tewari, M., Bielas, J. H., and Robins, H. S. (2013). High-throughput sequencing of T-cell receptors reveals a homogeneous repertoire of tumour-infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *The Journal of pathology* 231, 433-440.
- Facciabene, A., Peng, X., Hagemann, I. S., Balint, K., Barchetti, A., Wang, L. P., Gimotty, P. A., Gilks, C. B., Lal, P., Zhang, L., and Coukos, G. (2011). Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature* 475, 226-230.
- Faget, J., Biota, C., Bachelot, T., Gobert, M., Treilleux, I., Goutagny, N., Durand, I., Leon-Goddard, S., Blay, J. Y., Caux, C., and Menetrier-Caux, C. (2011). Early detection of tumor cells by innate immune cells leads to T(reg) recruitment through CCL22 production by tumor cells. *Cancer research* 71, 6143-6152.
- Fath, A. E., Bjorkstrom, N. K., Anthoni, M., Malmberg, K. J., and Malmstrom, V. (2010). Activating NK-cell receptors co-stimulate CD4(+)CD28(-) T cells in patients with rheumatoid arthritis. *European journal of immunology* 40, 378-387.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nature immunology* 4, 330-336.
- Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. (2005). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nature immunology* 6, 1142-1151.

- Foy, T. M., Laman, J. D., Ledbetter, J. A., Aruffo, A., Claassen, E., and Noelle, R. J. (1994). gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory. *The Journal of experimental medicine* 180, 157-163.
- Francisco, L. M., Salinas, V. H., Brown, K. E., Vanguri, V. K., Freeman, G. J., Kuchroo, V. K., and Sharpe, A. H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 206, 3015-3029.
- Frey, D. M., Droeser, R. A., Viehl, C. T., Zlobec, I., Lugli, A., Zingg, U., Oertli, D., Kettelhack, C., Terracciano, L., and Tornillo, L. (2010). High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 126, 2635-2643.
- Fridman, W. H., Pages, F., Sautes-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 12, 298-306.
- Fucikova, J., Kralikova, P., Fialova, A., Brtnicky, T., Rob, L., Bartunkova, J., and Spisek, R. (2011). Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer research* 71, 4821-4833.
- Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T., and Fujiyama, Y. (2003). Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52, 65-70.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., *et al.* (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960-1964.
- Ghebeh, H., Lehe, C., Barhoush, E., Al-Romaih, K., Tulbah, A., Al-Alwan, M., Hendrayani, S. F., Manogaran, P., Alaiya, A., Al-Tweigeri, T., *et al.* (2010). Doxorubicin downregulates cell surface B7-H1 expression and upregulates its nuclear expression in breast cancer cells: role of B7-H1 as an anti-apoptotic molecule. *Breast Cancer Res* 12, R48.
- Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., *et al.* (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* 15, 1170-1178.
- Ghiringhelli, F., Menard, C., Puig, P. E., Ladoire, S., Roux, S., Martin, F., Solary, E., Le Cesne, A., Zitvogel, L., and Chauffert, B. (2007). Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 56, 641-648.
- Gobert, M., Treilleux, I., Bendriss-Vermare, N., Bachelot, T., Goddard-Leon, S., Arfi, V., Biota, C., Doffin, A. C., Durand, I., Olive, D., *et al.* (2009). Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer research* 69, 2000-2009.

Godefroy, E., Wang, Y., Souleimanian, N. E., Scotto, L., Stevanovic, S., Chen, Y. T., Valmori, D., and Ayyoub, M. (2007). Assessment of CD4+ T cells specific for the tumor antigen SSX-1 in cancer-free individuals. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 56, 1183-1192.

Goding, S. R., Wilson, K. A., Xie, Y., Harris, K. M., Baxi, A., Akpinarli, A., Fulton, A., Tamada, K., Strome, S. E., and Antony, P. A. (2013). Restoring immune function of tumor-specific CD4+ T cells during recurrence of melanoma. *Journal of immunology* 190, 4899-4909.

Goldrath, A. W., Bogatzki, L. Y., and Bevan, M. J. (2000). Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *The Journal of experimental medicine* 192, 557-564.

Goldrath, A. W., Sivakumar, P. V., Glaccum, M., Kennedy, M. K., Bevan, M. J., Benoist, C., Mathis, D., and Butz, E. A. (2002). Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *The Journal of experimental medicine* 195, 1515-1522.

Gotot, J., Gottschalk, C., Leopold, S., Knolle, P. A., Yagita, H., Kurts, C., and Ludwig-Portugall, I. (2012). Regulatory T cells use programmed death 1 ligands to directly suppress autoreactive B cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 10468-10473.

Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud, S., Equeter, C., Libin, M., de Wind, A., Ravoet, M., Le Buanec, H., Sibille, C., Manfouo-Foutsop, G., *et al.* (2013). CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *The Journal of clinical investigation* 123, 2873-2892.

Hamai, A., Pignon, P., Raimbaud, I., Duperrier-Amouriaux, K., Senellart, H., Hiret, S., Douillard, J. Y., Bennouna, J., Ayyoub, M., and Valmori, D. (2012). Human T(H)17 immune cells specific for the tumor antigen MAGE-A3 convert to IFN-gamma-secreting cells as they differentiate into effector T cells in vivo. *Cancer research* 72, 1059-1063.

Hams, E., McCarron, M. J., Amu, S., Yagita, H., Azuma, M., Chen, L., and Fallon, P. G. (2011). Blockade of B7-H1 (programmed death ligand 1) enhances humoral immunity by positively regulating the generation of T follicular helper cells. *Journal of immunology* 186, 5648-5655.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., and Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology* 6, 1123-1132.

- Hatam, L. J., Devoti, J. A., Rosenthal, D. W., Lam, F., Abramson, A. L., Steinberg, B. M., and Bonagura, V. R. (2012). Immune suppression in premalignant respiratory papillomas: enriched functional CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells and PD-1/PD-L1/L2 expression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18, 1925-1935
- Hirschhorn-Cymerman, D., Budhu, S., Kitano, S., Liu, C., Zhao, F., Zhong, H., Lesokhin, A. M., Avogadri-Connors, F., Yuan, J., Li, Y., *et al.* (2012). Induction of tumoricidal function in CD4<sup>+</sup> T cells is associated with concomitant memory and terminally differentiated phenotype. *The Journal of experimental medicine* 209, 2113-2126.
- Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., *et al.* (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* 363, 711-723.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.
- Hornychova, H., Melichar, B., Tomsova, M., Mergancova, J., Urmínska, H., and Ryska, A. (2008). Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast carcinoma. *Cancer Invest* 26, 1024-1031.
- Hunder, N. N., Wallen, H., Cao, J., Hendricks, D. W., Reilly, J. Z., Rodmyre, R., Jungbluth, A., Gnjjatic, S., Thompson, J. A., and Yee, C. (2008). Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4<sup>+</sup> T cells against NY-ESO-1. *The New England journal of medicine* 358, 2698-2703.
- Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D., and Levitsky, H. (1998). The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *The Journal of experimental medicine* 188, 2357-2368.
- Infante-Duarte, C., Horton, H. F., Byrne, M. C., and Kamradt, T. (2000). Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *Journal of immunology* 165, 6107-6115.
- Ishida, T., Joh, T., Uike, N., Yamamoto, K., Utsunomiya, A., Yoshida, S., Saburi, Y., Miyamoto, T., Takemoto, S., Suzushima, H., *et al.* (2012). Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody (KW-0761) for relapsed adult T-cell leukemia-lymphoma: a multicenter phase II study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30, 837-842.
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., and Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 11, 3887-3895.
- Ivanov, II, McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., and Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell* 126, 1121-1133.

Jacobson, S., Richert, J. R., Biddison, W. E., Satinsky, A., Hartzman, R. J., and McFarland, H. F. (1984). Measles virus-specific T4+ human cytotoxic T cell clones are restricted by class II HLA antigens. *Journal of immunology* *133*, 754-757.

Jaleco, S., Swainson, L., Dardalhon, V., Burjanadze, M., Kinet, S., and Taylor, N. (2003). Homeostasis of naive and memory CD4+ T cells: IL-2 and IL-7 differentially regulate the balance between proliferation and Fas-mediated apoptosis. *Journal of immunology* *171*, 61-68.

Jones, R. L., Morison, N. B., Hannan, N. J., Critchley, H. O., and Salamonsen, L. A. (2005). Chemokine expression is dysregulated in the endometrium of women using progestin-only contraceptives and correlates to elevated recruitment of distinct leukocyte populations. *Hum Reprod* *20*, 2724-2735.

June, C. H. (2007). Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *The Journal of clinical investigation* *117*, 1466-1476.

Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 7556-7561.

Kappler, J., White, J., Kozono, H., Clements, J., and Marrack, P. (1994). Binding of a soluble alpha beta T-cell receptor to superantigen/major histocompatibility complex ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 8462-8466.

Keene, J. A., and Forman, J. (1982). Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* *155*, 768-782.

Kirkham, B. W., Lassere, M. N., Edmonds, J. P., Juhasz, K. M., Bird, P. A., Lee, C. S., Shnier, R., and Portek, I. J. (2006). Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). *Arthritis Rheum* *54*, 1122-1131.

Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G. A., Keller, J. L., Haddad, J., Jr., Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A., and Dalla-Favera, R. (2003). Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 2639-2644.

Klucar, P., Barnes, P. F., Kong, Y., Samten, B., Tvinnereim, A., Spallek, R., Nepom, G. T., Singh, M., and Shams, H. (2008). Characterization of effector functions of human peptide-specific CD4+ T-cell clones for an intracellular pathogen. *Hum Immunol* *69*, 475-483.

Knosp, C. A., and Johnston, J. A. (2012). Regulation of CD4+ T-cell polarization by suppressor of cytokine signalling proteins. *Immunology* *135*, 101-111.

- Kodumudi, K. N., Woan, K., Gilvary, D. L., Sahakian, E., Wei, S., and Djeu, J. Y. (2010). A novel chemoimmunomodulating property of docetaxel: suppression of myeloid-derived suppressor cells in tumor bearers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 4583-4594.
- Koebel, C. M., Vermi, W., Swann, J. B., Zerafa, N., Rodig, S. J., Old, L. J., Smyth, M. J., and Schreiber, R. D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450, 903-907.
- Kotsougiani, D., Pioch, M., Prior, B., Heppert, V., Hansch, G. M., and Wagner, C. (2010). Activation of T Lymphocytes in Response to Persistent Bacterial Infection: Induction of CD11b and of Toll-Like Receptors on T Cells. *International journal of inflammation* 2010, 526740.
- Krenacs, L., Schaerli, P., Kis, G., and Bagdi, E. (2006). Phenotype of neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma is consistent with activated follicular B helper T cells. *Blood* 108, 1110-1111.
- Krupnick, A. S., Gelman, A. E., Barchet, W., Richardson, S., Kreisel, F. H., Turka, L. A., Colonna, M., Patterson, G. A., and Kreisel, D. (2005). Murine vascular endothelium activates and induces the generation of allogeneic CD4+25+Foxp3+ regulatory T cells. *Journal of immunology* 175, 6265-6270.
- Kryczek, I., Banerjee, M., Cheng, P., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., Huang, E., Finlayson, E., Simeone, D., Welling, T. H., *et al.* (2009). Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 114, 1141-1149.
- Kryczek, I., Bruce, A. T., Gudjonsson, J. E., Johnston, A., Aphale, A., Vatan, L., Szeliga, W., Wang, Y., Liu, Y., Welling, T. H., *et al.* (2008). Induction of IL-17+ T cell trafficking and development by IFN-gamma: mechanism and pathological relevance in psoriasis. *Journal of immunology* 181, 4733-4741.
- Kryczek, I., Lange, A., Mottram, P., Alvarez, X., Cheng, P., Hogan, M., Moons, L., Wei, S., Zou, L., Machelon, V., *et al.* (2005). CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer research* 65, 465-472.
- Kryczek, I., Wei, S., Zhu, G., Myers, L., Mottram, P., Cheng, P., Chen, L., Coukos, G., and Zou, W. (2007a). Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma. *Cancer research* 67, 8900-8905.
- Kryczek, I., Wei, S., Zou, L., Altuwaijri, S., Szeliga, W., Kolls, J., Chang, A., and Zou, W. (2007b). Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *Journal of immunology* 178, 6730-6733.
- Ladanyi, A., Kiss, J., Mohos, A., Somlai, B., Liskay, G., Gilde, K., Fejos, Z., Gaudi, I., Dobos, J., and Timar, J. (2011). Prognostic impact of B-cell density in cutaneous melanoma. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 60, 1729-1738.

- Ladoire, S., Arnould, L., Apetoh, L., Coudert, B., Martin, F., Chauffert, B., Fumoleau, P., and Ghiringhelli, F. (2008). Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 2413-2420.
- Ladoire, S., Martin, F., and Ghiringhelli, F. (2011a). Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 60, 909-918.
- Ladoire, S., Mignot, G., Dabakuyo, S., Arnould, L., Apetoh, L., Rebe, C., Coudert, B., Martin, F., Bizollon, M. H., Vanoli, A., *et al.* (2011b). In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival. *The Journal of pathology* 224, 389-400.
- Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A., and Cua, D. J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine* 201, 233-240.
- Libri, V., Azevedo, R. I., Jackson, S. E., Di Mitri, D., Lachmann, R., Fuhrmann, S., Vukmanovic-Stejić, M., Yong, K., Battistini, L., Kern, F., *et al.* (2011). Cytomegalovirus infection induces the accumulation of short-lived, multifunctional CD4+CD45RA+CD27+ T cells: the potential involvement of interleukin-7 in this process. *Immunology* 132, 326-339.
- Lin, W., Haribhai, D., Relland, L. M., Truong, N., Carlson, M. R., Williams, C. B., and Chatila, T. A. (2007). Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nature immunology* 8, 359-368.
- Lin, Y. C., Chang, L. Y., Huang, C. T., Peng, H. M., Dutta, A., Chen, T. C., Yeh, C. T., and Lin, C. Y. (2009). Effector/memory but not naive regulatory T cells are responsible for the loss of concomitant tumor immunity. *Journal of immunology* 182, 6095-6104.
- Linnemann, C., Mezzadra, R., and Schumacher, T. N. (2014). TCR repertoires of intratumoral T-cell subsets. *Immunological reviews* 257, 72-82.
- Liu, J., Duan, Y., Cheng, X., Chen, X., Xie, W., Long, H., Lin, Z., and Zhu, B. (2011). IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 407, 348-354.
- Lohr, M., Edlund, K., Botling, J., Hammad, S., Hellwig, B., Othman, A., Berglund, A., Lambe, M., Holmberg, L., Ekman, S., *et al.* (2013). The prognostic relevance of tumour-infiltrating plasma cells and immunoglobulin kappa C indicates an important role of the humoral immune response in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 333, 222-228.
- Lubberts, E. (2008). IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis? *Cytokine* 41, 84-91.

- Ma, C. S., Hare, N. J., Nichols, K. E., Dupre, L., Andolfi, G., Roncarolo, M. G., Adelstein, S., Hodgkin, P. D., and Tangye, S. G. (2005). Impaired humoral immunity in X-linked lymphoproliferative disease is associated with defective IL-10 production by CD4<sup>+</sup> T cells. *The Journal of clinical investigation* *115*, 1049-1059.
- Ma, C. S., Pittaluga, S., Avery, D. T., Hare, N. J., Maric, I., Klion, A. D., Nichols, K. E., and Tangye, S. G. (2006). Selective generation of functional somatically mutated IgM<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, but not Ig isotype-switched, memory B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *The Journal of clinical investigation* *116*, 322-333.
- Mackensen, A., Ferradini, L., Carcelain, G., Triebel, F., Faure, F., Viel, S., and Hercend, T. (1993). Evidence for in situ amplification of cytotoxic T-lymphocytes with antitumor activity in a human regressive melanoma. *Cancer research* *53*, 3569-3573.
- Manici, S., Sturniolo, T., Imro, M. A., Hammer, J., Sinigaglia, F., Noppen, C., Spagnoli, G., Mazzi, B., Bellone, M., Dellabona, P., and Protti, M. P. (1999). Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4<sup>(+)</sup> cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11. *The Journal of experimental medicine* *189*, 871-876.
- Mantovani, A., and Locati, M. (2009). Orchestration of macrophage polarization. *Blood* *114*, 3135-3136.
- Martinez-Llordella, M., Esensten, J. H., Bailey-Bucktrout, S. L., Lipsky, R. H., Marini, A., Chen, J., Mughal, M., Mattson, M. P., Taub, D. D., and Bluestone, J. A. (2013). CD28-inducible transcription factor DEC1 is required for efficient autoreactive CD4<sup>+</sup> T cell response. *The Journal of experimental medicine* *210*, 1603-1619.
- Martins, G., and Calame, K. (2008). Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes. *Annual review of immunology* *26*, 133-169.
- Marturano, J., Longhi, R., Russo, V., and Protti, M. P. (2008). Endosomal proteases influence the repertoire of MAGE-A3 epitopes recognized in vivo by CD4<sup>+</sup> T cells. *Cancer research* *68*, 1555-1562.
- Maruyama, T., Kono, K., Izawa, S., Mizukami, Y., Kawaguchi, Y., Mimura, K., Watanabe, M., and Fujii, H. (2010a). CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to infiltration of regulatory T cells in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* *23*, 422-429.
- Maruyama, T., Kono, K., Mizukami, Y., Kawaguchi, Y., Mimura, K., Watanabe, M., Izawa, S., and Fujii, H. (2010b). Distribution of Th17 cells and FoxP3<sup>(+)</sup> regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes, tumor-draining lymph nodes and peripheral blood lymphocytes in patients with gastric cancer. *Cancer Sci* *101*, 1947-1954.
- Mazzucchelli, R., and Durum, S. K. (2007). Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nature reviews Immunology* *7*, 144-154.
- Melichar, B., Touskova, M., Dvorak, J., Jandik, P., and Kopecky, O. (2001). The peripheral blood leukocyte phenotype in patients with breast cancer: effect of doxorubicin/paclitaxel combination chemotherapy. *Immunopharmacol Immunotoxicol* *23*, 163-173.

- Meyerson, H. J., Awadallah, A., Pavlidakey, P., Cooper, K., Honda, K., and Miedler, J. (2013). Follicular center helper T-cell (TFH) marker positive mycosis fungoides/Sezary syndrome. *Mod Pathol* 26, 32-43.
- Min, B., Yamane, H., Hu-Li, J., and Paul, W. E. (2005). Spontaneous and homeostatic proliferation of CD4 T cells are regulated by different mechanisms. *Journal of immunology* 174, 6039-6044.
- Mishalian, I., Bayuh, R., Eruslanov, E., Michaeli, J., Levy, L., Zolotarov, L., Singhal, S., Albelda, S. M., Granot, Z., and Fridlender, Z. G. (2014). Neutrophils recruit regulatory T-cells into tumors via secretion of CCL17-A new mechanism of impaired antitumor immunity. *Int J Cancer*.
- Mitchison, N. A. (1971). The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. II. Cellular cooperation. *European journal of immunology* 1, 18-27.
- Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., *et al.* (2009). Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30, 899-911.
- Miyazaki, K., Miyazaki, M., Guo, Y., Yamasaki, N., Kanno, M., Honda, Z., Oda, H., Kawamoto, H., and Honda, H. (2010). The role of the basic helix-loop-helix transcription factor Dec1 in the regulatory T cells. *Journal of immunology* 185, 7330-7339.
- Mizukami, Y., Kono, K., Kawaguchi, Y., Akaike, H., Kamimura, K., Sugai, H., and Fujii, H. (2008). CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in gastric cancer. *Int J Cancer* 122, 2286-2293.
- Morishita, Y., Martin, P. J., Bean, M. A., Yamada, H., and Hansen, J. A. (1986). Antigen-specific functions of a CD4<sup>+</sup> subset of human T lymphocytes with granular morphology. *Journal of immunology* 136, 2095-2102.
- Morishita, Y., Sao, H., Hansen, J. A., and Martin, P. J. (1989). A distinct subset of human CD4<sup>+</sup> cells with a limited alloreactive T cell receptor repertoire. *Journal of immunology* 143, 2783-2789.
- Morre, M., and Beq, S. (2012). Interleukin-7 and immune reconstitution in cancer patients: a new paradigm for dramatically increasing overall survival. *Target Oncol* 7, 55-68.
- Mozaffari, F., Lindemalm, C., Choudhury, A., Granstam-Bjorneklett, H., Lekander, M., Nilsson, B., Ojutkangas, M. L., Osterborg, A., Bergkvist, L., and Mellstedt, H. (2009). Systemic immune effects of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide and/or radiotherapy in breast cancer: a longitudinal study. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 58, 111-120.
- Mucida, D., Husain, M. M., Muroi, S., van Wijk, F., Shinnakasu, R., Naoe, Y., Reis, B. S., Huang, Y., Lambolez, F., Docherty, M., *et al.* (2013). Transcriptional reprogramming of mature CD4<sup>(+)</sup> helper T cells generates distinct MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Nature immunology* 14, 281-289.

- Muller, D., Koller, B. H., Whitton, J. L., LaPan, K. E., Brigman, K. K., and Frelinger, J. A. (1992). LCMV-specific, class II-restricted cytotoxic T cells in beta 2-microglobulin-deficient mice. *Science* *255*, 1576-1578.
- Muraro, E., Martorelli, D., Turchet, E., Miolo, G., Scalone, S., Comaro, E., Talamini, R., Mastorci, K., Lombardi, D., Perin, T., *et al.* (2011). A different immunologic profile characterizes patients with HER-2-overexpressing and HER-2-negative locally advanced breast cancer: implications for immune-based therapies. *Breast Cancer Res* *13*, R117.
- Murta, E. F., de Andrade, J. M., Falcao, R. P., and Bighetti, S. (2000). Lymphocyte subpopulations in patients with advanced breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy. *Tumori* *86*, 403-407.
- Nakahara, T., Uchi, H., Lesokhin, A. M., Avogadri, F., Rizzuto, G. A., Hirschhorn-Cymerman, D., Panageas, K. S., Merghoub, T., Wolchok, J. D., and Houghton, A. N. (2010). Cyclophosphamide enhances immunity by modulating the balance of dendritic cell subsets in lymphoid organs. *Blood* *115*, 4384-4392.
- Namekawa, T., Wagner, U. G., Goronzy, J. J., and Weyand, C. M. (1998). Functional subsets of CD4 T cells in rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum* *41*, 2108-2116.
- Nielsen, H. V., Christensen, J. P., Andersson, E. C., Marker, O., and Thomsen, A. R. (1994). Expression of type 3 complement receptor on activated CD8+ T cells facilitates homing to inflammatory sites. *Journal of immunology* *153*, 2021-2028.
- Nielsen, J. S., Sahota, R. A., Milne, K., Kost, S. E., Nesslinger, N. J., Watson, P. H., and Nelson, B. H. (2012). CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27- memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *18*, 3281-3292.
- Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., and Honjo, T. (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* *11*, 141-151.
- North, R. J. (1982). Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells. *The Journal of experimental medicine* *155*, 1063-1074.
- Numasaki, M., Fukushi, J., Ono, M., Narula, S. K., Zavodny, P. J., Kudo, T., Robbins, P. D., Tahara, H., and Lotze, M. T. (2003). Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* *101*, 2620-2627.
- Numasaki, M., Watanabe, M., Suzuki, T., Takahashi, H., Nakamura, A., McAllister, F., Hishinuma, T., Goto, J., Lotze, M. T., Kolls, J. K., and Sasaki, H. (2005). IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *Journal of immunology* *175*, 6177-6189.

- Nurieva, R. I., Chung, Y., Martinez, G. J., Yang, X. O., Tanaka, S., Matskevitch, T. D., Wang, Y. H., and Dong, C. (2009). Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325, 1001-1005.
- Obeid, M. (2008). ERP57 membrane translocation dictates the immunogenicity of tumor cell death by controlling the membrane translocation of calreticulin. *Journal of immunology* 181, 2533-2543.
- Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G. M., Apetoh, L., Perfettini, J. L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., *et al.* (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13, 54-61.
- Oda, N., Shimazu, K., Naoi, Y., Morimoto, K., Shimomura, A., Shimoda, M., Kagara, N., Maruyama, N., Kim, S. J., and Noguchi, S. (2012). Intratumoral regulatory T cells as an independent predictive factor for pathological complete response to neoadjuvant paclitaxel followed by 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide in breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment* 136, 107-116.
- Oestreich, K. J., Mohn, S. E., and Weinmann, A. S. (2012). Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in TH1 cells to regulate flexibility with a TFH-like gene profile. *Nature immunology* 13, 405-411.
- Oestreich, K. J., and Weinmann, A. S. (2012). Master regulators or lineage-specifying? Changing views on CD4(+) T cell transcription factors. *Nature reviews Immunology* 12, 799-804.
- Ogino, S., Galon, J., Fuchs, C. S., and Dranoff, G. (2011). Cancer immunology--analysis of host and tumor factors for personalized medicine. *Nature reviews Clinical oncology* 8, 711-719.
- Okazaki, T., Tanaka, Y., Nishio, R., Mitsuiye, T., Mizoguchi, A., Wang, J., Ishida, M., Hiai, H., Matsumori, A., Minato, N., and Honjo, T. (2003). Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nat Med* 9, 1477-1483.
- Ozaki, K., Spolski, R., Feng, C. G., Qi, C. F., Cheng, J., Sher, A., Morse, H. C., 3rd, Liu, C., Schwartzberg, P. L., and Leonard, W. J. (2002). A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 298, 1630-1634.
- Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y. H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., and Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology* 6, 1133-1141.
- Pinto-Medel, M. J., Garcia-Leon, J. A., Oliver-Martos, B., Lopez-Gomez, C., Luque, G., Arnaiz-Urrutia, C., Orpez, T., Marin-Banasco, C., Fernandez, O., and Leyva, L. (2012). The CD4+ T-cell subset lacking expression of the CD28 costimulatory molecule is expanded and shows a higher activation state in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 243, 1-11.
- Polansky, J. K., Kretschmer, K., Freyer, J., Floess, S., Garbe, A., Baron, U., Olek, S., Hamann, A., von Boehmer, H., and Huehn, J. (2008). DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *European journal of immunology* 38, 1654-1663.

- Quezada, S. A., Simpson, T. R., Peggs, K. S., Merghoub, T., Vider, J., Fan, X., Blasberg, R., Yagita, H., Muranski, P., Antony, P. A., *et al.* (2010). Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *The Journal of experimental medicine* 207, 637-650.
- Rabenstein, H., Behrendt, A. C., Ellwart, J. W., Naumann, R., Horsch, M., Beckers, J., and Obst, R. (2014). Differential kinetics of antigen dependency of CD4+ and CD8+ T cells. *Journal of immunology* 192, 3507-3517.
- Rasheed, A. U., Rahn, H. P., Sallusto, F., Lipp, M., and Muller, G. (2006). Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression. *European journal of immunology* 36, 1892-1903.
- Ray-Coquard, I., Cropet, C., Van Glabbeke, M., Sebban, C., Le Cesne, A., Judson, I., Tredan, O., Verweij, J., Biron, P., Labidi, I., *et al.* (2009). Lymphopenia as a prognostic factor for overall survival in advanced carcinomas, sarcomas, and lymphomas. *Cancer research* 69, 5383-5391.
- Redjimi, N., Duperrier-Amouriaux, K., Raimbaud, I., Luescher, I., Dojcinovic, D., Classe, J. M., Berton-Rigaud, D., Frenel, J. S., Bourbouloux, E., Valmori, D., and Ayyoub, M. (2011). NY-ESO-1-specific circulating CD4+ T cells in ovarian cancer patients are prevalently T(H)1 type cells undetectable in the CD25+ FOXP3+ Treg compartment. *PLoS One* 6, e22845.
- Reis, B. S., Rogoz, A., Costa-Pinto, F. A., Taniuchi, I., and Mucida, D. (2013). Mutual expression of the transcription factors Runx3 and ThPOK regulates intestinal CD4(+) T cell immunity. *Nature immunology* 14, 271-280.
- Reuschenbach, M., von Knebel Doeberitz, M., and Wentzensen, N. (2009). A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 58, 1535-1544.
- Ridge, J. P., Di Rosa, F., and Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393, 474-478.
- Rodriguez Pinilla, S. M., Roncador, G., Rodriguez-Peralto, J. L., Mollejo, M., Garcia, J. F., Montes-Moreno, S., Camacho, F. I., Ortiz, P., Limeres-Gonzalez, M. A., Torres, A., *et al.* (2009). Primary cutaneous CD4+ small/medium-sized pleomorphic T-cell lymphoma expresses follicular T-cell markers. *Am J Surg Pathol* 33, 81-90.
- Romagnani, S., Maggi, E., Liotta, F., Cosmi, L., and Annunziato, F. (2009). Properties and origin of human Th17 cells. *Mol Immunol* 47, 3-7.
- Roncador, G., Brown, P. J., Maestre, L., Hue, S., Martinez-Torrecedrada, J. L., Ling, K. L., Pratap, S., Toms, C., Fox, B. C., Cerundolo, V., *et al.* (2005). Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *European journal of immunology* 35, 1681-1691.

- Rosenberg, S. A., Packard, B. S., Aebbersold, P. M., Solomon, D., Topalian, S. L., Toy, S. T., Simon, P., Lotze, M. T., Yang, J. C., Seipp, C. A., and et al. (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *The New England journal of medicine* 319, 1676-1680.
- 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. *Journal of immunology* 155, 1151-1164.
- Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annual review of immunology* 22, 745-763.
- Samaritani, R., Corrado, G., Vizza, E., and Sbiroli, C. (2007). Cyclophosphamide "metronomic" chemotherapy for palliative treatment of a young patient with advanced epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer* 7, 65.
- Santner-Nanan, B., Seddiki, N., Zhu, E., Quent, V., Kelleher, A., Fazekas de St Groth, B., and Nanan, R. (2008). Accelerated age-dependent transition of human regulatory T cells to effector memory phenotype. *International immunology* 20, 375-383.
- Schaerli, P., Willimann, K., Lang, A. B., Lipp, M., Loetscher, P., and Moser, B. (2000). CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *The Journal of experimental medicine* 192, 1553-1562.
- Scheeren, F. A., Naspetti, M., Diehl, S., Schotte, R., Nagasawa, M., Wijnands, E., Gimeno, R., Vyth-Dreese, F. A., Blom, B., and Spits, H. (2005). STAT5 regulates the self-renewal capacity and differentiation of human memory B cells and controls Bcl-6 expression. *Nature immunology* 6, 303-313.
- Schmidt, M., Bohm, D., von Torne, C., Steiner, E., Puhl, A., Pilch, H., Lehr, H. A., Hengstler, J. G., Kolbl, H., and Gehrman, M. (2008). The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer. *Cancer research* 68, 5405-5413.
- Schreck, S., Friebel, D., Buettner, M., Distel, L., Grabenbauer, G., Young, L. S., and Niedobitek, G. (2009). Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol* 27, 31-39.
- Schultz, E. S., Lethe, B., Cambiaso, C. L., Van Snick, J., Chau, P., Corthals, J., Heirman, C., Thielemans, K., Boon, T., and van der Bruggen, P. (2000). A MAGE-A3 peptide presented by HLA-DP4 is recognized on tumor cells by CD4+ cytolytic T lymphocytes. *Cancer research* 60, 6272-6275.
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S. I., Nanan, R., et al. (2006). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *The Journal of experimental medicine* 203, 1693-1700.

- Seresini, S., Origoni, M., Lillo, F., Caputo, L., Paganoni, A. M., Vantini, S., Longhi, R., Taccagni, G., Ferrari, A., Doglioni, C., *et al.* (2007). IFN-gamma produced by human papilloma virus-18 E6-specific CD4<sup>+</sup> T cells predicts the clinical outcome after surgery in patients with high-grade cervical lesions. *Journal of immunology* *179*, 7176-7183.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2001). IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* *410*, 1107-1111.
- Shimato, S., Maier, L. M., Maier, R., Bruce, J. N., Anderson, R. C., and Anderson, D. E. (2012). Profound tumor-specific Th2 bias in patients with malignant glioma. *BMC Cancer* *12*, 561.
- Sica, G. L., Choi, I. H., Zhu, G., Tamada, K., Wang, S. D., Tamura, H., Chapoval, A. I., Flies, D. B., Bajorath, J., and Chen, L. (2003). B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. *Immunity* *18*, 849-861.
- Slager, E. H., Borghi, M., van der Minne, C. E., Aarnoudse, C. A., Havenga, M. J., Schrier, P. I., Osanto, S., and Griffioen, M. (2003). CD4<sup>+</sup> Th2 cell recognition of HLA-DR-restricted epitopes derived from CAMEL: a tumor antigen translated in an alternative open reading frame. *Journal of immunology* *170*, 1490-1497.
- Sota, Y., Naoi, Y., Tsunashima, R., Kagara, N., Shimazu, K., Maruyama, N., Shimomura, A., Shimoda, M., Kishi, K., Baba, Y., *et al.* (2014). Construction of novel immune-related signature for prediction of pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in human breast cancer. *Ann Oncol* *25*, 100-106.
- Stoll, G., Enot, D., Mlecnik, B., Galon, J., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2014). Immune-related gene signatures predict the outcome of neoadjuvant chemotherapy. *Oncoimmunology* *3*, e27884.
- Strioga, M., Pasukoniene, V., and Characiejus, D. (2011). CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> and CD8<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> T cells and their role in health and disease. *Immunology* *134*, 17-32.
- Sugiyama, D., Nishikawa, H., Maeda, Y., Nishioka, M., Tanemura, A., Katayama, I., Ezoe, S., Kanakura, Y., Sato, E., Fukumori, Y., *et al.* (2013). Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 17945-17950.
- Sun, J. C., and Bevan, M. J. (2003). Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* *300*, 339-342.
- Sun, Q., Burton, R. L., and Lucas, K. G. (2002). Cytokine production and cytolytic mechanism of CD4(+) cytotoxic T lymphocytes in ex vivo expanded therapeutic Epstein-Barr virus-specific T-cell cultures. *Blood* *99*, 3302-3309.
- Tabachnyk, M., Distel, L. V., Buttner, M., Grabenbauer, G. G., Nkenke, E., Fietkau, R., and Lubgan, D. (2012). Radiochemotherapy induces a favourable tumour infiltrating inflammatory cell profile in head and neck cancer. *Oral Oncol* *48*, 594-601.

- Tang, Q., Henriksen, K. J., Boden, E. K., Tooley, A. J., Ye, J., Subudhi, S. K., Zheng, X. X., Strom, T. B., and Bluestone, J. A. (2003). Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Journal of immunology* *171*, 3348-3352.
- Tartour, E., Fossiez, F., Joyeux, I., Galinha, A., Gey, A., Claret, E., Sastre-Garau, X., Couturier, J., Mosseri, V., Vives, V., *et al.* (1999). Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer research* *59*, 3698-3704.
- Tassi, E., Gavazzi, F., Albarello, L., Senyukov, V., Longhi, R., Dellabona, P., Doglioni, C., Braga, M., Di Carlo, V., and Protti, M. P. (2008). Carcinoembryonic antigen-specific but not antiviral CD4<sup>+</sup> T cell immunity is impaired in pancreatic carcinoma patients. *Journal of immunology* *181*, 6595-6603.
- Tatsumi, T., Kierstead, L. S., Ranieri, E., Gesualdo, L., Schena, F. P., Finke, J. H., Bukowski, R. M., Mueller-Berghaus, J., Kirkwood, J. M., Kwok, W. W., and Storkus, W. J. (2002). Disease-associated bias in T helper type 1 (Th1)/Th2 CD4(+) T cell responses against MAGE-6 in HLA-DRB10401(+) patients with renal cell carcinoma or melanoma. *The Journal of experimental medicine* *196*, 619-628.
- Tesniere, A., Schlemmer, F., Boige, V., Kepp, O., Martins, I., Ghiringhelli, F., Aymeric, L., Michaud, M., Apetoh, L., Barault, L., *et al.* (2010). Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* *29*, 482-491.
- Teunissen, M. B., Koomen, C. W., de Waal Malefyt, R., Wierenga, E. A., and Bos, J. D. (1998). Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol* *111*, 645-649.
- Thornton, A. M., Korty, P. E., Tran, D. Q., Wohlfert, E. A., Murray, P. E., Belkaid, Y., and Shevach, E. M. (2010). Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells. *Journal of immunology* *184*, 3433-3441.
- Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., Powderly, J. D., Carvajal, R. D., Sosman, J. A., Atkins, M. B., *et al.* (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *The New England journal of medicine* *366*, 2443-2454.
- Topalian, S. L., Rivoltini, L., Mancini, M., Markus, N. R., Robbins, P. F., Kawakami, Y., and Rosenberg, S. A. (1994). Human CD4<sup>+</sup> T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 9461-9465.
- Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., Berger, A., Bruneval, P., Fridman, W. H., Pages, F., and Galon, J. (2011). Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer research* *71*, 1263-1271.

- Tsuchikawa, T., Md, M. M., Yamamura, Y., Shichinohe, T., Hirano, S., and Kondo, S. (2012). The immunological impact of neoadjuvant chemotherapy on the tumor microenvironment of esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* *19*, 1713-1719.
- Tzartos, J. S., Friese, M. A., Craner, M. J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M. M., and Fugger, L. (2008). Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* *172*, 146-155.
- Vacchelli, E., Galluzzi, L., Fridman, W. H., Galon, J., Sautes-Fridman, C., Tartour, E., and Kroemer, G. (2012a). Trial watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers. *Oncoimmunology* *1*, 179-188.
- Vacchelli, E., Galluzzi, L., Rousseau, V., Rigoni, A., Tesniere, A., Delahaye, N., Schlemmer, F. D., Menger, L., Sukkurwala, A. Q., Adjemian, S., *et al.* (2012b). Loss-of-function alleles of P2RX7 and TLR4 fail to affect the response to chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* *1*, 271-278.
- Vajdic, C. M., McDonald, S. P., McCredie, M. R., van Leeuwen, M. T., Stewart, J. H., Law, M., Chapman, J. R., Webster, A. C., Kaldor, J. M., and Grulich, A. E. (2006). Cancer incidence before and after kidney transplantation. *JAMA* *296*, 2823-2831.
- Valmori, D., Merlo, A., Souleimanian, N. E., Hesdorffer, C. S., and Ayyoub, M. (2005a). A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. *The Journal of clinical investigation* *115*, 1953-1962.
- Valmori, D., Raffin, C., Raimbaud, I., and Ayyoub, M. (2010). Human RORgammat+ TH17 cells preferentially differentiate from naive FOXP3+Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 19402-19407.
- Valmori, D., Souleimanian, N. E., Hesdorffer, C. S., Old, L. J., and Ayyoub, M. (2005b). Quantitative and qualitative assessment of circulating NY-ESO-1 specific CD4+ T cells in cancer-free individuals. *Clin Immunol* *117*, 161-167.
- Viaud, S., Flament, C., Zoubir, M., Pautier, P., LeCesne, A., Ribrag, V., Soria, J. C., Marty, V., Vielh, P., Robert, C., *et al.* (2011). Cyclophosphamide induces differentiation of Th17 cells in cancer patients. *Cancer research* *71*, 661-665.
- Vigneron, N., Stroobant, V., Van den Eynde, B. J., and van der Bruggen, P. (2013). Database of T cell-defined human tumor antigens: the 2013 update. *Cancer Immunol* *13*, 15.
- Vincent, J., Mignot, G., Chalmin, F., Ladoire, S., Bruchard, M., Chevriaux, A., Martin, F., Apetoh, L., Rebe, C., and Ghiringhelli, F. (2010). 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer research* *70*, 3052-3061.
- Volpe, E., Touzot, M., Servant, N., Marloie-Provost, M. A., Hupe, P., Barillot, E., and Soumelis, V. (2009). Multiparametric analysis of cytokine-driven human Th17 differentiation reveals a differential regulation of IL-17 and IL-22 production. *Blood* *114*, 3610-3614.

- Vukmanovic-Stejic, M., Zhang, Y., Cook, J. E., Fletcher, J. M., McQuaid, A., Masters, J. E., Rustin, M. H., Taams, L. S., Beverley, P. C., Macallan, D. C., and Akbar, A. N. (2006). Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *The Journal of clinical investigation* *116*, 2423-2433.
- Wang, C., Hillsamer, P., and Kim, C. H. (2011). Phenotype, effector function, and tissue localization of PD-1-expressing human follicular helper T cell subsets. *BMC Immunol* *12*, 53.
- Wang, J., Ioan-Facsinay, A., van der Voort, E. I., Huizinga, T. W., and Toes, R. E. (2007). Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *European journal of immunology* *37*, 129-138.
- Wang, J., Yoshida, T., Nakaki, F., Hiai, H., Okazaki, T., and Honjo, T. (2005). Establishment of NOD-Pdcd1<sup>-/-</sup> mice as an efficient animal model of type I diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 11823-11828.
- Wang, L., Yi, T., Kortylewski, M., Pardoll, D. M., Zeng, D., and Yu, H. (2009). IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *The Journal of experimental medicine* *206*, 1457-1464.
- Watanabe, Y., Katou, F., Ohtani, H., Nakayama, T., Yoshie, O., and Hashimoto, K. (2010). Tumor-infiltrating lymphocytes, particularly the balance between CD8(+) T cells and CCR4(+) regulatory T cells, affect the survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* *109*, 744-752.
- Wherry, E. J., Ha, S. J., Kaech, S. M., Haining, W. N., Sarkar, S., Kalia, V., Subramaniam, S., Blattman, J. N., Barber, D. L., and Ahmed, R. (2007). Molecular signature of CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* *27*, 670-684.
- Wilson, N. J., Boniface, K., Chan, J. R., McKenzie, B. S., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., *et al.* (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nature immunology* *8*, 950-957.
- Wu, D., Wu, P., Huang, Q., Liu, Y., Ye, J., and Huang, J. (2013). Interleukin-17: a promoter in colorectal cancer progression. *Clinical & developmental immunology* *2013*, 436307.
- Xie, Y., Akpınarli, A., Maris, C., Hipkiss, E. L., Lane, M., Kwon, E. K., Muranski, P., Restifo, N. P., and Antony, P. A. (2010). Naive tumor-specific CD4(+) T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma. *The Journal of experimental medicine* *207*, 651-667.
- Yamaguchi, R., Tanaka, M., Yano, A., Tse, G. M., Yamaguchi, M., Koura, K., Kanomata, N., Kawaguchi, A., Akiba, J., Naito, Y., *et al.* (2012). Tumor-infiltrating lymphocytes are important pathologic predictors for neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Hum Pathol* *43*, 1688-1694.
- Yang, S., and Haluska, F. G. (2004). Treatment of melanoma with 5-fluorouracil or dacarbazine in vitro sensitizes cells to antigen-specific CTL lysis through perforin/granzyme- and Fas-mediated pathways. *Journal of immunology* *172*, 4599-4608.

- Ye, J., Su, X., Hsueh, E. C., Zhang, Y., Koenig, J. M., Hoft, D. F., and Peng, G. (2011). Human tumor-infiltrating Th17 cells have the capacity to differentiate into IFN-gamma+ and FOXP3+ T cells with potent suppressive function. *European journal of immunology* *41*, 936-951.
- Ye, Z. J., Zhou, Q., Gu, Y. Y., Qin, S. M., Ma, W. L., Xin, J. B., Tao, X. N., and Shi, H. Z. (2010). Generation and differentiation of IL-17-producing CD4+ T cells in malignant pleural effusion. *Journal of immunology* *185*, 6348-6354.
- Yellin, M. J., Sippel, K., Inghirami, G., Covey, L. R., Lee, J. J., Sinning, J., Clark, E. A., Chess, L., and Lederman, S. (1994). CD40 molecules induce down-modulation and endocytosis of T cell surface T cell-B cell activating molecule/CD40-L. Potential role in regulating helper effector function. *Journal of immunology* *152*, 598-608.
- Yi, T., Li, X., Yao, S., Wang, L., Chen, Y., Zhao, D., Johnston, H. F., Young, J. S., Liu, H., Todorov, I., *et al.* (2011). Host APCs augment in vivo expansion of donor natural regulatory T cells via B7H1/B7.1 in allogeneic recipients. *Journal of immunology* *186*, 2739-2749.
- Yoon, N. K., Maresh, E. L., Shen, D., Elshimali, Y., Apple, S., Horvath, S., Mah, V., Bose, S., Chia, D., Chang, H. R., and Goodglick, L. (2010). Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer. *Hum Pathol* *41*, 1794-1801.
- Yu, D., Rao, S., Tsai, L. M., Lee, S. K., He, Y., Sutcliffe, E. L., Srivastava, M., Linterman, M., Zheng, L., Simpson, N., *et al.* (2009). The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* *31*, 457-468.
- Yusuf, I., Kageyama, R., Monticelli, L., Johnston, R. J., Ditoro, D., Hansen, K., Barnett, B., and Crotty, S. (2010). Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). *Journal of immunology* *185*, 190-202.
- Zajac, A. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D. J., Suresh, M., Altman, J. D., and Ahmed, R. (1998). Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *The Journal of experimental medicine* *188*, 2205-2213.
- Zhang, J. P., Yan, J., Xu, J., Pang, X. H., Chen, M. S., Li, L., Wu, C., Li, S. P., and Zheng, L. (2009). Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol* *50*, 980-989.
- Zhang, L., Dermawan, K., Jin, M., Liu, R., Zheng, H., Xu, L., Zhang, Y., Cai, Y., Chu, Y., and Xiong, S. (2008). Differential impairment of regulatory T cells rather than effector T cells by paclitaxel-based chemotherapy. *Clin Immunol* *129*, 219-229.
- Zhang, R., Huynh, A., Witcher, G., Chang, J., Maltzman, J. S., and Turka, L. A. (2013). An obligate cell-intrinsic function for CD28 in Tregs. *The Journal of clinical investigation* *123*, 580-593.
- Zhang, X., Li, L., Choe, J., Krajewski, S., Reed, J. C., Thompson, C., and Choi, Y. S. (1996). Up-regulation of Bcl-xL expression protects CD40-activated human B cells from Fas-mediated apoptosis. *Cellular immunology* *173*, 149-154.

Zielinski, C. C., Stuller, I., Dorner, F., Potzi, P., Muller, C., and Eibl, M. M. (1986). Impaired primary, but not secondary, immune response in breast cancer patients under adjuvant chemotherapy. *Cancer* 58, 1648-1652.

Zorn, E., and Hercend, T. (1999). A natural cytotoxic T cell response in a spontaneously regressing human melanoma targets a neoantigen resulting from a somatic point mutation. *European journal of immunology* 29, 592-601.

Zou, W., and Chen, L. (2008). Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nature reviews Immunology* 8, 467-477.

Zou, W., and Restifo, N. P. (2010). T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nature reviews Immunology* 10, 248-256.