



HAL
open science

Optimisation d'un vaccin thérapeutique dans les tumeurs des voies aérodigestives supérieures associées aux papillomavirus : rôle de l'induction d'une immunité muqueuse et de la combinaison à la radiothérapie

Mevyn Nizard

► **To cite this version:**

Mevyn Nizard. Optimisation d'un vaccin thérapeutique dans les tumeurs des voies aérodigestives supérieures associées aux papillomavirus : rôle de l'induction d'une immunité muqueuse et de la combinaison à la radiothérapie. Immunologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCB050 . tel-01424202

HAL Id: tel-01424202

<https://theses.hal.science/tel-01424202>

Submitted on 2 Jan 2017

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.

THÈSE

**En vue de l'obtention du grade de
Docteur en Immunologie**

**INSERM U970, équipe « Immunothérapie et traitement anti-angiogéniques en
cancérologie »**

Ecole doctorale : Bio Sorbonne Paris Cité

Présentée et soutenue publiquement par Monsieur **Mevyn Nizard**

Le 2 Juillet 2015

Optimisation d'un vaccin thérapeutique dans les tumeurs des voies
aérodigestives supérieures associées aux papillomavirus : rôle de l'induction
d'une immunité muqueuse et de la combinaison à la radiothérapie.

Sous la direction de Monsieur le Professeur **Eric Tartour**

Membres du jury

Pr Odile Launay	Président du Jury	Université Paris V
Pr Pascale Jeannin	Rapporteur	Université Angers
Dr Fathia Mami-Chouaib	Rapporteur	Université Paris XI
Pr François Ghiringhelli	Examineur	Université de Dijon
Dr Rachel Golub	Examineur	Université Paris VII

À mon grand-père

Résumé

Le cancer est la seconde cause de mortalité dans le monde et les cancers de localisation muqueuse (poumon, estomac, colorectal, du col de l'utérus, ...) représentent la première cause de mortalité due au cancer dans le monde. La majorité des vaccins contre les cancers muqueux n'ont à ce jour, pas montré de résultats cliniques significatifs. Au cours de ce travail, nous avons développé une immunothérapie efficace basée sur la sous-unité B non toxique de la toxine de Shiga et montré pour la première fois dans le domaine de la cancérologie que la localisation de l'immunisation était cruciale pour induire des réponses immunitaires anti-tumorales. En effet, dans un modèle préclinique, une immunisation systémique intramusculaire n'a pas permis d'induire de protection thérapeutique efficace contre le développement de tumeurs muqueuses de la langue, alors que la voie d'immunisation intranasale a induit une réponse clinique complète. Nous avons identifié les lymphocytes T CD8⁺ comme les cellules nécessaires à cette protection et plus précisément la population de lymphocytes T résidents mémoires (Trm). Ces Trm présentent le phénotype classique CD103⁺ mais expriment également l'intégrine CD49a qui joue un rôle dans la migration/rétention au sein des tumeurs mais également dans la survie à long terme des Trm. Par ailleurs nous avons montré que les cellules dendritiques muqueuses pulmonaires permettaient d'induire ce phénotype CD49a sur les lymphocytes T CD8⁺ alors que les cellules dendritiques de la rate non. Notre travail montre que l'aspect quantitatif de ces Trm joue un rôle dans la protection anti-tumorale, en effet nous avons pu pour la première fois moduler *in vivo* le nombre de Trm en traitant les souris par un anticorps anti-TGF- β . La diminution du nombre des Trm est corrélée à la diminution de la protection anti-tumorale. Les patients atteints de cancers des voies aérodigestives supérieures sont majoritairement traités par radiothérapie. Dans l'optique d'essais cliniques à court terme, nous avons montré que la radiothérapie localisée associée à notre immunothérapie permet une protection plus efficace que le traitement seul de l'un ou de l'autre notamment en provoquant un remodelage du microenvironnement tumoral associé à une normalisation vasculaire. Nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans le développement d'immunothérapies thérapeutiques efficaces contre les cancers muqueux et pourront mener rapidement à des essais cliniques.

Remerciements

Le doctorat est une aventure. Je la vois comme un sport d'équipe tout comme un sport individuel. C'est un sport individuel parce que ce parcours m'a fait évoluer et grandir, j'ai appris énormément sur le plan scientifique et technique, sur moi, j'ai développé ma créativité, pris des risques et appris la patience parmi bien d'autres choses. C'est un sport d'équipe parce ces aboutissements individuels n'auraient jamais pu être sans le soutien de nombreuses personnes ; je n'aurais jamais pu devenir qui je suis sans vous. C'est grâce à vous tous que je peux dire merci aujourd'hui.

En premier lieu, je tiens à remercier le Professeur **Eric Tartour**. Merci d'avoir cru en moi, merci de m'avoir soutenu à chacune des étapes que nous avons passées, merci pour vos innombrables conseils, pour votre bienveillance, pour votre temps, votre efficacité et votre recul. J'ai énormément appris grâce à vous et je tiens à vous dire à quel point j'ai apprécié votre disponibilité malgré vos nombreuses charges, votre respect, votre écoute et votre compréhension durant ces 4 dernières années, pour la thèse et en dehors. Je vous suis éternellement reconnaissant de m'avoir porté jusqu'à ce jour. J'espère et je souhaite de toutes mes forces que nous continuions à travailler ensemble et que nos contacts perdurent.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres de mon jury, Le Professeur **Odile Launay** pour avoir accepté d'être la présidente de mon jury de thèse ; le Professeur **Pascale Jeannin** pour avoir accepté de relire et d'évaluer ce travail ; le Dr **Fathia Mami-Chouaib** pour ses suggestions et pour avoir accepté d'être rapporteur de ce manuscrit ; le Professeur **François Ghiringhelli** pour avoir accepté d'examiner ce travail ; le Dr **Rachel Golub** pour avoir accepté d'examiner ce travail mais également en souvenir des travaux pratiques de master 1 qui nous font remonter à mes débuts dans le domaine de l'immunologie.

« L'imagination est plus importante que la connaissance, car la connaissance est limitée, tandis que l'imagination englobe le monde entier » Albert Einstein.

À tous les membres actuels et précédents de l'équipe 10. Merci pour votre patience, votre aide dans l'accomplissement de ce travail, votre temps et votre écoute ! Un grand merci à toi **Magali**. pour ton soutien, ta bonne humeur, tes conseils, ton expertise et ton amitié, merci d'avoir relu ce manuscrit et merci pour toutes les discussions qu'on a pu avoir. **Federico**, tu m'as formé, on s'est engueulé, on a passé des moments géniaux, on a appris l'un de l'autre, on a fait un super travail ensemble, je n'oublierai jamais. **Mariana**, je n'aurais jamais imaginé quand tu es arrivé à quel point tu m'apporterais, à quel point ce serait difficile de te voir partir après seulement un an, j'étais prêt à signer pour les 50 prochaines années tellement travailler à tes côtés fut un plaisir. **Hélène**, merci pour toutes les discussions qu'on a eu, autour de ce travail et en dehors, pour ta bonne humeur, ton flot de parole infatigable et pour ton discernement sur tous les sujets. **Thi**, merci d'avoir participé à ce travail et d'y participer encore ! Je n'oublierai pas que malgré ta silhouette sportive et fine tu es capable d'ingurgiter l'équivalent de 4 repas par repas ! **Nadine**, merci d'avoir été présente tous les jours, dans les moments les meilleurs et les moins bons. Tu as été notre horloge prandiale toutes ces années ! Vous vous êtes bien trouvé Thi et toi ! Ça me manquera. **Thibault** et **Simon**, merci pour votre bonne humeur, pour les pauses vidéo (parce qu'en vrai, c'est toi qui les as instaurées Thibault !), les discussions et les tests d'expériences (on ne parlera jamais de la centrifugation du café sucré pour récupérer le sucre), merci de m'avoir fait entrevoir la médecine tout comme **Orianne**. **Soumaya**, merci pour ta participation aux expériences qui m'a permis de rédiger ce travail et pour ta motivation. **Cécile**, merci pour les discussions, les conseils, et le travail que nous avons réalisé ensemble et que nous continuerons à réaliser. **Marion**, Merci d'avoir participé à ce travail et pour ta bonne humeur, je n'aurais jamais pu aller aussi vite sans toi. **Charlotte**, je n'aurais qu'un seul mot à te dire mais il veut tout dire, il commence par un B. **Jacques**, c'est grâce à vous que j'ai connu cette équipe. **Cécilia**, **Nathalie**, **Clémence**, **Hélène R.**, **Charlotte B.**, **Corinne**, **Julien**, **Anne-Laure**, **Laëtitia**, **Isabelle**, **Dominique**, **Sylvie**, et tous ceux que ma mémoire faillible oublie, un grand merci à vous.

« Les autres sont, au fond, ce qu'il y a de plus important en nous-même »

Jean-Paul Sartre.

À mes **grands-parents** qui nous ont quittés bien trop tôt.

À ma **grand-mère** toujours présente pour moi, ton sourire merveilleux est gravé dans ma mémoire.

À ma **mère** et mon **père**, sans vous je ne rédigerais pas ces mots aujourd'hui. Merci de m'avoir toujours soutenu et de me soutenir encore et encore quel que soit l'étape et le moment ; merci pour votre présence au quotidien, à minuit ou à midi, d'être toujours là. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis, pour votre tolérance, pour les valeurs que vous m'avez si bien inculquées. Je suis fier d'être votre fils.

Mandy, 28 ans plus tard, qu'est-ce qu'on a à se dire ? J'ai envie d'écrire qu'il n'y a rien à écrire parce que tu sais déjà tout, je ne crois pas qu'il y ait besoin de mots pour que tu saches. Tu es une sœur exceptionnelle (calme-toi quand même).

Adrien, que ferait-on sans toi ? Tous ces moments de tendresses et de phrases improbables mais tellement sincères ... Merci pour tous ces instants de bonheur à tes côtés !

Litzie, ma tante adorée, si, si, même si je ne le dis pas souvent. Ce qui compte au fond c'est que tu saches que je le pense et combien tu m'apportes.

*« On apprend lorsqu'on est jeune, et
on comprend avec l'âge. »*

Marie Von Evner-Eschenbach.

À tous les membres de ma famille que je ne peux citer mais auxquels je pense très fort ! **Janou, Alexis, Jennifer, Jessica, Niels, David, Patricia, Jean, Fanny, Sarah, Elioth,**

*« D'autres choses peuvent nous changer, mais nous
commençons et finissons avec la famille »*

Anthony Bront.

Amandine, dans notre monde qui va si vite, ou tout change, une chose reste certaine, tu resteras toujours mon amie, celle en qui j'ai une confiance aveugle, celle à qui je peux tout confier, tout dire, au-delà des mots, au-delà du temps et au-delà de la distance.

« L'amitié est la similitude des âmes »

Alcuin.

Elie, tu es l'une des plus belle rencontre que j'ai pu faire ces 5 dernières années, merci pour ton amitié. **Sarah**, prend bien soin de lui et de vous, je te fais confiance !

Alix, que de souvenirs tous les deux ! Licence, Erasmus, Master, sans parler de nos discussions, on s'appelle à 18h ? Merci d'avoir toujours été là pour moi, merci pour ton amitié !

Yoann, 29 ans plus tard, toujours amis, je te propose un petit « lethal weapon 4 » un de ces quatre, rien de mieux pour se remémorer ce pourquoi on a toujours et on sera toujours amis !

*« L'amitié est une douce responsabilité,
jamais une opportunité. »*

Khalil Gibran

À tous mes amis, **Jean-Seb** pour qui tu es, **Katharina** pour tous nos moments, **Rojo** pour mes débuts, **Laurent**, **Sabrina**, **Marie-Eleonore**, **Chloé**, **Mélo die**, **Alex**, **Lili**, **Sasha**, **Alexandra**, **Brig**, **Ysa**, **Krystel**, **Anne-So**, et tous ceux que je ne cite pas mais auxquels je pense très fort, j'aimerais pouvoir vous écrire à tous mais j'aime à croire que vous savez l'importance que vous avez dans ma vie. À **Maëva**, parce que le futur est prémédité..

*« Une photographie est un secret sur un secret. Plus
elle vous en dit, moins vous en savez. »*

Diane Arbus.

Louise, un petit mot pour te remercier, te remercier d'être passée dans ma vie, grâce à toi, je n'aurai pas de regrets.

« Plus loin on regarde vers le passé, plus loin on voit vers l'avenir. »

Winston Churchill.

Un mot spécial pour toutes les personnes que j'ai rencontré grâce à la **Croix-Rouge**, c'est une expérience hors du commun, une expérience unique et c'est grâce aux personnes qu'on y rencontre, aux amis qu'on s'y fait ...

Merci à **Raphaëlle** de m'avoir tant apporté, et je sais que tu as encore énormément à m'apprendre, j'ai hâte et j'espère pouvoir t'apporter autant un jour, merci pour ta confiance, merci pour nos milliers de mails et merci pour les mille prochains.

Isa, Oriane, vous êtes les meilleures ! J'espère que nous ne sommes qu'à nos débuts dans la complicité. Merci pour votre soutien quotidien ☺.

À **Clara, Sandrine, Sybille, Jo, Aymeric, Hadrien, Océane, Victor, Fabio Alex, Thomas, Lonni, Karim, Morgane, FX, Adel, Kinou, Xav**, et à tous ceux que je ne peux pas citer ici, merci pour tout, ce n'est que le début d'une très belle histoire.

« Seuls ceux qui sont assez fous pour penser qu'ils peuvent changer le monde y parviennent. »

Henri Dunant.

À toutes les personnes que je ne peux citer ici, je m'en excuse mais je n'oublierai pas de vous remercier de vive voix.

Egalement un grand merci à la Fondation ARC, à la Ligue contre le cancer, à l'INSERM et à l'Université Paris Descartes qui ont soutenues ce projet.

Table des matières

Liste des abréviations	12
Introduction	14
1. Immunosurveillance et cancer	15
1.1. Système immunitaire et effecteurs de la réponse anti-tumorale	16
1.1.1. Rôle des Lymphocytes T CD8 ⁺	17
1.1.2. Rôle des Lymphocytes T CD4 ⁺	21
1.1.3. Rôle des Natural Killer	23
1.2. Détournement du système immunitaire par les cellules tumorales.....	24
1.2.1. Rôle des lymphocytes T régulateurs.....	24
1.2.2. Rôle des cellules myéloïdes suppressives	24
1.2.3. Rôle des macrophages.....	25
1.2.4. Rôle des cytokines et autres facteurs solubles	26
1.3. Autres mécanismes d'échappement de la cellule tumorale au système immunitaire	27
1.4. Rôle pronostique des cellules immunitaires du microenvironnement tumoral	27
1.5. Autres éléments du microenvironnement tumoral	28
1.6. Approches d'immunothérapies actuelles documentant le concept d'immunosurveillance	29
2. Structure et composition du système immunitaire muqueux.....	31
2.1. Organisation du système immunitaire muqueux.....	31
2.2. Effecteurs et populations de cellules immunitaires muqueuses	34
2.2.1. Les IgA.....	34
2.2.2. Cellules dendritiques	35
2.2.3.1. Origine des Trm	37
2.2.3.2. Localisation des Trm	38
2.2.3.3. Phénotype des Trm	39
2.2.3.4. Rôle des Trm.....	40
3. Migration des LT	41
3.1. Mécanismes.....	41
3.1.1. Rôle de la cellule endothéliale	41

3.1.2.	Chimiokines	42
3.1.3.	Notions d'imprinting (empreinte)	43
3.2.	Migration intratumorale.....	44
3.2.1.	Migration des cellules effectrices.....	44
3.2.2.	Rétention des lymphocytes T	47
3.2.3.	Migration des cellules suppressives	47
4.	La radiothérapie préclinique et l'immunité	48
4.1.	La radiothérapie	48
4.2.	Effet immunologique des radiations ionisantes.....	49
4.3.	Combinaison avec l'immunothérapie	49
5.	Les cancers des voies aérodigestives supérieures	50
5.1.	Etiopathogénie et incidence.....	50
5.2.	Le Papilloma Virus Humain.....	52
5.3.	Modèles et travaux précliniques	53
5.3.1.	Les modèles murins.....	53
5.4.	Le traitement des patients	54
5.4.1.	Les vaccins prophylactiques	54
5.4.2.	La radiothérapie, la chimiothérapie, la chirurgie	55
5.5.	Les essais cliniques de vaccination thérapeutique contre HPV	56
	Objectifs	58
	Résultats.....	59
	Premier travail : Synergie entre radiothérapie et vaccin dans le traitement des cancers de la sphère ORL associés à l'HPV.....	61
	Troisième travail : Les lymphocytes T CD8⁺ résidents mémoires jouent un rôle majeur dans la protection anti-tumorale	106
	Matériels et Méthodes	108
1.	Les LT-CD8 ⁺ tet ⁺ des LBA ont un phénotype de LT résidents mémoires.....	110
2.	Fonctionnalité des LT résidents mémoires et rôle dans la protection anti-tumorale	115
3.	Les LT-CD8 ⁺ spécifiques circulantes seules ne protègent pas contre une greffe tumorale	118
4.	La modulation de l'apparition des Trm par l'anti-TGF-β diminue la protection anti-tumorale	
	121	

Discussion	125
1. La vaccination par STxB-E7	126
1.1. Induction d'une réponse LT-CD8 ⁺ spécifique d'un antigène	126
1.2. Rôle de l'immunité locale dans la protection anti-tumorale	126
2. Caractéristiques des LT-CD8⁺ localement induits	128
2.1. Phénotype Trm	128
2.1.1. Phénotype	128
2.1.2. Rôle du CD49a	128
2.1.3. Rôle du CD103	129
2.2. Rôle des Trm dans la protection anti-tumorale	131
2.2.1. Rôle direct des Trm et cinétique de la protection anti-tumorale	131
2.2.2. Rôle indirect des Trm dans la protection tumorale.....	132
3. Limites de l'étude des Trm	133
4. Mécanismes de la synergie radiothérapie-vaccin	133
5. Extension des résultats.....	134
5.1. Autres tumeurs muqueuses	134
5.2. Echecs des thérapies chez l'Homme	135
5.3. Rôle pronostique des Trm chez l'Homme	136
5.4. Traitement des patients	136
6. Synthèse des travaux	138
Références bibliographiques.....	139
Annexes	173
Revue 1.	174
Revue 2.	188

Liste des abréviations

- α -GalCer	:	α -Galactosylcéramide
- BALT	:	Tissu Lymphoïde Associé aux Bronches
- CAF	:	Cancer-Associated Fibroblasts
- CCL	:	Chimiokine (motif Cystéine-Cystéine) Ligand
- CCR	:	Récepteur aux chimiokines
- CD	:	Cluster de Différenciation
- cDC	:	Cellule Dendritique conventionnelle
- DC	:	Cellule Dendritique
- CALT	:	Tissu Lymphoïde Associé aux tissus Conjonctifs
- CEVADS	:	Carcinomes Epidermoïdes des Voies AéroDigestives Supérieures
- CMH	:	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- CMV	:	CytoMégaloVirus
- CPA	:	Cellule Présentatrice d'Antigène
- CpG	:	Cytosine-phosphate-Guanine
- CTL	:	Lymphocyte T Cytotoxique
- CXCL	:	Chimiokine Cystéine-X-Cystéine Ligand
- CXCR	:	Récepteur aux Chimiokines Cystéine-X-Cystéine
- E6	:	Early Protein 6
- E7	:	Early Protein 7
- ELISA	:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
- ELISpot	:	Enzyme Linked Immunosorbent Spot
- Foxp3	:	Forkhead box P3
- GALT	:	Tissu Lymphoïde Associé aux intestins
- Gb3	:	Globotriaosylcéramide
- GM-CSF	:	Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor
- HEV	:	High Endothelial Venule
- HIF1a	:	Hypoxia-Inducible Factor 1a
- HIV	:	Human Immunodeficiency Virus
- HLA	:	Human Leucocyte Antigen
- HPV	:	Human Papilloma Virus (+ serotype)
- Hsp	:	Heat shock proteins
- IEL	:	Lymphocyte Intra-Epithélial
- IFN- γ	:	Interferon γ
- IgA	:	Immunoglobuline A
- IL	:	Interleukine
- IM	:	Intra Musculaire
- IN	:	Intra Nasale
- IRM	:	Imagerie par Raisonance Magnétique
- ITG	:	Intégrine (+ le type)
- J	:	Jour
- KLRG	:	Killer cell Lectin-like Receptor G 1

- LB	:	Lymphocyte B
- LBA	:	Lavage Broncho-Alvéolaire
- LT	:	Lymphocyte T
- M1	:	Macrophage de type 1
- M2	:	Macrophage de type 2 (+ sous-type)
- MALT	:	Tissu Lymphoïde Associé aux muqueuses
- M-CSF	:	Macrophage-Colony Stimulating Factor
- MCL1	:	Myeloid Leukemia Cell differentiation protein 1
- MDSC	:	Cellules Myéloïdes Suppressives
- MPEC	:	Memory Precursor Effector Cells
- NALT	:	Tissu Lymphoïde Associé aux Nasopharynx
- NK	:	Natural Killer
- NKT	:	Natural Killer T
- ORL	:	Oto-Rhino-Laryngologique
- pDC	:	Cellule Dendritique plasmacytoïde
- PMA	:	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate
- pRb	:	Protéine du Rétinoblastome
- ROS	:	dérivés Réactifs de l'Oxygène
- SLEC	:	Short Lived Effector Cells
- STxB	:	Sous-unité B de la Toxine de Shiga
- TAM	:	Tumor Associated Macrophage
- Tcm	:	Lymphocyte T central mémoire
- TCR	:	T Cell Receptor
- Teff	:	Lymphocyte T effecteur
- Tem	:	Lymphocyte T effecteur mémoire
- TemRA	:	Lymphocyte T mémoires effecteurs de différenciation terminale
- TGF- β	:	Transforming Growth Factor Beta
- Th	:	T helper
- TIL	:	Tumor Infiltrating Lymphocyte
- TLR	:	Toll Like Receptor
- TNF- α	:	Tumor Necrosis Factor- α
- Tscm	:	Lymphocyte T stem cell memory
- Treg	:	Lymphocyte T régulateur
- Trm	:	Lymphocyte T résident mémoire
- VADS	:	Voies AéroDigestives Supérieures
- VALT	:	Tissu Lymphoïde Associé aux Vagin
- VEGF	:	Vascular Endothelial Growth Factor
- VLA1	:	Very Late Antigen 1

Introduction

1. Immunosurveillance et cancer

Le Larousse Médical définit le cancer comme une « maladie qui a pour mécanisme une prolifération cellulaire anarchique, incontrôlée et incessante. »¹. Cette prolifération cellulaire anarchique prend naissance à partir d'une cellule saine qui dégénère pour différentes raisons d'instabilités génomiques qui s'associe à un risque de malignité (cancer) et à une augmentation du volume tissulaire constituant ainsi le tissu tumoral. Cette néoformation de tissus corporels peut concerner tous les types de tissus. On distingue de façon générale les cancers « solides » (carcinomes, sarcomes) des cancers « liquides » (leucémies, lymphomes), mais également les cancers muqueux (pulmonaires, urogénitaux, gastro-intestinaux, de la sphère Oto-Rhino-Laryngologique (ORL), œsophagiens, ...) des cancers non muqueux (mélanomes, prostate, hématopoïétiques, cérébraux, ...). En 2012, l'Organisation Mondiale de la santé a estimé le nombre de décès dû au cancer dans le monde à 8,2 millions (soit près de 13% de la mortalité mondiale) dont 148 000 en France. Les projections montrent que la mortalité liée aux cancers va continuer à augmenter pour atteindre plus de 13 millions de décès dans le monde en 2030.

Cette définition du cancer axée exclusivement sur la cellule tumorale est aujourd'hui complétée par la notion de microenvironnement tumoral correspondant à un stroma environnant les cellules tumorales et composé de différents types cellulaires. Ce stroma inclut les cellules du système immunitaire, les néovaisseaux, le tissu de soutien (fibroblastes), ainsi que différentes molécules et fibres permettant une communication entre ces multiples cellules.

Dans ce contexte, il est maintenant clairement établi que le système immunitaire et les cellules tumorales interagissent de façon bidirectionnelle.

L'immunité est un système complexe que les travaux de recherche parviennent de mieux en mieux à comprendre et à moduler. Les cellules de l'immunité innée et adaptative jouent un rôle dans la protection anti-tumorale mais malgré la diversité des réponses immunitaires anti-tumorales possibles, les cellules malignes finissent éventuellement par échapper au contrôle de l'immunité.

Ainsi la capacité des cellules tumorales à échapper au système immunitaire constitue l'une des propriétés importantes permettant de définir un cancer (**Figure 1**).

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

Figure 1. Evolution de la compréhension des caractéristiques des tumeurs cancéreuses.
A. Caractérisation initiale des propriétés des tumeurs cancéreuses, adapté de Hanahan D. et al.² en 2000. La figure **B** représente les caractéristiques associées aux tumeurs cancéreuses 11 années plus tard représentatif de l'évolution des connaissances. Adapté de Hanahan D. et al.³

1.1. Système immunitaire et effecteurs de la réponse anti-tumorale

Les réponses immunitaires (innées et acquises) permettent une diversité de réponses contre les pathogènes et vis-à-vis de cellules tumorales.

L'immunosurveillance décrit le processus par lequel les cellules de l'immunité recherchent et repèrent les pathogènes étrangers ou les cellules cancéreuses. La théorie de

l'immunosurveillance reconnaît un rôle prépondérant au système immunitaire dans le contrôle de l'apparition et de la prolifération des cellules tumorales. Cette idée se précise grâce à la théorie des 3E élaborée par Robert Schreiber : élimination, équilibre, échappement. Ces phases correspondent à la capacité du système immunitaire à éradiquer les cellules tumorales (élimination), à contrôler la croissance des cellules tumorales sans parvenir à les éliminer (équilibre) puis à ne plus être capable de contrôler la croissance tumorale (échappement). Ce contrôle immunitaire repose sur plusieurs populations cellulaires.

1.1.1. Rôle des Lymphocytes T CD8⁺

On distingue classiquement les lymphocytes T CD8⁺ (LT-CD8⁺) naïfs n'ayant pas rencontré l'antigène, les LT-CD8⁺ effecteurs (Teff) induits quelques jours après la stimulation antigénique, les LT-CD8⁺ mémoires de type mémoire central (Tcm,) et les LT-CD8⁺ mémoires de type mémoire effecteur (Tem). Les LT-CD8⁺ sont capables de reconnaître, à la surface des cellules tumorales, des peptides dérivés d'antigènes tumoraux associés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilités de classe 1 (CMH I) et d'induire une réponse spécifique contre ces antigènes afin de provoquer la lyse de ces cellules entraînant ainsi une régression tumorale⁴.

1.1.1.1. Génération d'une réponse LT-CD8⁺ mémoire

Les LT-CD8⁺ naïfs expriment le récepteur de chimiokine CCR7 qui reconnaît les chimiokines CCL19 et CCL21 constitutivement exprimées par les ganglions lymphatiques ce qui permet leur recrutement. Lors d'une réponse primaire, les cellules dendritiques (DC) sensibilisées par un antigène migrent dans les ganglions drainants et activent les LT-CD8⁺ naïfs (CD45RA⁺CCR7⁺). Cette présentation antigénique associée aux signaux de costimulation déclenche l'activation des LT-CD8⁺ ainsi que leur différenciation spécifique qui comprend 3 phases : la phase d'expansion clonale, la phase de contraction des cellules effectrices puis l'établissement des cellules mémoires.

Lors de la phase de contraction plus de 90% des cellules T effectrices meurent par apoptose⁵ mais certaines se différencient en cellules T effectrices mémoires. On distingue généralement deux sous-populations de Teff ; les MPEC (Memory Precursor Effector Cells) KLRG-1^{int}IL-7R^{hi} (Killer cell Lectin-like Receptor G 1 ; Récepteur à l'interleukine 7) qui peuvent se différencier en cellules mémoires et les SLEC (Short-Lived Effector Cells) KLRG-1^{hi}IL-7R^{low} qui ne se différencient pas en cellules mémoires et qui meurent via l'apoptose.⁶⁻¹⁰ Ces deux populations n'ont pas la même capacité de différenciation mais présentent une capacité identique de dégranulation et de cytotoxicité *in vivo*, ainsi que la même capacité de sécrétion de cytokines¹¹. Ces données montrent que les MPEC ont comme les SLEC une forte fonction effectrice avant de se différencier en Tem.

On distingue deux types de lymphocytes T effecteurs mémoires :

1) les Tem CCR7⁻CD45RA⁻ présents dans la circulation sanguine et les tissus non lymphoïdes. Ils possèdent des granules cytotoxiques, peuvent proliférer et sécrètent rapidement des cytokines après une nouvelle rencontre avec l'antigène.

2) les LT mémoires effecteurs de différenciation terminale (TemRA) de phénotype CCR7⁻CD45RA⁺. Ces cellules ont une forte fonction effectrice immédiate mais une capacité proliférative limitée. Ces lymphocytes sont surtout présents au sein du compartiment LT-CD8⁺ et peu au sein des lymphocytes T CD4⁺ (LT-CD4⁺) et sont retrouvés surtout chez l'adulte et le sujet âgé. Une partie de leur répertoire est dirigée contre certains virus comme le Cytomégalovirus.

Les Tcm (CCR7⁺CD62L⁺CD45RA⁻) sont générés à partir des LT naïfs¹². Ils sont localisés dans les ganglions, sont amplifiés rapidement lors d'une nouvelle rencontre avec l'antigène et possèdent une forte capacité proliférative et sécrétrice d'interleukine 2 (IL-2) après activation par les DC dans les ganglions lymphatiques. Ces cellules constituent une réserve pour la génération rapide de nouvelles cellules T effectrices en cas de réexposition à l'antigène. L'expression de CCR7 et CD62L explique leur localisation dans les organes lymphoïdes secondaires en raison de l'expression constitutive de leurs ligands. Il a été montré *in vitro* chez l'Homme et dans des modèles de transfert adoptif qu'il est possible d'induire un phénotype Tcm à partir de Tem^{13,14}. Par contre, ces Tcm ont une faible capacité cytotoxique immédiate.

Une autre sous-population de LT a récemment été décrite et pourrait constituer un précurseur des LT mémoires : les Tscm (Stem Cell Memory) de phénotype CD45RA⁺CD95⁺IL-2Rβ¹⁵. Ces cellules possèdent des caractéristiques phénotypiques communes avec les LT naïfs (CD45RA⁺CD45RO⁻CCR7⁺CD27⁺)^{16,17} mais sont différentes de par l'expression de CD95 et de l'IL-2Rβ qui sont eux, exprimés par les cellules mémoires. Ces cellules ont été décrites chez l'Homme et la souris¹⁸, elles présentent un phénotype à mi-chemin entre les LT naïfs et les Tcm¹⁹. Gattinoni L. a montré qu'elles seraient les précurseurs des Tcm et des Tem en induisant *in vitro* à partir de T naïfs (via l'IL-7 et l'IL-15) des Tscm et à partir des Tscm, des Tem et des Tcm^{15,20}. Le phénotype et la localisation de ces différentes sous-populations sont résumés dans le **tableau 1**.

	Marqueurs	CD8 ⁺ Naïf	Tscm	MPEC	SLEC	Teff	Tcm	Tem
Marqueurs de différenciation	Granzyme B	-	-	-	+++	+++	-	+
	Eomes	-	+	+++	-	+	++	++
	Perforin	-	-	+	+++	+++	-	+++
	KLRG1	-	-	+	+++	+++	-	+++
	CD27	±	+	++	-	±	++	++
	CD28	++	+++	+++	+	-	+++	±
	CD62L	+++	+++	+++	±	-	+++	+
Récepteurs cytokiniques	Ly6C	±				++	++	++
	IL-15Rβ	++	+++	++	++	+	+++	++
	IL-7Rα	++	+	+++	±	-	+++	+
Localisation	Organes lymphoïdes secondaires, sang, lymphé	Sang	Rate, ganglions	Rate, ganglions	Organes lymphoïdes secondaires, sang, tissus non lymphoïdes	Organes lymphoïdes secondaires, sang, lymphé	Sang, rate, quelques tissus non lymphoïdes	

Tableau 1. Phénotypes et localisations des principales populations de lymphocytes T CD8⁺. * Varie selon les tissus. Le Ly6c est un marqueur de différenciation murin. **Fond rouge** = Non décrit

Les Tcm, les Tem, les TemRA sont des cellules qui participent à l'immunosurveillance mais ne sont pas les seuls LT-CD8⁺ capables d'assurer ce rôle. En effet, dans les tissus épithéliaux, des LT-CD8⁺ résidents mémoires (Trm) ainsi que des lymphocytes T intra-

épithéliaux ont été décrits ; ces cellules ne circulent pas et restent localisées dans les tissus. Ces populations seront détaillées dans le chapitre **2.2.3.**

1.1.1.2. Arguments en faveur d'un rôle anti-tumoral des LT-CD8⁺

L'élimination des tissus tumoraux sans détruire les tissus sains requiert les LT-CD8⁺ précédemment décrits ; ils peuvent être cytotoxiques vis-à-vis des cellules tumorales par différents mécanismes (perforine, granzyme, FasL, Interféron γ (IFN- γ), Tumor Necrosis Factor (TNF)) :

1) la perforine contenue dans les granules lytiques spécialisés se polymérise pour former des pores transmembranaires sur les cellules cibles induisant la mort cellulaire.^{21,22}

2) les granzymes sont des protéases qui ont un rôle dans l'induction de l'apoptose des cellules cibles. Il est décrit que les granzymes seules ne peuvent pas induire l'apoptose de cellules, elles se servent des pores créés par la perforine afin de pénétrer dans les cellules cibles. De plus, elles ne peuvent pas cliver directement l'ADN mais sont capables d'activer des enzymes et de déclencher une cascade enzymatique aboutissant à l'apoptose.

3) le FasL présent à la surface des LT cytotoxiques se lie au Fas présent sur les cellules cibles, cette interaction induit l'activation des caspases des cellules cibles conduisant à leur apoptose.

4) l'IFN- γ , en plus de ses propriétés antivirales, induit l'augmentation de l'expression des molécules du CMH I des cellules cibles augmentant ainsi significativement la possibilité des cellules cibles d'être reconnues par des effecteurs immunitaires ; l'IFN- γ permet également le recrutement et l'activation des macrophages.

5) la sécrétion de TNF- α ou de TNF- β peut également activer les macrophages en synergie avec l'IFN- γ ; ces cytokines peuvent induire la mort cellulaire à travers leur interaction avec leur récepteur TNFR-1.

Le rôle anti-tumoral des LT-CD8⁺ est étayé par de nombreuses études chez la souris et chez l'Homme. De plus, les LT-CD8⁺ sécrètent des cytokines et des chimiokines capables d'attirer et d'activer d'autres cellules effectrices comme les neutrophiles ou les macrophages²³. L'infiltration intratumorale en LT-CD8⁺ est généralement corrélée à une meilleure survie chez les patients atteints de cancers²⁴⁻²⁷, mais également dans des modèles murins chez lesquels la présence des LT-CD8⁺ intratumoraux préexistants permet la protection anti-tumorale²⁸. De nombreux protocoles d'immunothérapie adoptive chez l'Homme (activation et amplification *in vitro* de LT-CD8⁺ autologues pour réadministration) ont montré des réponses cliniques significatives chez des patients atteints de cancers²⁹⁻³¹. L'induction de LT-CD8⁺ anti-tumoraux est corrélée aussi bien chez l'Homme que chez la souris à une réponse clinique anti-tumorale^{32,33}.

Par ailleurs, lors de l'administration chez l'Homme d'anticorps bloquants la liaison PD-1/PD-L1, la levée de l'anergie des LT-CD8⁺ préexistants au sein des cancers entraîne des réponses cliniques tout à fait remarquables, renforçant ainsi le rôle potentiel de ces cellules dans l'immunité anti-tumorale³⁴. Des travaux récents ont décrit une prolifération de ces LT-CD8⁺ intratumoraux chez les patients répondant à ce type de traitement³⁵.

La littérature et la communauté scientifique s'accordent désormais sur le rôle crucial des LT-CD8⁺ dans la réponse anti-tumorale.

1.1.2. Rôle des Lymphocytes T CD4⁺

Les LT-CD4⁺ sont capables de se polariser de différentes façons :

- 1) les LT-CD4⁺ de type 1 (Th1) qui produisent de l'IFN- γ , du TNF- α et de l'IL-2. Ces cytokines permettent l'induction et la persistance des LT-CD8⁺ spécifiques anti-tumoraux³⁶⁻³⁸. La présence de Th1 est indispensable à la génération de LT-CD8⁺ mémoires fonctionnels. L'IL-2 joue un rôle majeur dans l'induction de la mémoire immunitaire LT-CD4⁺ et LT-CD8⁺³⁹, l'IFN- γ est important pour l'activation des macrophages et l'augmentation de leur activité antimicrobienne et le TNF- α joue un rôle dans l'inflammation. Ces cellules sont capables d'activer les macrophages, les LT-CD8⁺ cytotoxiques (CTL) et d'induire une réponse immunitaire adaptative.

2) les LT-CD4⁺ de type 2 (Th2) produisent de l'IL-4, 5, 6, 9, 10, 13 qui induisent une réponse humorale en favorisant la différenciation des lymphocytes B. Ces sécrétions cytokiniques stimulent également l'activation et la différenciation des cellules éosinophiles, mais inhibent certaines fonctions des cellules phagocytaires⁴⁰.

3) il existe également d'autres sous-populations de LT-CD4⁺ comme les Th0 qui sont plus hétérogènes que les populations Th1 et Th2 et sont considérées comme des précurseurs de ces dernières. Les LT-CD4⁺ qui produisent de grandes quantités de TGF- β (Transforming Growth Factor- β) sont appelés Th3 mais leurs différences fonctionnelles avec les lymphocytes T régulateurs Foxp3⁺ (Treg) ne sont pas encore claires, bien que leur profil d'induction ne soit pas dépendant des mêmes cytokines ; d'autre part ils auraient une responsabilité dans la balance Th1 et Th2⁴¹. Les LT-CD4⁺ qui produisent de l'IL-17, de l'IL-6, de l'IL-1 β et de l'IL-23 sont appelés Th17 et possèdent des propriétés pro-inflammatoires. ils sont impliqués dans des processus d'infections, d'auto-immunité et d'ostéolyse⁴². Il existe également des sous-populations de Th9 qui ont un rôle dans les allergies inflammatoires chroniques et qui sécrètent de hauts taux d'IL-9, d'IL-10, de CCL17 et CCL22 et auraient un rôle dans le contrôle de la croissance tumorale^{43,44}. Enfin la sous-population Th22 qui semble être spécifique de la peau (expression de CCR4 et CCR10) et seraient impliquées dans la réparation et le remodelage tissulaire^{45,46}.

De façon générale les Th1 et Th9 sont associés à un meilleur pronostic que les Th2, les Th3 et Th22⁴⁷⁻⁴⁹. Certaines cellules CD4⁺ comme les Th17 peuvent être associées à un pronostic différent selon les cancers mais leur rôle est encore très controversé⁴⁹⁻⁵² (**Figure 2**).

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

Figure 2. Activité pro ou anti-tumorale des différentes populations CD4. Tiré de la revue de Protti MP. et al.⁴⁹

1.1.3. Rôle des Natural Killer

Le rôle des cellules Natural Killer (NK) dans l'immunosurveillance est avéré vis-à-vis des cellules tumorales qui n'expriment plus les molécules du CMH I ; ces cellules tumorales CMH I négatives échappent aux LT-CD8⁺ cytotoxiques qui ne peuvent avoir une activité cytotoxique qu'après reconnaissance du CMH I. Les NK représentent une population de cellules lymphoïdes capable de lyser les cellules CMH I négatives. Comme les autres populations lymphoïdes, les NK sont des cellules tolérantes vis-à-vis des antigènes du soi⁵³. En plus de leur activité anti-tumorale, les NK sont également capables de sécréter de l'IFN- γ après priming par les DC⁵⁴.

1.2. Détournement du système immunitaire par les cellules tumorales

1.2.1. Rôle des lymphocytes T régulateurs

La population Treg est une population de LT-CD4⁺ exprimant le CD25 et le facteur de transcription Foxp3. Ils participent à l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale en inhibant par exemple la prolifération d'autres cellules de l'immunité comme les LT-CD4⁺ et les LT-CD8⁺ ⁵⁵⁻⁵⁷. Dans la majorité des cancers, les Treg infiltrants sont associés à un mauvais pronostic⁵⁸. Néanmoins, ces cellules pourraient aussi inhiber la réponse inflammatoire pro-tumorale expliquant parfois leur rôle bénéfique⁵⁹⁻⁶¹. Une étude *ex vivo* montre que les propriétés inflammatoires Th17 sont inhibées par un fort infiltrat en Treg ce qui pourrait être en lien avec le rôle pronostic corrélé à l'infiltrat en Treg⁶².

1.2.2. Rôle des cellules myéloïdes suppressives

Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) correspondent à une population hétérogène de cellules immatures qui peuvent se différencier en macrophages, en DC ou en granulocytes. Elles sont capables de réguler négativement les réponses lymphocytaires T et NK grâce à la sécrétion de TGF- β , d'IL-6, d'IL-10, l'expression d'arginase ou de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS)^{63,64}. Dans les tissus sains, les MDSC se différencient après avoir migré mais dans le contexte tumoral le microenvironnement empêche cette différenciation tout en augmentant leur prolifération et leur activation via la sécrétion de facteurs solubles tels que le GM-CSF (pour Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor)⁶⁵, le G-CSF⁶⁶ et le VEGF⁶⁷ (Vascular Endothelial Growth Factor). Différents facteurs (Hsp72, hypoxie) sont capables de réguler les fonctions suppressives des MDSC^{68,69}. Ces derniers peuvent également, dans ce contexte tumoral, se différencier en macrophages M2 (voir chapitre suivant). De plus, lors de traitements par chimiothérapie, ils participent à la polarisation de la réponse immunitaire. Ainsi, l'activation de l'inflammasome par les MDSC induit la production d'IL-1 β qui favorise la production d'IL-17 par les LT-CD4⁺ ⁷⁰.

1.2.3. Rôle des macrophages

Les macrophages dans le contexte tumoral sont dénommés TAM pour Tumor-Associated Macrophages. Les TAM représentent une population hétérogène qui diffère en fonction de l'environnement tumoral dans lequel elle se trouve et qui présente deux polarisations majeures :

1) dans un environnement normoxique, les macrophages sont classiquement activés et sont appelés macrophages M1 ; ils expriment fortement des molécules du CMH II et expriment les marqueurs CD62L⁺, CCR2^{hi} et CX3CR1^{low} chez la souris et chez l'Homme. Ils possèdent des clusters de différenciation spécifiques chez l'Homme (CD14^{hi}, CD16⁻, CD64⁺) et chez la souris (Ly6C^{hi}, CD43^{low}, CD11b⁺, CD115⁺, CD11c⁻). Ils ont des capacités effectrices anti-tumorales et sont pro-inflammatoires via la production de TNF- α et de chimiokines CXCL9 et CXCL10 capables d'attirer les cellules associées aux réponses Th1.

2) dans un environnement hypoxique, les macrophages se différencient en macrophages M2. Ils dérivent de monocytes et peuvent être générés par l'IL-4, l'IL-13⁷¹, l'IL-34⁷² ou le M-CSF⁷³ ; ils expriment faiblement les molécules du CMH II et ont un phénotype CCR2^{low} et CX3CR1^{hi} chez la souris et chez l'Homme. Ils possèdent des clusters de différenciation spécifiques chez l'Homme (CD14^{low}, CD16^{hi}, CD64⁻) et chez la souris (Ly6C^{low}, CD43^{hi}, CD11b⁺, CD115⁺, CD62L⁻, CD11c⁺). Ils ont des propriétés pro-angiogéniques, sont anti-inflammatoires et sont impliqués dans la réparation tissulaire et l'immunosuppression en sécrétant de l'IL-10, l'IL-1RA ainsi que des chimiokines CCL17, CCL22 et CCL24 associées au recrutement de Treg^{74,75}. D'autre part cette population de macrophage peut encore être subdivisée en plusieurs sous-populations M2a, M2b, M2c et M2d en fonction de leurs profils d'expression génétique et de leurs caractéristiques plus spécifiques^{76,77}.

1.2.4. Rôle des cytokines et autres facteurs solubles

Parmi les molécules immunosuppressives, on retrouve certaines cytokines comme l'IL-10, le TGF- β ou encore le VEGF qui peuvent être directement sécrétées par le microenvironnement tumoral⁷⁸.

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire majoritairement produite par les Treg et les macrophages, capable d'induire une inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-18, TNF- α) par les DC, les macrophages et les LT, ainsi qu'une diminution de la présentation antigénique par les DC et une diminution de la prolifération des LT. L'effet de la diminution de la présentation antigénique par les DC provoque indirectement une baisse des réponses Th1, Th2 et Th17. La diminution de sécrétion d'IL-12 et d'IL-18 provoque quant à elle une diminution de la réponse Th1 et de la production d'IFN- γ par les cellules T et par les cellules NK^{79,80}.

Le VEGF est un médiateur crucial du développement tumoral par son effet pro-angiogénique et sa capacité immunosuppressive. En effet, il est capable d'inhiber complètement la capacité des DC à activer les LT en se liant au VEGFR-1⁸¹ et de diminuer la sécrétion d'IL-2 par les cellules T indirectement via l'activation du VEGFR-1 sur les DC⁸². Par ailleurs, l'inhibition du VEGF fait l'objet de nombreuses recherches et d'essais cliniques en raison de la capacité de cette molécule à favoriser l'angiogenèse et à induire différents mécanismes d'immunosuppression. Différentes équipes et notre groupe avons montré que le VEGF-A est pro-angiogénique, inhibe la maturation des DC, provoque l'accumulation de MDSC et induit des Treg⁸³⁻⁸⁵. Différents travaux ont observé que des traitements anti-angiogéniques diminuaient les concentrations de Treg et de MDSC dans le sang de patients atteints de cancers⁸⁶⁻⁹⁰. D'autre part, le VEGF est capable de provoquer l'induction de l'expression de molécules d'épuisement sur les LT-CD8⁺ intratumoraux comme PD-1, Tim-3, CTLA-4 et Lag-3, qui constituent un mécanisme majeur d'échappement tumoral⁹¹.

Le TGF- β , également produit par les Treg, possède un rôle plus controversé qui semble dépendre des cytokines du milieu dans lequel il se trouve ; en effet le TGF- β avec l'IL-6 induit une réponse inflammatoire et peut déclencher une polarisation Th17, à l'opposé le TGF- β avec de l'IL-10 active les Treg et stimule l'immunosuppression⁹². Il semblerait que le TGF- β

contribue à l'immunité anti-tumorale à un stade précoce et à l'immunosuppression dès lors que les cellules échappent au contrôle de l'immunité^{93,94}.

1.3. Autres mécanismes d'échappement de la cellule tumorale au système immunitaire

L'échappement tumoral à cette immunosurveillance peut être expliqué par de nombreux mécanismes comme :

- 1) la modulation de la cible antigénique : perte partielle ou complète des molécules du CMH ou baisse d'expression des antigènes reconnus par le système immunitaire (immunosélection).
- 2) le développement de mécanismes d'inhibition des lymphocytes cytotoxiques via l'expression du ligand FasL par les cellules tumorales, qui déclenche en se liant au récepteur de mort Fas présent sur les CTL, l'apoptose des CTL⁹⁵.
- 3) l'échappement à l'apoptose, qui est l'une des caractéristiques majeures des cellules tumorales, via l'augmentation d'expression des molécules anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-X ou MCL-1⁹⁶.

1.4. Rôle pronostique des cellules immunitaires du microenvironnement tumoral

De nombreuses cellules immunitaires sont retrouvées au sein des tumeurs dont majoritairement les LT-CD8⁺, les LT-CD4⁺, les NK, les macrophages et les DC. Le travail de Galon J. et ses collègues ont montré l'importance de prendre en compte les données immunologiques telles que le type, la densité et la localisation des cellules immunitaires pour prédire la réponse clinique chez des patients atteints de cancers colorectaux⁹⁷. Le groupe de Lacopetta lui, a montré que les cellules Treg infiltrant les cancers colorectaux, contrairement à d'autres types de cancers, étaient de bon pronostic à un stade précoce⁹⁸. Notre groupe, via le travail de Cécile Badoual, a également montré dans les cancers de la sphère ORL une association entre l'infiltration par les Treg CD4⁺Foxp3⁺ et un meilleur contrôle locorégional de

la croissance tumorale ainsi qu'une meilleure survie des patients par rapport aux tumeurs non infiltrées⁹⁹. La localisation de ces cellules au sein des tissus tumoraux semble être un facteur pronostique chez l'Homme même si très peu de groupes ont étudié le rôle de la localisation de l'infiltrat immunitaire et son impact sur le pronostic clinique¹⁰⁰. Une méta-analyse montre que dans 30% des études les Treg étaient associés à un bon pronostic clinique¹⁰¹. De très récentes études démontrent que lorsque le ratio Treg/LT-CD8⁺ augmente en périphérie de tumeurs du sein, la survie sans récurrence à 5 ans de ces patients diminue ; cette infiltration était également corrélée à des paramètres clinicopathologiques défavorables¹⁰².

Par ailleurs, l'infiltration tumorale par les cellules NK a été associée à un bon pronostic dans les cancers du poumon, les cancers de l'estomac et du colon¹⁰³⁻¹⁰⁵, même quand cette infiltration est retrouvée en périphérie des tumeurs¹⁰⁶.

1.5. Autres éléments du microenvironnement tumoral

Les tissus tumoraux correspondent à un ensemble de cellules qui prolifèrent de façon anormale dans un tissu sain jusqu'à former une masse appelée tumeur. Cette masse possède son propre microenvironnement appelé stroma tumoral. Il est désormais clairement établi que les cellules immunitaires, les cellules tumorales et les cellules du stroma communiquent entre elles, de façon directe (récepteur/ligands) ou de façon indirecte (molécules sécrétées dans le milieu extracellulaire). Les cellules tumorales contrôlent ainsi potentiellement les cellules adjacentes les obligeant à répondre à leurs besoins nutritifs et à favoriser leur prolifération. Parmi ces cellules, les fibroblastes associés aux cancers ou CAF (cancer-associated fibroblasts) sont activés par la sécrétion de chimiokines, de protéases ou de TGF- β et favorisent la croissance tumorale¹⁰⁷.

D'autre part, les tissus tumoraux ont besoin d'un apport permanent en nutriments mais la croissance tumorale provoque un état d'hypoxie de la tumeur qui a souvent plusieurs conséquences comme la résistance à la cytotoxicité d'effecteurs immunologiques anti-tumoraux ou à la chimiothérapie ainsi que l'augmentation de la capacité invasive des cellules tumorales et donc l'apparition de métastases ; par ailleurs, il existe un lien entre l'hypoxie et le développement de mécanismes d'immunosuppression rendant le microenvironnement tumoral moins permissif aux effecteurs anti-tumoraux^{37,108}. Ces différents éléments

expliquent la corrélation retrouvée entre l'hypoxie et le caractère agressif des tumeurs¹⁰⁹. Comme les tissus tumoraux ont tout de même besoin d'un apport en nutriments, l'hypoxie déclenche également un phénomène de néoangiogenèse ; il existe d'autres caractéristiques induites par l'hypoxie comme la sécrétion de facteurs de croissances, le remodelage tissulaire ou l'apoptose qui contribueraient à la pression sélective des cellules cancéreuses conduisant ainsi au phénotype agressif associé à l'hypoxie^{110,111}. L'angiogenèse tumorale est majoritairement déclenchée par l'hypoxie qui induit HIF1a lui-même régulant positivement de nombreux facteurs pro-angiogéniques, comme le VEGF, qui agissent sur les cellules endothéliales et provoquent l'amplification du réseau de vaisseaux sanguins intra- et péri-tumoraux. De nombreuses thérapies sont basées sur ce concept d'angiogenèse ; notamment, les molécules anti-angiogéniques qui permettent de limiter la néoangiogenèse et par conséquent de diminuer l'apport en nutriments nécessaires aux cellules tumorales pour leur développement et leur croissance.

1.6. Approches d'immunothérapies actuelles documentant le concept d'immunosurveillance

Les lymphocytes T dans le microenvironnement tumoral expriment des molécules de costimulation inhibitrices (CTLA-4, PD-1, Lag-3...) qui après interaction avec leurs ligands (PD-L1, Galectine 9 ; CMH de classe II) entraînent un signal d'inhibition aux LT via l'activation de phosphatases intracellulaires (SHP1, SHP2...)¹¹². Les lymphocytes qui expriment ces molécules de costimulation inhibitrices sont dits « épuisés » (exhausted) et ne répondent pas à des signaux d'activation. Il est intéressant de noter que ces molécules de costimulation inhibitrices sont augmentées lors d'une activation lymphocytaire T chronique secondaire à une persistance de l'antigène comme observé dans les infections chroniques et les cancers³⁴. Différents travaux ont montré que dans les cancers l'expression de ces molécules sur les LT témoigne d'une activation de ces cellules, parfois associée à un bon pronostic¹¹³⁻¹¹⁵. Néanmoins dans d'autres tumeurs ces marqueurs sont associés à une survie diminuée¹¹⁶⁻¹¹⁸. L'influence respective de l'activation cellulaire, de l'exhaustion et de la spécificité de ces LT exprimant ces molécules de costimulation inhibitrices peuvent expliquer ces résultats contradictoires. Le groupe de Rosenberg a montré que les LT exprimant ces molécules de

costimulation inhibitrices sont enrichis en LT spécifiques d'antigènes associés aux tumeurs¹¹⁹. Sur le plan clinique, des résultats spectaculaires ont été observés après blocage de l'interaction de certaines de ces molécules de costimulation inhibitrices avec leurs ligands permettant une levée de l'inhibition des LT infiltrant les tumeurs. Ainsi, des anticorps anti-CTLA-4 (ipilimumab/Yervoy) associés ou non à la chimiothérapie augmentent la survie des patients atteints de mélanomes métastatiques^{120,121}. Des anticorps anti-PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) sont plus efficaces que la chimiothérapie de référence chez des patients atteints de mélanomes métastatiques et permettent d'obtenir des taux de réponses cliniques entre 25 et 40% avec des durées de réponses dépassant le plus souvent un an¹²². Plus récemment, le nivolumab et le pembrolizumab ont démontré une meilleure efficacité que la chimiothérapie chez des patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules à des stades avancés^{123,124}. Tous ces médicaments sont aujourd'hui commercialisés aux Etats Unis et en cours d'enregistrement en Europe avec des autorisations temporaires d'utilisation déjà disponibles en France. Ces traitements sont en cours d'évaluation dans d'autres cancers avec des résultats cliniques prometteurs (maladie de Hodgkin réfractaire, cancer de la vessie, cancer du rein, cancer du sein triple négatif, cancer des voies aérodigestives supérieures (VADS)...)¹²⁵. Ces traitements valident le concept d'immunosurveillance car leur efficacité repose sur l'existence d'une réponse LT-CD8⁺ naturelle bloquée fonctionnellement par ces molécules de costimulation inhibitrices. Il a d'ailleurs été montré que la présence de LT-CD8⁺ avant traitement constituait un marqueur prédictif de réponse à ces traitements^{35,126}. De façon intéressante, les patients présentant un taux de mutations important dans leur tumeurs sont également plus susceptibles de répondre à ces traitements^{127,128}. L'hypothèse expliquant cette observation reposerait sur la plus grande facilité des LT de répondre à un antigène muté pour lesquels les processus de délétion thymique et de tolérance périphérique aux antigènes du soi ne sont pas opérants. Il a d'ailleurs été détecté des LT-CD8⁺ dirigés contre ces néoépitopes chez des patients répondant à ces traitements.

2. Structure et composition du système immunitaire muqueux

2.1. Organisation du système immunitaire muqueux

Le système immunitaire peut-être décomposé en deux grands compartiments : le système immunitaire systémique (associé à la circulation sanguine) et le système immunitaire muqueux (associé aux muqueuses). Ces deux systèmes peuvent agir indépendamment l'un de l'autre. Les muqueuses sont des surfaces capables d'avoir des contacts et des échanges avec le milieu extérieur. Ces zones particulières possèdent des avantages indispensables à la vie (échanges gazeux, digestion et absorption de nutriments, reproduction sexuelle) mais des risques y sont associés car elles représentent un point d'entrée pour une grande quantité et variété d'agents infectieux. Le système immunitaire muqueux joue un rôle indispensable de défense vis-à-vis de ces pathogènes en apportant une réponse rapide et efficace. Ce compartiment immunitaire muqueux est composé du MALT pour Mucosa-Associated Lymphoid Tissue qui correspond à des tissus organisés où les réponses immunitaires spécifiques sont induites et initiées (site inducteur). Il est également composé de la lamina propria qui est le tissu conjonctif (fibres élastiques et conjonctives, cellules conjonctives) où a lieu la réponse effectrice T et la production des anticorps IgA (Immunoglobuline A) (site effecteur). Le MALT est une structure complexe qui correspond à la plus grande surface de tissus lymphoïdes corporels ; il est constitué principalement par les muqueuses intestinales appelées Gut-Associated Lymphoid Tissue (GALT) ou plaques de Peyer, les muqueuses pulmonaires appelées Bronchus-Associated Lymphoid Tissue (BAL), les muqueuses nasales appelées Nasal-Associated Lymphoid Tissue (NALT), les muqueuses conjonctives appelées Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue (CAL) et par les muqueuses vaginales appelées Vaginal-Associated Lymphoid Tissue (VALT) (**Figure 3**).

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

Figure 3. Représentation du système du

MALT chez l'Homme.

CALT pour les muqueuses conjonctives appelées Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue ; NALT pour les muqueuses nasales appelées Nasal-Associated Lymphoid Tissue ; BALT pour les muqueuses pulmonaires appelées Bronchus-Associated Lymphoid Tissue ; GALT pour les muqueuses intestinales appelées Gut-Associated Lymphoid Tissue ou plaques de Peyer ; VALT pour les muqueuses vaginales appelées Vaginal-Associated Lymphoid Tissue. Adapté de la revue 1 en Annexe Nizard et al.¹²⁹

Ces structures définies sont globalement conservées entre les espèces malgré quelques variations anatomiques et quelques variations liées à l'âge ; par exemple chez l'Homme le NALT n'a pas été anatomiquement défini, mais la présence d'une structure lymphoïde a été identifiée et semble correspondre fonctionnellement au NALT¹³⁰. Le BALT, lui, semble absent chez les chiens et les chats^{131,132} mais également chez l'Homme à l'âge adulte alors qu'il est retrouvé dans certains cas chez les enfants¹³³.

S'il est vrai que le MALT comprend des tissus lymphoïdes anatomiquement séparés, il a été montré que ces tissus lymphoïdes sont fonctionnellement reliés. Ce « système connecté » est communément appelé « common mucosal immune system »¹³⁰ (**Figure 4**). Par exemple, des travaux montrent que la vaccination intranasale permet d'obtenir des réponses immunitaires au niveau de la muqueuse vaginale, en conférant une protection humorale et/ou cellulaire^{134,135}. La voie d'immunisation sublinguale peut également induire ces réponses¹³⁶.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

Figure 4. Représentation de la relation entre les différents types de muqueuses et les ganglions lymphatiques. Les surfaces muqueuses sont réparties en deux grands groupes de façon simplifiée, les muqueuses de type I qui représentent les surfaces recouvertes d'un épithélium glandulaire et les muqueuses de type II qui correspondent aux surfaces recouvertes d'un épithélium malpighien. Adapté de l'article d'Iwasaki A. et al.¹³⁷

Plus précisément, les sites inducteurs tels que les plaques de Peyer, qui sont situées au niveau de l'intestin grêle, sont structurés autour d'un follicule lymphoïde regroupant des lymphocytes B (LB) et des DC folliculaires, d'une région interfolliculaire qui est globalement constituée d'un grand nombre de LT-CD4⁺, de LT-CD8⁺, de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et d'une région en dôme sous-épithélial qui lui est constitué de LB, de LT et de CPA (**Figure 5.**). Les cellules épithéliales spécialisées ou cellules M pour « microfold cells » font le lien entre la lumière intestinale et le MALT grâce à un transport transépithélial d'antigènes exogènes qui permet une réponse immunitaire adaptée à l'antigène rencontré¹³⁸. Ces cellules sont plus spécialisées que les cellules épithéliales classiques de par la taille réduite de leurs microvillosités, ce qui leur permet d'interagir plus aisément avec les pathogènes. L'anneau de Waldeyer (qui représente l'ensemble des formations lymphoïdes situées sur le pourtour du pharynx) possède la même fonction que les plaques de Peyer, au niveau de l'oropharynx, et permet ce rôle de censeur de l'immunité des voies respiratoires et digestives hautes.

Ce système immunitaire muqueux joue un rôle majeur dans l'équilibre entre l'induction d'une tolérance et une réponse immunitaire. En effet, l'homéostasie doit également être maintenue vis-à-vis des stimuli antigéniques non pathogéniques tels que les aliments, ou le microbiote commensal. Par conséquent les réponses immunitaires innées ou adaptatives localisées au niveau des muqueuses sont extrêmement régulées afin d'éviter les réponses auto-immunes.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

Figure 5. Représentation d'une plaque de Peyer. Cette structure lymphoïde permet la réponse immunitaire muqueuse grâce aux CPA qui, une fois l'antigène capté, vont migrer dans les ganglions drainants et déclencher la réponse immunitaire. Adapté de la **revue 1** en **annexe** Nizard et al.¹²⁹

2.2. Effecteurs et populations de cellules immunitaires muqueuses

2.2.1. Les IgA

Les IgA sont des anticorps d'isotype particulier A qui sont principalement produits par les lymphocytes B au niveau des muqueuses. Il existe deux isotypes d'IgA, les IgA1 qui sont majoritaires dans le sérum (ils représentent environ 80% des IgA) et les IgA2 qui prédominent dans le compartiment muqueux par rapport aux IgA1. Il existe également des formes dimériques ou polymériques appelées sIgA (IgA sécrétoires) retrouvées majoritairement dans

les sécrétions muqueuses. Ces sIgA constituent des polymères d'IgA comprenant 2 à 4 IgA monomériques reliées par une chaîne J polypeptidique. Ils contiennent également une pièce sécrétoire polypeptidique produite par les cellules épithéliales correspondant à la forme soluble du récepteur pour les Ig polymérisées (pIgR) et qui permet la prise en charge des IgA polymériques et leur transmigration au niveau des muqueuses. Les IgA muqueuses constituent la première ligne de défense immunologique contre les pathogènes de l'environnement. Ces IgA muqueuses sont des sIgA produites par les LB activés situés au niveau des centres germinatifs ou des ganglions drainants. Ces LB peuvent sécréter des IgA après stimulation par le TGF- β , l'IL-4, l'IL-6, l'IL-10 et l'acide rétinoïque produits par les DC, les lymphocytes, les cellules épithéliales et stromales des muqueuses¹³⁹⁻¹⁴². Les IgA sont les anticorps les plus produits du corps humain et représentent plus de 15% de la production totale des anticorps (à titre d'exemple, 3 à 5 grammes d'IgA sont produites dans la lumière intestinale chaque jour). Les sIgA sont résistants au pH acide et aux protéases, elles jouent un rôle dans l'homéostasie du microbiote intestinal, ne sont pas capables de fixer des molécules du complément et ont pour fonction majeure la neutralisation des pathogènes en empêchant leur adhésion aux tissus épithéliaux. Enfin, ne provoquant pas de réponse inflammatoire elles permettent de limiter l'inflammation des tissus muqueux.

2.2.2. Cellules dendritiques

Les DC ont un rôle majeur dans la protection de l'organisme contre les agents infectieux et dans le déclenchement de la réponse immunitaire innée et adaptative. Il en existe plusieurs populations ayant des activités différentes :

1) des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) (CD11b⁻B220⁺ chez la souris et BDCA2⁺CD123⁺CD11c^{low} chez l'Homme) qui sécrètent de l'interféron de type 1 et qui permet une protection anti-virale innée¹⁴³. Ces pDC sont capables d'augmenter l'expression des molécules du CMH ainsi que des molécules de costimulation des LT^{144,145}.

2) des DC migratoires comme les cellules de Langerhans situées dans l'épiderme ou les DC interstitielles situées dans les tissus conjonctifs (sauf la cornée et le cerveau).

3) des DC conventionnelles (cDC) (CD11b⁺CD11c⁺) autrefois appelées DC myéloïdes qui sont localisées dans les organes lymphoïdes.

Au niveau des sites inducteurs de la réponse immunitaire muqueuse, au contact des cellules M, les DC sont capables d'internaliser et d'apprêter les antigènes, elles peuvent alors migrer vers les ganglions drainants et induire une réponse adaptée contre l'antigène internalisé (**Figure 5**). Ces cellules ont été décrites comme ayant un phénotype CD11b⁺CD8⁻ pour les cellules tolérogéniques et CD11b⁻CD8^{+/-} pour les cellules non tolérogéniques capables de produire de l'IL-12 afin d'induire une réponse LT-CD8⁺ et la sécrétion d'IFN- γ . Une population de cDC muqueuses CD11b⁺CD103⁺ (CD103 = intégrine $\alpha\text{E}\beta\text{7}$) a été décrite et est capable de migrer de la lamina propria aux ganglions drainants grâce au récepteur chimiokinique 7 (CCR7)¹⁴⁶. Elles permettent la présentation des antigènes aux LT-CD4⁺ et aux LT-CD8⁺ ainsi que l'expression de molécules de migration tissulaire par ces cellules¹⁴⁷. Cette population de cDC CD103⁺ est capable de présenter via le CMH I des antigènes exogènes (présentation croisée) ou endogènes permettant une réponse immunitaire LT-CD8⁺ cytotoxique¹⁴⁸, tandis que les pDC semblent présenter cette propriété chez l'Homme mais pas chez la souris¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Parmi les DC présentes dans les poumons, on retrouve les cDC CD103⁺, les cDC CD11b⁺ et les pDC ; les cDC CD103⁺ sont capables de migrer de l'épithélium pulmonaire jusqu'aux ganglions médiastinaux pour activer la réponse LT-CD8⁺. Les DC ont également un rôle dans l'induction, le maintien et la prolifération des Treg¹⁵² ; en effet, un travail très récent de Bakdash G. et ses collègues montre que les DC CD103⁺ activées par l'acide rétinoïque provoquent l'induction de Treg $\alpha\text{4}\beta\text{7}^+\text{CCR7}^+$ capables de migrer dans la muqueuse intestinale¹⁵³. Dans d'autres sites inducteurs certaines DC sont capables, grâce à des dendrites qui peuvent s'étendre entre les jonctions épithéliales et atteindre la lumière, d'internaliser des antigènes directement sans passer par des cellules épithéliales spécialisées comme les cellules M ; c'est le cas des cDC CD103⁺.

L'homologue des cDC CD103⁺ murines chez l'Homme a été récemment identifié grâce au marqueur CD141 et aurait la plus forte capacité de présentation croisée des DC présentes chez l'Homme^{154,155}, même si cette observation reste controversée¹⁵⁶.

2.2.3. LT-CD8⁺ intra-épithéliaux et Trm

Au niveau de l'épithélium muqueux il existe des populations lymphocytaires CD8⁺ intra-épithéliales (IEL) qui expriment un récepteur cellulaire T (TCR) de type $\alpha\beta^+$ ou $\gamma\delta^+$, associé à une forme homodimérique de la molécule CD8 de type $\alpha\alpha^+$ (CD8 $\alpha\alpha^+$). Dans le sang périphérique, la molécule CD8 est hétérodimérique : CD8 $\alpha\beta$ ^{157,158}. À la différence des LT-CD8⁺ périphériques, une grande proportion des IEL ont un TCR de type $\gamma\delta^+$. Ces IEL expriment à leur surface des molécules de migration telle que l'intégrine CD103^{159,160}. Le CD8 $\alpha\alpha$ a été identifié comme étant un marqueur de LT-TCR $\alpha\beta^+$ mémoire chez la souris^{161,162}. Chez l'Homme, les LT-CD8⁺ effecteurs mémoires intestinaux avec un TCR $\alpha\beta^+$ expriment également le marqueur CD8 $\alpha\alpha^+$ ¹⁶¹. Walker et ses collègues ont récemment démontré la présence de LT-CD8 $\alpha\alpha^+$ simples positifs dans les sangs de cordon chez l'Homme qui seraient exclusivement dérivés des cellules thymiques CD161⁺⁺CD8⁺¹⁶³. Ces cellules T simples positives CD8 $\alpha\alpha^+$ ont une capacité de reconnaissance antigénique cent fois inférieure à celle des cellules T CD8 $\alpha\beta^+$ ^{164,165}. Chez la souris l'apparition du CD8 $\alpha\alpha^+$ sur des cellules mémoires CD8 $\alpha\beta^+$ est considérée comme un mécanisme permettant d'éviter leur mort post-activation ou leur exhaustion tout comme chez l'Homme^{162,166}. Ces lymphocytes mémoires ou activés ont une capacité cytotoxique et expriment l'intégrine CD103 nécessaire au ciblage épithélial¹⁶⁷. Des travaux ont montré que les cellules précurseurs des IEL CD8 $\alpha\beta^+$ CD8 $\alpha\alpha^+$ sont CD103 négatives et nécessiteraient une stimulation par l'IL-15 pour exprimer le CD8 $\alpha\alpha$ et le CD69¹⁶⁸. L'IL-15 agirait également sur le facteur de transcription T-Bet nécessaire au développement des IEL^{169,170}.

Malgré la ressemblance phénotypique avec les Trm, les IEL se différencient à partir de précurseurs thymiques^{171,172} et ont été retrouvés chez des enfants prématurés¹⁷³ ce qui les distingue des Trm qui ne se différencient pas à partir de précurseurs thymiques et n'ont jamais été montrés chez des nouveaux nés (voir chapitre suivant).

2.2.3.1. Origine des Trm

Les Trm contrairement aux IEL et aux Tcm seraient dérivés des Teff. En effet, plusieurs études rapportent la différenciation des Trm à partir de Teff, directement dans les tissus. Ainsi les Teff sont activés et amplifiés dans les ganglions puis migrent dans les tissus périphériques où ils reçoivent des signaux (TGF- β , IL-15, IL-33, TNF- α) provenant du microenvironnement tissulaire qui provoquent leur différenciation en Trm¹⁷⁴ (**Figure 6**). Cependant ces résultats

restent controversés, en effet Mackay LK. et ses collègues ont démontré que les Trm de la peau pouvaient provenir de cellules Tcm KLRG⁻ ¹⁷⁵.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

Figure 6. Origine et différenciation des cellules T résidentes mémoires. Les LT naïfs sont activés dans les ganglions, prolifèrent et se différencient en lymphocytes effecteurs. Les effecteurs migrent et entrent dans les tissus cibles, puis reçoivent des signaux cytokiniques qui provoquent leur différenciation en Trm. Adapté du SnapShot de Beura LK. et Masopust D.¹⁷⁶

2.2.3.2. Localisation des Trm

Les Trm ont été décrits dans plusieurs localisations muqueuses comme les poumons, les glandes salivaires, l'épithélium intestinal ou la muqueuse vaginale, mais également dans des localisations non muqueuses comme la rate, le cerveau et la peau¹⁷⁷⁻¹⁸¹.

2.2.3.3. Phénotype des Trm

Le phénotype de cette population est de plus en plus consensuel et comprend l'intégrine CD103 et le marqueur CD69 principalement. Plusieurs études rapportent la présence de l'intégrine CD49a sur cette population dans le cerveau^{160,175,182-184}. Les LT-CD8⁺ mémoires nécessitent tous la présence de l'eomesidermine qui induit l'expression du récepteur à l'IL-2¹⁸⁵ ; sur les Trm, l'expression d'eomesidermine est toutefois inférieure aux autres populations de LT-mémoires¹⁸⁴. Les Trm expriment le granzyme B ce qui leur confère une capacité cytolytique immédiate¹⁸⁶ (**Tableau 2**).

Il est très intéressant de noter que les Trm peuvent se différencier en Tem ou Tcm comme l'a décrit le groupe de Masopust en retirant les Trm de leur compartiment anatomique dans des expériences chez la souris¹⁸⁷.

D'autre part, il faut prendre en compte qu'il existe une population de Trm CD4⁺ qui joue un rôle important dans la réponse antivirale. Ces cellules sont résidentes au même titre que les Trm CD8⁺ et sont capables de déclencher une réponse rapide à un second challenge viral ; de plus, elles sont capables de sécréter de l'IFN- γ et ont été décrites dans les muqueuses génitales et dans la peau^{188,189}.

	Marqueurs	CD8 ⁺ Naïf	Tscm	MPEC	SLEC	Teff	Tcm	Tem	Trm
Marqueurs de différenciation	Granzyme B	-	-	-	+++	+++	-	+	+++*
	Eomes	-	+	+++	-	+	++	++	+
	Perforin	-	-	+	+++	+++	-	+++	+
	KLRG1	-	-	+	+++	+++	-	+++	-
	Ly6C	±				++	++	++	-

Migration / Rétention	L-selectine	++				-	++	-	-
	CCR7	++	+	+++	-	-	++	±	-
	CD44	-	+++	±	±	+++	+++	+++	++
	CD69	-				-**	-	-	++
	CD103	+				-	-	-	+++*
	CD49a	-				-	-	-	±*
	S1P1	++				++	++	++	-
	KLF2	++				++	++	++	-
Récepteurs cytokiniques	IL-15Rβ	++	+++	++	++	+	+++	++	±
	IL-7Rα	++	+	+++	±	-	+++	+	++
Localisation	Organes lymphoïdes secondaires, sang, lymphes	Sang	Rate, ganglions	Rate, ganglions	Organes lymphoïdes secondaires, sang, tissus non lymphoïdes	Organes lymphoïdes secondaires, sang, lymphes	Sang, rate, quelques tissus non lymphoïdes	Barrières anatomiques	

Tableau 2. Phénotype et localisation des lymphocytes T CD8⁺ résidents mémoires par rapport aux autres populations lymphocytaires CD8⁺. * Varie selon les tissus. Légende : rouge = marqueur humain et murin ; vert = marqueur murin ; Fond rouge = Non décrit

2.2.3.4. Rôle des Trm

Le rôle de ces cellules est actuellement très étudié et est de plus en plus finement caractérisé. Les Trm ont été décrits comme ayant une meilleure capacité de protection que les cellules mémoires effectrices spécifiques contre la réinfection dans plusieurs études précliniques chez la souris¹⁹⁰, mais également comme étant essentiels au contrôle de la charge virale chez des primates non humains¹⁹¹. Les Trm sont induits lors d'une infection et restent localisés dans la zone initiale de l'infection permettant ainsi une réponse rapide et efficace en cas de réintroduction du pathogène.

La réponse immunitaire mise en place par les Trm commence tout juste à être élucidée. De récents travaux montrent que les Trm sont capables d'induire à la fois une immunité adaptative et une réponse innée en sécrétant des cytokines et chimiokines (IFN-γ, TNF-α, IL-2Rβ, XCL1) capables de provoquer une réponse humorale locale, un recrutement des DC,

une maturation des DC et une activation des cellules NK^{192,193}. De plus, le nombre de Trm dans une localisation donnée étant limité, il a été montré qu'ils étaient capables de recruter des LT-CD8⁺ circulants en moins de 48h¹⁹⁴.

La longévité des Trm n'est pas très documentée mais certaines études observent leur présence après 1 ou 2 années chez des souris ou des macaques.

3. Migration des LT

3.1. Mécanismes

3.1.1. Rôle de la cellule endothéliale

Les LT migrent du sang aux tissus inflammatoires grâce aux cellules endothéliales. Il a été montré que les LT adhéraient aux cellules endothéliales grâce à une combinaison de différentes liaisons à des molécules de migration exprimées constitutivement. Les sélectines (par exemple le CD62L exprimé sur les LT) se lient aux adhésines des cellules endothéliales (par exemple le PNA pour Peripheral Node Addressin qui a pour ligand le CD62L) et les intégrines des LT (LFA-1 pour Lymphocyte Function-Associated antigen 1, CD49d) se lient aux membres de la superfamille d'immunoglobulines comme ICAM-1 (IntraCellular Adhesion Molecule 1) ou VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1)^{195,196}. Les LT interagissent avec les cellules endothéliales grâce à un mouvement de roulement médié par une dynamique de liaison et de dissociation de ligands à leurs récepteurs. Cette adhésion de faible intensité a pour conséquence de freiner le mouvement des LT portés par le flux sanguin^{197,198}. De façon générale, les 3 grandes étapes de ce mouvement migratoire sont :

1) le « roulement »

2) l'activation des récepteurs de chimiokines (CCR7) sur les LT qui induit le changement de conformation des intégrines (LFA-1) sur ces cellules et leur interaction avec les molécules exprimées par la cellule endothéliale (ICAM-1)

3) la forte interaction qui en résulte entre le LT et la cellule endothéliale entraîne l'arrêt du lymphocyte puis son extravasation (**Figure 7**)

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

Figure 7. Les grandes étapes de la migration lymphocytaires. Les lymphocytes portés par le flux sanguin circulent le long des parois des cellules endothéliales (rolling), lorsqu'ils rencontrent des récepteurs spécifiques, ils s'activent (activation) puis s'arrêtent (arrêt) pour débiter leur extravasation vers le tissu cible. Adapté de la revue de Schenkel M. et al.¹⁹⁴

3.1.2. Chimiokines

Les chimiokines sont des petites molécules solubles divisées en 4 groupes principaux, CXC, CC, CX3C ou C en fonction de la position du résidu Cystéine qui est conservé. Les chimiokines sont des cytokines possédant un pouvoir d'attraction dit chimiotactique et s'inscrivent dans des mécanismes très fins de régulations de migration des cellules immunitaires grâce à différents gradients de concentration. Les récepteurs de ces chimiokines suivent la nomenclature des chimiokines (**Figure 8**). Les chimiokines sont fonctionnellement divisées en deux grands groupes, les chimiokines pro-inflammatoires (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CXCL10, ...) et les chimiokines homéostatiques qui sont physiologiquement sécrétées par les tissus (CCL19, CCL20, CCL21, CXCL12, CXCL13, ...).

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

Figure 8. Représentation des chimiokines. Cette représentation montre les principaux systèmes chimiokiniques, les protéines G couplées aux récepteurs de surface et les ligands chimiokiniques. Les chimiokines inflammatoires sont inductibles et impliquées dans tous les systèmes de la réponse immunitaire. Les chimiokines homéostatiques sont impliquées dans le développement et la physiologie classique. Les récepteurs chimiokiniques atypiques sont généralement silencieux et agissent en tant que régulateurs négatifs du système, comme un leurre en réduisant le niveau de chimiokines. Les chimiokines virales et leurs récepteurs permettent aux pathogènes de moduler la réponse immunitaire aux infections. Les récepteurs aux chimiokines inflammatoires, homéostatiques et atypiques sont retrouvés dans le microenvironnement tumoral. Adapté de la revue de Frances R Balkwill¹⁹⁹.

3.1.3. Notions d'imprinting (empreinte)

Lorsque les DC présentent les antigènes aux cellules naïves, ces cellules acquièrent un phénotype effecteur mais également un phénotype d'adressage tissulaire (imprinting). Par exemple dans les ganglions mésentériques, les LT activés par les DC expriment l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ et le récepteur CCR9²⁰⁰ ou encore, les DC pulmonaires peuvent induire un phénotype migratoire pulmonaire sur les LT en induisant l'expression du récepteur CCR4²⁰¹. Ce phénotype d'adressage tissulaire est essentiel et paraît dépendre de la population de DC ; les DC spécifiques d'un tissu semblent pouvoir induire un phénotype de migration spécifique vers ce tissu d'origine. Ainsi, les DC intestinales qui sont localisées au niveau de la lamina propria, dans

les plaques de Peyers et dans les ganglions mésentériques, sont capables d'induire une différenciation des cellules T et B et leur migration vers l'intestin. Cette expression de molécules d'adressages est induite en partie grâce au récepteur à l'acide rétinoïque²⁰²⁻²⁰⁴. Il est intéressant de noter que les DC CD103⁺ de l'intestin possèdent des caractéristiques identiques que ce soit chez la souris ou chez l'Homme²⁰⁰. Un autre travail de Campbell JJ. et Nizza ST. montre que les DC CD11b⁺Langerin⁺ de la peau sont capables d'induire un phénotype migratoire CCR10⁺ spécifique de la peau sur des LT-CD8⁺ ^{205,206}. Malgré tous ces travaux qui semblent démontrer clairement l'importance de l'imprinting du phénotype migratoire des LT durant leur activation, il faut noter que certains travaux dans des modèles infectieux montrent des résultats contradictoires. Par exemple des LT-CD8⁺ spécifiques d'un tissu peuvent protéger ce tissu contre une infection virale mais peuvent également protéger de façon plus globale^{207,208} ; ces résultats pourraient toutefois être imputables aux modèles qui sont utilisés : le grand nombre de cellules transférées lors des transferts adoptifs, la voie d'immunisation, la diffusion de l'antigène dans l'organisme (virus), les adjuvants utilisés ou encore les tissus analysés parmi d'autres²⁰⁹.

3.2. Migration intratumorale

3.2.1. Migration des cellules effectrices

Les LT-CD8⁺ une fois activés perdent le marqueur CD45RA, diminuent l'expression des molécules de migration nécessaires à leur entrée dans les ganglions (principalement le récepteur sphingosine phosphate 1 - S1PR1 mais également le CD62L et le CCR7) et augmentent l'expression des molécules de migration nécessaires à l'entrée dans les tissus non lymphoïdes (par exemple : pour l'intestin : $\alpha 4\beta 7$, CCR9 / pour la peau PSGL-1, CCR10, CCR4) et donc se différencient en T_{eff} qui correspondent aux cellules capables de migrer et de patrouiller dans les tissus périphériques (**Figure 9**).

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

Figure 9. Schéma simplifié de la circulation des cellules T. Les Tcm CD62L⁺CCR7⁺ entrent dans les ganglions, tout comme les LT naïfs qui vont être activés et se différencier en Teff. Les Teff vont ensuite circuler jusqu'à leurs tissus cibles où ils vont s'infiltrer grâce à des molécules de migration comme le CCR9 et l' α 4 β 7 pour l'intestin, le PSGL-1, le CCR4 et le CCR10 pour la peau. Ils peuvent ensuite recevoir des signaux cytokiniques qui provoqueront une différenciation en Trm. Adapté du SnapShot de Beura LK. et Masopust D.¹⁷⁶

De nombreux travaux démontrent les caractéristiques migratoires des cellules immunitaires au sein des tissus sains (**Tableau 3**) mais peu prennent en considération le microenvironnement tumoral et la capacité migratoire intratumorale.

Les chimiokines CCL2 et CCL5 sont les principales chimiokines attractrices des monocytes et des macrophages au sein des tumeurs^{210,211}. Les chimiokines CC et CXC sont capables d'attirer les cellules lymphocytaires au sein des tumeurs. De façon générale la migration et le trafic intratumoral par les LT sont très faibles par comparaison au contexte infectieux, ceci s'explique par des facteurs à la fois intrinsèques (immunosuppression directe par des signaux d'inhibitions, volume tumoral et hypoxie, néoangiogenèse désorganisée conduisant à une perfusion tumorale désorganisée, néovaisseaux anormaux, sécrétions de molécules anti-inflammatoires) et extrinsèques aux tumeurs (immunosuppression via des cellules immunosuppressives)²¹². Parallèlement, il a été montré que les LT-CD8⁺ infiltrant les tumeurs (TIL) sont corrélés à un bon pronostic clinique^{97,213-216}. Les LT activés expriment une panoplie de récepteurs de domiciliation leur donnant une capacité migratoire qui a particulièrement été décrite dans des contextes sains ou infectieux. Parmi ces récepteurs, on trouve les ligands de la P- et de la E-sélectine ainsi que des récepteurs aux chimiokines comme le CXCR3. Il a été souligné que l'interaction entre ligands et chimiokines provoquait l'activation de LFA-1 qui se lie à ICAM-1 et l'expression d'intégrines comme VLA-4 (pour Very Late Antigen-4 ou CD49d) qui se lie à VCAM-1. Ces molécules n'ont pas été décrites à ce jour comme ayant un rôle dans la migration lymphocytaire vers les sites tumoraux.

Dans le contexte des tumeurs malignes la capacité migratoire immunitaire a beaucoup moins été étudiée. Malgré le fait que la fréquence et le type des TIL soient associés à un bon pronostic, il existe néanmoins des variations associées aux différents types tumoraux²¹⁷. Le CXCR6 qui se lie à CXCL16 apparaît être un récepteur exprimé sur les LT activés et aurait un rôle dans la migration intratumorale ; en effet chez des souris déficientes en CXCR6 l'infiltration intratumorale est plus faible²¹⁸. Ces résultats sont intéressants mais ils ne tiennent pas compte du fait que les NKT ne peuvent pas être activés sans le récepteur CXCR6 ce qui pourrait introduire un biais dans l'interprétation de ces résultats²¹⁹. Malgré tout, il a été montré que le CXCL16 et le CX3CL1 (chimiokine ligand du CX3CR1) sont associés à une grande infiltration en LT-CD8⁺ et LT-CD4⁺ ainsi qu'à un bon pronostic dans les cancers colorectaux²²⁰. Le CXCR3 est le récepteur chimiokinique le plus retrouvé sur les TIL activés dans les mélanomes²²¹, les cancers colorectaux²²² et les cancers du sein²²³. Il a également été mis en évidence, dans un modèle murin, que les LT-CD8⁺ cytotoxiques exprimant le CXCR3 infiltraient mieux les tumeurs et provoquaient un effet anti-tumoral plus efficace²²⁴. L'IFN- γ produit par les LT-CD8⁺ est clairement identifié comme l'un des activateurs clé de la fonction anti-tumorale des CTL ; il est intéressant de noter que le CXCL9, le CXCL10 et le CXCL11, qui sont les trois ligands du CXCR3, sont induits par l'IFN- γ . De plus, le CCR5 est également exprimé par des CTL murins et humains et permet leur recrutement intratumoral via les chimiokines CCL5 et CCL3 tout en étant associé à un bon pronostic^{225,226}.

	Récepteur de migration	Ligand tissulaire
Intestin	$\alpha 4\beta 7$	MADCAM-1
	CCR9	CCL25
	CD103	E-Cadherine
Peau	CCR10	CCL27
	PSGL-1 et ligands E- selectine (ESL-1, glycosphingolipides, ...)	P- et E- selectine
	CCR4	CCL17
	CD103	E-Cadherine
Poumon	CD103	E-Cadherine
	CD49a	Collagène IV
	$\alpha 4\beta 7$	VLA4

	CXCR6	CXCL16
	LFA-1	ICAM-1
Glandes salivaires	CD103	E-Cadherine
	E-Cadherine	
Tractus génital	CD103	E-Cadherine
	CD49a	Collagène IV
	Ligand E-selectine	E-selectine

Tableau 3. Résumé des marqueurs de migrations des LT-CD8⁺ activés dans les tissus. Adapté de la revue 1 en Annexe Nizard et al.¹²⁹

3.2.2. Rétention des lymphocytes T

Très peu d'études ont montré le rôle des chimiokines et des récepteurs aux chimiokines dans la rétention lymphocytaire intratumorale néanmoins une étude montre que l'intégrine CD103 est impliquée dans la rétention des CTL au sein de la tumeur via le recrutement des récepteurs CCR5 au niveau de la synapse entre le LT et son APC les rendant insensibles à un gradient de chimiokine CCL5²²⁷. Une autre étude démontre que dans des métastases secondaires aux mélanomes, les intégrines de rétention CD103, $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ sont surexprimées par les cellules tumorales métastatiques mais cette étude ne montre pas leur rôle direct dans l'infiltration lymphocytaire²²⁸.

3.2.3. Migration des cellules suppressives

Les tumeurs sont capables d'inhiber la réponse immunitaire, notamment en empêchant le recrutement des cellules de l'immunité. Dans les tumeurs cutanées, la voie de signalisation EGFR-Ras provoque une diminution de l'expression de CCL27 qui a pour conséquence une diminution du recrutement des CTL²²⁹. En effet il a été montré que le CCL27 était associé au recrutement d'une population particulière de CTL CCR10⁺²³⁰. Un autre mécanisme démontré dans les cancers du sein consiste à attirer les cellules myéloïdes suppressives par l'inactivation du gène du récepteur au TGF- $\beta 2$ induisant ainsi la production de CXCL5, CXCL1 et Ptg2. Ces chimiokines permettent le recrutement de ces MDSC qui peuvent jouer un rôle dans l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale²³¹. De façon très intéressante les MDSC ont montré une capacité à diminuer l'expression de la L-sélectine sur les LT²³² ou à produire

des RNS (pour Reactive Nitrogen Species) qui induisent par nitration du CCL2 la diminution de son effet chimiotactique vis-à-vis des LT-CD8⁺ ²³³. Les chimiokines CCL17 et CCL22 attirent les LT-CD4⁺ régulateurs dans la tumeur qui expriment le récepteur CCR4²³⁴. L'infiltration par les Treg est majoritairement corrélée à un facteur de mauvais pronostic et il a été montré que le CCL22 et le TGF- β 1 possèdent la capacité d'attirer au sein des tumeurs les Treg²³⁵, tout comme les macrophages M2 qui sécrètent les chimiokines CCL17, CCL22 et CCL24^{74,75}. Notre groupe a également montré que l'utilisation d'une molécule antagoniste du CCR4 provoque la diminution du recrutement des Treg au sein des tumeurs^{236,237}. L'hypoxie tumorale peut aussi conduire à la sécrétion de CCL28 par les cellules tumorales qui permet alors le recrutement localisé de Treg exprimants le récepteur de chimiokine CCR10²³⁸. Pour faciliter l'infiltration tumorale en Treg, l'endothélium tumoral sécrète de l'IL-10, du VEGF-A et du PGE2 (Prostaglandine E2) qui induisent de façon synergique l'expression de FasL qui provoque l'apoptose des CD8⁺ effecteurs mais pas des Treg maintenant le pool de Treg intratumoral²³⁹.

4. La radiothérapie préclinique et l'immunité

4.1. La radiothérapie

La radiothérapie est une technique de traitement localisé des cancers par exposition précise des zones d'intérêts à des radiations ionisantes (exception faite des tumeurs non solides). Ces radiations consistent en un transfert d'énergie vers les cellules cancéreuses ce qui provoque une ionisation des atomes (ils se chargent positivement ou négativement). Cet effet a pour aboutissement, entre autres, une déstabilisation de l'ADN et la création de radicaux libres à partir des molécules d'eau qui interagissent avec l'ADN et provoquent des ruptures moléculaires. Ces altérations aboutissent à la mort des cellules cancéreuses ou à leur impossibilité de se diviser. Les doses de radiations absorbées sont mesurées en Gray (Gy) qui représente, pour 1 Gy, l'absorption d'1 Joule provenant d'un rayonnement ionisant par un milieu homogène d'une masse d'un Kilo. De façon générale, pour éviter les effets toxiques sur les tissus sains adjacents aux cellules tumorales les doses d'irradiation délivrées sont fractionnées en plusieurs séances à hauteur de 2 Gy par séance. Généralement, dans les modèles murins la dose totale délivrée est de 15 Gy^{240,241}.

4.2. Effet immunologique des radiations ionisantes

Depuis peu, des travaux précliniques montrent l'impact de la radiothérapie sur la modulation du microenvironnement tumoral en plus de l'induction de la mort cellulaire²⁴². L'irradiation des zones tumorales permet le relargage de signaux dangers par les cellules tumorales comme l'HMGB1 qui se lie au TLR4 présent sur les DC qui contribue aux réponses anti-tumorales à travers l'activation des CTL^{243,244}. Egalement, l'irradiation provoque le relargage par les cellules tumorales de chimiokines CXCL16 favorisant le recrutement de Teff²¹⁸. Des doses non létales d'irradiation provoquent la dégradation des protéines intracellulaires conduisant ainsi à une augmentation de la présentation peptidique par les molécules du CMH I et donc à une meilleure réponse anti-tumorale²⁴⁵. Les radiations permettent aussi la modulation du phénotype même des cellules tumorales via une surexpression des récepteurs de mort Fas ce qui augmente la sensibilité des cellules tumorales aux CTL²⁴⁶, ainsi que l'expression de calreticuline (qui est un composant essentiel à la présentation antigénique par le CMH I) à la surface membranaire conduisant de la même façon à une sensibilité accrue des cellules tumorales aux CTL²⁴⁷. D'autres effets immunologiques sont associés à l'irradiation des cellules tumorales comme l'expression de molécules d'adhésions ICAM-1 par les cellules endothéliales qui permet aux CTL d'atteindre les sites tumoraux²⁴⁸. L'irradiation fractionnée peut quant à elle provoquer la diminution de Treg et de M2 intratumoraux²⁴⁹ (**Figure 10**).

Figure 10. Schéma des effets immunologiques des radiations ionisantes. Tiré de la revue de Levy A. et al.²⁴⁹

4.3. Combinaison avec l'immunothérapie

L'irradiation des cellules tumorales provoque des réponses immunitaires anti-tumorales, mais bien souvent l'irradiation seule ne permet pas de guérir les animaux en éradiquant toutes les cellules tumorales. La combinaison de la radiothérapie avec l'immunothérapie est une méthode prometteuse qui pourrait aboutir à un meilleur effet

thérapeutique anti-tumoral qu'une irradiation seule à travers l'amplification des réponses immunitaires. Mason KA. et ses collègues ont montré que l'injection de CpG (une molécule d'ADN synthétique qui se lie au TLR9) péritumoral et intratumoral en combinaison à la radiothérapie fractionnée provoquait des régressions complètes tumorales et une protection complète lors d'une seconde greffe tumorale 4 mois après²⁵⁰. Ces résultats suggèrent que la combinaison de la radiothérapie à l'immunothérapie permet le développement d'une immunité anti-tumorale qui, dans un contexte de récurrence, permettrait d'augmenter la survie à long terme. Le Ligand de FLT3 (Fms-Like tyrosine kinase receptor 3 Ligand) stimule la génération des DC²⁵¹ ; le traitement de souris par le ligand de FLT3 associé à une unique dose d'irradiation de 2 Gy a montré une diminution de la croissance tumorale par un mécanisme médié par des LT-CD8⁺²⁵². Dans une autre étude il a été montré que l'injection intratumorale de DC combinée à la radiothérapie augmente la survie des souris et limite la croissance tumorale²⁵³. Par ailleurs la combinaison de la radiothérapie avec un anticorps monoclonal anti-CTLA-4 induit une réponse LT-CD8⁺ anti-tumorale alors que le traitement des souris par l'anti-CTLA-4 seul n'induit pas cette réponse. Dans un autre travail il est montré que la combinaison d'une dose de radiothérapie (8 Gy) et d'une stratégie vaccinale basée sur des virus recombinés avec les ADNc codant des molécules de costimulation des cellules T (LFA-3, B7-1, ICAM-1) permet l'infiltration des LT-CD8⁺ et des LT-CD4⁺ spécifiques et l'inhibition de la croissance tumorale dans 50% des cas²⁴⁶.

La combinaison de la radiothérapie avec l'immunothérapie montre des résultats prometteurs, à ce jour il n'a pas été montré d'effet synergique entre radiothérapie et vaccination avec des vecteurs non viraux anti-tumoraux.

5. Les cancers des voies aérodigestives supérieures

5.1. Etiopathogénie et incidence

Les cancers de la sphère ORL (lèvre, pharynx, larynx, nasopharynx, oropharynx) représentent la 5^{ème} cause de cancers dans le monde (650 000 cas/an) avec une mortalité très élevée 350 000 morts/an^{254,255}. Dans plus de 80 % des cas, les tumeurs malignes sont des carcinomes épidermoïdes de mauvais pronostic avec une survie à 5 ans des patients inférieure

à 50 %. L'étiologie de ces cancers est multifactorielle (rôle de l'alimentation, des facteurs génétiques, exposition à certaines substances) et associe deux facteurs de risques principaux que sont l'alcool et le tabac. Au niveau de l'oropharynx (amygdales et base de la langue) l'incidence augmente depuis plusieurs années²⁵⁶.

Les cancers des VADS suivent la classification internationale TNM qui permet de les classer selon leur extension anatomique (T = Tumeur primaire ; N = Node pour l'invasion ganglionnaire ; M = métastases) (**Tableau 4**).

T (Tumeur primitive)	N (Adénopathie)	M (métastases)
Tis : épithélioma <i>in situ</i>		
T0 : pas de signe de tumeur primitive	N0 : pas d'adénopathie	M0 : pas de signe de métastases à distance
T1 : tumeur ≤ à 2 cm	N1 : adénopathie homolatérale unique ≤ à 3 cm	M1 : métastases à distance
T2 : tumeur > à 2 cm et ≤ à 4 cm	N2a : adénopathie homolatérale unique > à 3 cm et ≤ à 6 cm	
T3 : tumeur > à 4 cm	N2b : adénopathies homolatérales multiples ≤ à 6 cm	
T4 : tumeur étendue à l'os, aux muscles, ...	N2c : adénopathies bilatérales ou controlatérales ≤ à 6 cm	
	N3 : adénopathie > à 6 cm	
Tx : tumeur inclassable	Nx : N inclassable	Mx : M inclassable

Tableau 4. Classification TNM. Tableau adapté de la classification TNM de l'Union for International Cancer Control (UICC) de 2002.

Dans la grande majorité des cas, ces cancers ne sont pas associés à des progressions métastatiques mais sont associés à un fort taux de récurrence locale. Ils sont souvent décelés à des stades avancés (plus de 60 % des cas) chez des patients âgés.

Depuis plusieurs années l'implication de plusieurs papillomavirus humains (HPV) a été démontrée dans la genèse de plusieurs cancers dont les carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures (CEVADS), les cancers du col de l'utérus, du vagin, de la vulve ou encore de l'anus. Ce virus est impliqué dans environ 7-8% de la totalité des cancers et l'incidence mondiale de l'infection par HPV est très élevée (près de 660 000 000 de personnes sont infectées). Malgré l'incidence liée à l'alcool et au tabac, une étude démontre que l'incidence annuelle des cancers de la sphère ORL liés à l'alcool et au tabac baisse de 2,42 % chaque année depuis plus de 20 ans alors que l'incidence annuelle des CEVADS HPV⁺ augmente de 0,65 %²⁵⁷. La prévalence de l'HPV dans les CEVADS est de 26 % et peut augmenter dans certaines localisations comme l'oropharynx où l'on peut retrouver l'HPV dans 35,6 à 72% des cas suivant la localisation géographique²⁵⁸. Dans certaines régions comme l'Europe du Nord ou l'Amérique du Nord cette proportion peut atteindre jusqu'à 80 % des cas. En France le taux des cancers de l'oropharynx associés à l'HPV est de 46,5 %. Certains observateurs parlent d'une épidémie des cancers liés à l'HPV²⁵⁹.

5.2. Le Papilloma Virus Humain

L'HPV est un virus à ADN double brin circulaire (\approx 8kb) oncogène de la famille des *papillomaviridae*. Il code pour des protéines « E » régulatrices dites précoces (Early) E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 et E8 et des protéines « L » de la capsidite dites tardives (Late) L1 et L2. Une minorité d'HPV comprend les protéines E3, et E8. Ce virus est transmis par contact direct ou par transmission sexuelle et possède un tropisme cutané. Il existe plus de 100 types différents d'HPV avec des spécificités tissulaires, ils infectent la couche basale des épithéliums ; dans la grande majorité des cas l'infection par HPV est asymptomatique mais parfois des lésions verruqueuses ou cancéreuses se développent. Dans le cas des lésions cancéreuses, des types d'HPV ont été identifiés et sont considérés à « hauts risques » oncogéniques ; c'est le cas des HPV 16 et 18 qui sont retrouvés dans plus de 90% des cancers des voies aérodigestives supérieures, 70% des cancers du col de l'utérus et du vagin et dans plus de 50% des cancers de la vulve et du pénis. Une fois les cellules infectées, l'HPV est sous forme épisomale (génomme circulaire qui n'est pas intégré à l'ADN de la cellule hôte) et la réplication du virus est assurée par les protéines E1 et E2 qui utilisent la machinerie transcriptionnelle des cellules hôtes. Ceci

permet l'expression des protéines E6 qui vont inactiver p53 (rôle critique dans l'induction de l'apoptose et dans l'arrêt du cycle cellulaire) et E7 qui vont interagir avec pRB ; cette interaction va lever l'inhibition que pRB exerce sur le facteur de transcription E2F qui cible le gène E2F1 et ainsi stimuler le cycle cellulaire. Ces mécanismes concourent à l'immortalisation cellulaire et à l'apparition de lésions cancéreuses. La protéine E5 a quant à elle la capacité de diminuer l'expression du CMH I participant ainsi à l'échappement immunitaire des cellules infectées. Les protéines L1 et L2 forment la capsid du virus, la protéine L1 est très conservée entre les différents types d'HPV et la protéine L2 est capable d'interagir avec de nombreuses protéines cellulaires durant la phase d'infection par l'HPV.

5.3. Modèles et travaux précliniques

5.3.1. Les modèles murins

Des modèles précliniques syngéniques des tumeurs des voies aérodigestives supérieures greffées en sous-cutané ont été développés à partir de tumeurs des CEVADS murines^{260,261}. Ces modèles sont reproductibles et facilement greffés mais ils possèdent des limites : les tumeurs ne sont pas localisées dans leur microenvironnement d'origine (à la différence des modèles orthotopiques) et par conséquent les interactions des cellules tumorales avec le stroma sain entraînent des modulations dans le développement tumoral ainsi que dans la réponse immunitaire vis-à-vis de la tumeur. Il existe également des modèles tumoraux dérivés de lignées tumorales humaines greffés sur des animaux athymiques (xénogreffe)²⁶² qui peuvent être intéressants pour étudier le développement tumoral (métastases, atteintes ganglionnaires) mais ces modèles ne permettent pas l'étude des réponses lymphocytaires T²⁶³.

A ce jour, il existe trois modèles syngéniques orthotopiques murins pour les tumeurs de la sphère ORL :

- 1) Des cellules SCC VII (dérivées de tumeurs spontanées de cancers épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures chez des souris C3H) sont injectées dans le plancher buccal de souris C3H²⁶⁴.

2) Des cellules épithéliales d'amygdales de souris C57Bl/6 ont été greffées dans la cavité buccale après avoir été transfectées avec de l'ADN complémentaire d'E6, E7 et de H-ras, induisant ainsi leur immortalisation²⁶⁵.

3) Des cellules épithéliales TC-1 dérivées des poumons de souris C57Bl/6 transfectées par les gènes codant pour l'oncogène c-H-ras et pour les protéines de l'HPV, E6 et E7²⁶⁶ ont été injectées dans la muqueuse de la cavité orale²⁶⁷.

Ces modèles sont intéressants parce qu'ils peuvent mimer la localisation anatomique des tumeurs d'une part, mais aussi parce qu'ils possèdent des antigènes tumoraux permettant d'étudier les réponses immunitaires anti-tumorales. Toutefois il existe des limitations à ces modèles parmi lesquelles la difficulté d'accès des zones anatomiques pour la greffe tumorale, la difficulté du suivi des tumeurs qui nécessite d'utiliser des techniques d'imagerie et la rapidité de la progression tumorale qui provoque une mortalité très élevée dans ces modèles (perte de poids, impossibilité de se nourrir et de s'hydrater).

Enfin, il existe des modèles transgéniques qui développent spontanément des tumeurs des CEVADS ; ils reposent sur des mutations (allèle K-ras-G12D ; p53 KO conditionnel ; myrAKT et Trp53 KO conditionnel ; transgène E6-E7) associées au promoteur de la kératine 5 ou 14, protéines présentes dans l'épithélium muqueux de la cavité orale²⁶⁸⁻²⁷¹. Ces modèles sont intéressants parce que la cinétique d'apparition des tumeurs est plus lente et la mise en place du microenvironnement est plus physiologique que chez les modèles greffés. En revanche ces modèles possèdent des transgènes peu ou non physiologiques et ils n'exploitent qu'une voie métabolique de développement cancéreux alors que les processus de la cancérogénèse sont multifactoriels. Pour finir, ces modèles nécessitent plusieurs mois d'attente et les souris transgéniques ne développent pas toutes des tumeurs ce qui en font des modèles difficilement exploitables malgré leurs avantages.

5.4. Le traitement des patients

5.4.1. Les vaccins prophylactiques

En 2006 la société Merck & Co. obtient l'autorisation de mise sur le marché d'un vaccin prophylactique (Gardasil) qui protège contre les infections d'HPV 16, 18, 6 et 11 via l'induction

d'anticorps spécifiques provoquant la neutralisation des virus avant l'infection. Un second vaccin (Cervarix) commercialisé en 2007 par la société GlaxoSmithKline ciblant les HPV 16 et 18 permet également d'éviter l'infection. Ces deux vaccins sont efficaces lorsque les patients n'ont pas été infectés par les virus ; en revanche, ils sont inefficaces chez les patients déjà infectés²⁷². La réponse anticorps cible spécifiquement les protéines L1 de l'HPV mais ces vaccins n'induisent pas de réponse LT-CD8⁺ nécessaire à l'élimination des cellules infectées. De plus le taux de couverture vaccinale est faible, le coût des vaccins est élevé et tous les pays ne recommandent pas la vaccination des femmes et des hommes mais souvent que des femmes comme c'est le cas en France bien que les mentalités commencent à évoluer. En effet, ces vaccins sont indiqués pour lutter contre les cancers du col de l'utérus mais les virus HPV sont également responsables de nombreux cancers des VADS comme discuté dans le chapitre **5.1**. ce qui n'est pas pris en compte dans l'indication de vaccination de tous les pays ; de plus, la vaccination des hommes contribuerait à la limitation de la transmission de l'HPV²⁷³.

5.4.2. La radiothérapie, la chimiothérapie, la chirurgie

La prise en charge des patients atteints de cancers des VADS est délicate de par la localisation du cancer qui peut provoquer des dégradations de l'aspect physique des patients ainsi que des incapacités fonctionnelles (phonation, fonctions respiratoires, déglutition). Parmi les traitements disponibles pour lutter contre ces cancers la radiothérapie ciblée fractionnée est souvent envisagée comme traitement principal ; mais il est possible dans certains cas de l'associer à la chirurgie ou à la chimiothérapie (radiochimiothérapie). La chimiothérapie consiste à injecter des molécules cytotoxiques (parfois plusieurs chimiothérapies sont associées) destinées à tuer les cellules tumorales. La chirurgie est le traitement de première intention de ces cancers lorsqu'elle est possible mais ce type de chirurgie peut-être mutilante (glossectomie, pharyngectomie, laryngectomie, laryngopharyngectomie). Cependant il est possible dans certains cas d'effectuer des chirurgies partielles alors plus conservatrices (ablation d'une corde vocale, ablation d'une partie du larynx associée à une reconstruction). Ces chirurgies sont très souvent associées à un curage ganglionnaire puisqu'il est fréquent que les ganglions soient atteints dans ces cancers.

5.5. Les essais cliniques de vaccination thérapeutique contre HPV

Depuis quelques années, nombre d'essais cliniques cherchent à induire une protection thérapeutique contre les cancers associés à l'HPV. Ces vaccins sont pensés de façon à induire des réponses LT-CD4⁺ et LT-CD8⁺ dirigées contre des peptides dérivés des protéines E6 et/ou E7 de l'HPV nécessaires à l'immortalisation des cellules. En ciblant spécifiquement ces protéines, les LT seraient capables de contrôler les cellules infectées et de les tuer. Plusieurs types de vaccins ont été développés et testés : les vecteurs viraux recombinants, les protéines de fusions, les transferts de DC, des bactéries atténuées et les polypeptides²⁷⁴. Les essais cliniques adoptant une stratégie d'immunisation basée sur des vecteurs recombinants dérivés du virus de la vaccine codant pour des antigènes E6 et E7 ont montré de faibles réponses LT-CD8⁺ spécifiques des antigènes (5 patients répondeurs sur 44 patients traités) ; les réponses cliniques associées n'ont pas permis de conclure à une efficacité thérapeutique bien qu'un récent travail sur quelques patientes atteintes d'un cancer du col de l'utérus de stade 2 ou 3 ait suggéré que cette immunothérapie induit des réponses immunitaires spécifiques localisées au niveau de la tumeur mais non décelables par l'intermédiaire des cellules circulantes du sang²⁷⁵⁻²⁸⁰. Une autre stratégie d'immunisation consiste à lier de façon covalente une protéine HSP (Heat Shock Protein 65) à la séquence entière de la protéine E7 d'HPV par l'extrémité C-terminale et à observer les réponses cliniques chez des patientes atteintes de dysplasie du col de l'utérus ou anale ; ces essais n'ont pas permis de démontrer une efficacité clinique chez ces patientes. Un autre essai clinique a consisté à injecter chez des patientes atteintes de cancers du col de l'utérus 5 à 15 millions de DC pulsées avec la protéine E7 d'HPV 16/18 ; cet essai de phase I a montré qu'il n'y avait pas de toxicité associée et a souligné une réponse LT-CD8⁺ spécifique chez 8 patientes sur 10. Malgré des résultats intéressants, ces essais cliniques datent de 7 ans et la phase II de cette étude n'a pas été publiée à ce jour²⁸¹. Un essai clinique très récent se base sur un Lactobacille atténué exprimant une protéine E7 modifiée qui a été administré *per os* à des patientes atteintes de cancers du col de l'utérus de stade 3 et a été capable d'induire des LT-CD8⁺ spécifiques intratumoraux et une amélioration clinique de 70% des patientes, passant d'un stade 3 à un stade 2²⁸². La vaccination par des polypeptides

restreints par le CMH I et II dérivés des protéines E6 et E7 développée par le groupe de C. Melief a permis d'induire des réponses LT-CD8⁺ et LT-CD4⁺ spécifiques des protéines E6 et E7²⁸³. Ce vaccin testé cliniquement a permis de montrer une efficacité clinique chez des patientes qui présentaient des lésions précancéreuses vulvaires ; plus les lésions étaient petites, plus l'immunothérapie était efficace²⁸⁴. En revanche, lorsqu'il s'agissait de patientes atteintes de cancers invasifs du col de l'utérus, cette immunothérapie n'a montré qu'une seule réponse clinique parmi 50 patientes²⁸⁵. Une récente immunothérapie par deux plasmides ADN exprimant E6 et E7 injectés par voie intramusculaire suivie d'une électroporation *in vivo* chez 18 patientes présentant des tumeurs du col de l'utérus de stade 2 ou 3 a montré des réponses CTL spécifiques mais n'a pas mis en évidence de réponse clinique ; un essai clinique de phase 2 va tenter de démontrer l'efficacité clinique de cette approche²⁸⁶. Il faut noter qu'un essai clinique de phase 2 utilisant un vaccin basé sur des longs peptides dérivés d'antigènes de cancers des testicules a été testé sur 37 patients atteints de cancers des VADS avancés et/ou métastatiques et a montré une réponse immunitaire CTL spécifique contre certains des antigènes associée à une meilleure survie (4,9 mois contre 3,5 mois). Parmi ces cancers il est à noter que le statut HPV a été vérifié chez 28 patients dont 27 étaient HPV négatifs, les auteurs suggèrent qu'il n'y a pas de corrélation entre l'infection par l'HPV et l'effet de la vaccination²⁸⁷.

À ce jour, aucun vaccin thérapeutique ciblant l'HPV n'a démontré d'efficacité clinique évidente ; il n'existe par ailleurs aucun vaccin thérapeutique testé cliniquement contre les cancers des VADS liés à l'HPV.

Objectifs

Ce travail de thèse de doctorat a été divisé en trois objectifs distincts :

- 1) Évaluation de l'intérêt d'associer la radiothérapie à une immunothérapie dans un modèle murin de cancer ORL et identification des mécanismes impliqués dans la réponse à cette combinaison.

- 2) Optimisation d'une nouvelle stratégie d'immunisation pour induire des réponses immunitaires anti-tumorales dans la sphère muqueuse ORL et pulmonaire. Pour cet objectif, nous avons comparé différentes voies d'immunisations (muqueuses et non muqueuses) et utilisé un antigène libre ou vectorisé par un vecteur ciblant les DC. Nous avons ensuite cherché à comprendre les mécanismes à l'origine du succès de cette nouvelle approche vaccinale dans un contexte tumoral.

- 3) Caractérisation des populations lymphocytaires muqueuses induites par notre vaccination thérapeutique muqueuse et démonstration de leur rôle dans la protection tumorale.

Résultats

Préambule sur les vaccins reposant sur STxB et utilisé dans les 3 articles.

Notre équipe a développé en collaboration avec l'équipe de L. Johannes à l'Institut Curie un vecteur vaccinal à partir de la toxine de Shiga produite par *Shigella dysenteriae*. Cette toxine est composée de deux sous unités, la sous unité A qui est toxique via l'inhibition de la synthèse protéique au niveau ribosomal et la sous unité B non toxique (STxB) qui se lie spécifiquement au récepteur globotriaosylcéramide (Gb3) préférentiellement exprimé par les DC²⁸⁸. La liaison de STxB à ce récepteur permet son transport rétrograde vers le réticulum endoplasmique puis sa rétrotranslocation dans le cytosol. Dans les DC, STxB peut également emprunter la voie endosomale. Il a été montré que STxB ciblait des antigènes qui lui étaient couplés vers la voie de présentation restreinte par le CMH de classe I^{288,289}. Ces résultats expliquent la capacité de ce vecteur couplé à différents antigènes d'induire des réponses LT-CD8⁺ in vivo contre des peptides dérivés de ces antigènes ainsi que des réponses LT-CD4⁺ et humorales^{236,289,290}. Plus récemment, une synergie a été observée dans l'induction de LT-CD8⁺ lors de l'administration de STxB couplé à un antigène et de l'adjuvant α -Galactosylcéramide (α -GalCer)²⁹¹. L' α -GalCer à l'origine est une molécule extraite des éponges marines qui se lie au CD1d (qui est une molécule apparentée au CMH I) présent sur les NKT invariants (iNKT) ; cette association induit une sécrétion cytokinique typique Th1 et Th2 ainsi que la maturation des DC. Son association à STxB permet de réduire les doses du vaccin nécessaires pour induire un grand nombre de LT-CD8⁺ spécifiques²⁹¹. De façon intéressante, il existe une faible réponse humorale contre STxB après des administrations répétées du vaccin. Ces anticorps induits ne sont pas neutralisants et n'interfèrent pas avec l'efficacité du vaccin²⁹¹.

Nous avons ainsi couplé STxB à différentes protéines ou à un long peptide dérivé de E7 (STxB-E7) et montré sa capacité à induire de fortes réponses LT-CD8⁺ et à protéger des souris contre la croissance tumorale ou contre une infection virale^{33,236,291}.

Premier travail : Synergie entre radiothérapie et vaccin dans le traitement des cancers de la sphère ORL associés à l'HPV

Article publié dans le journal Molecular Cancer Therapeutics ; Impact Factor 2013 = 6,107 ; Rank Oncology = 23/203-Q1

Titre original : Synergy of radiotherapy and a cancer vaccine for the treatment of HPV-associated head and neck cancer

La radiothérapie est l'un des traitements principaux des patients atteints de cancers des voies aérodigestives supérieures. En dehors du vaccin thérapeutique Provenge dans les cancers de la prostate²⁹², les autres vaccins anti-tumoraux n'ont pas encore démontré leur efficacité clinique dans des essais de phase III randomisés. Parallèlement, la radiothérapie influe sur le microenvironnement tumoral induisant un recrutement de cellules inflammatoires et immunitaires²⁹³. Nous nous sommes d'abord demandés si la radiothérapie pouvait améliorer l'efficacité de notre vecteur vaccinal STxB-E7. Pour cela nous avons développé un modèle de tumeur de la langue que nous pouvons suivre par bioluminescence *in vivo* qui exprime l'antigène E7 de l'HPV16 (cellules TC1/Luc). Dans une première expérience nous avons montré, dans un modèle thérapeutique, que la vaccination intrapéritonéale (ip) par STxB-E7 associée à une dose d'irradiation locale de 7,5 Gy (délivrée en une fois ou de façon fractionnée) (STxB-E7 + IR) induisait une diminution de la taille tumorale et une amélioration de la survie des souris par rapport à des groupes traités par STxB-E7 seul ou uniquement par irradiation (IR). Ce résultat met en évidence l'efficacité thérapeutique de l'association de la radiothérapie et de notre immunothérapie. Nous avons ensuite montré que les tumeurs des souris traitées par la combinaison radiothérapie et immunothérapie étaient plus infiltrées par des LT-CD8⁺ spécifiques que les autres groupes. De plus, cette infiltration par des LT-CD8⁺ est corrélée à la taille tumorale et est absolument nécessaire à la régression tumorale. En effet, une élimination de ces LT-CD8⁺ à l'aide d'un anticorps abolit l'effet anti-tumoral de la combinaison STxB-E7 et radiothérapie.

Les souris guéries par la combinaison STxB-E7 et radiothérapie ont ensuite été regreffées par les cellules TC1/Luc 3 mois ou 18 mois après la première greffe tumorale sans

aucun traitement associé. Les souris résistaient toutes à ce nouveau challenge tumoral et ne développaient pas de tumeurs. Pour compléter cette expérience et montrer une mémoire pas seulement locale mais aussi systémique à distance de la tumeur primaire, les cellules tumorales (TC1/Luc) ont été injectées en intraveineuse pour permettre le développement de métastases pulmonaires. Toutes les souris sont également protégées du développement de métastases pulmonaires. Ces résultats indiquent que la combinaison radiothérapie et STxB-E7 induit une mémoire immunitaire LT-CD8⁺ possiblement responsable du contrôle de la croissance tumorale à la fois locale et à distance du site primaire. Afin de comprendre les mécanismes expliquant la synergie de cette combinaison, nous avons montré que celle-ci modifiait l'architecture et la fonctionnalité des vaisseaux. Ainsi, les groupes traités par STxB-E7 + IR présentent une augmentation significative du nombre de péricytes qui sont des régulateurs clés du remodelage vasculaire par rapport aux autres groupes. Cette augmentation des péricytes est caractéristique de la normalisation vasculaire. En effet, les vaisseaux associés à la néoangiogenèse tumorale sont tortueux et anormaux avec une perte du recouvrement des cellules endothéliales par les péricytes et une rupture de la membrane basale. Ces anomalies expliquent une perte de la fonctionnalité de ces cellules et une perfusion peu efficace responsable d'un état hypoxique^{37,294}. La réversion de cet état est appelé « normalisation vasculaire ». Dans notre modèle, nous avons confirmé qu'après traitement par STxB-E7 et radiothérapie, il existe une augmentation de la perméabilité et de la perfusion des tissus. En parallèle à ces phénomènes, notre combinaison thérapeutique permet une activation des vaisseaux (induction de la molécule ICAM-1) qui pourrait faciliter l'infiltration des LT-CD8⁺. Ces résultats suggèrent donc que la combinaison STxB-E7/radiothérapie induit une normalisation vasculaire et une activation des cellules endothéliales qui pourraient expliquer l'augmentation du recrutement et l'infiltration des LT-CD8⁺ au sein des tumeurs.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

Second travail : Le phénotype muqueux des lymphocytes T CD8⁺ induit après vaccination est crucial pour contrôler la croissance des tumeurs muqueuses

Article publié dans le journal Science Translational Medicine ; Impact Factor 2013 = 14,414 ; Rank Medicine, Research & Experimental = 3/124-Q1

Titre original : Mucosal imprinting of vaccine-induced CD8⁺ T cells is crucial to inhibit the growth of mucosal tumors

Suite à ce premier travail, nous avons voulu comprendre pourquoi la vaccination thérapeutique avec STxB-E7 par voie intramusculaire (IM) sans irradiation associée était peu efficace pour contrôler les tumeurs orthotopiques de la sphère ORL et nous avons cherché à améliorer la réponse immunitaire induite par STxB-E7²⁹⁵.

Des travaux antérieurs avaient montré que des vaccins anti-cancers reposant sur STxB administrés par voie sous-cutanée ou IM étaient capables de contrôler des tumeurs greffées en sous cutanée^{33,236}. Dans le domaine des maladies infectieuses, il est connu que les vaccins administrés par voies muqueuses induisent de meilleures réponses immunitaires muqueuses capables de mieux protéger vis-à-vis de pathogènes de localisations muqueuses¹²⁹. Comme les tumeurs de la sphère ORL sont des tumeurs muqueuses nous nous sommes demandés si une vaccination thérapeutique par voie muqueuse intranasale (IN) était capable d'induire de meilleures réponses anti-tumorales que la vaccination intramusculaire systémique.

Pour cela nous avons dans un premier temps montré que la vaccination IN avec STxB-E7 induit des LT-CD8⁺ spécifiques fonctionnels dans la rate et dans le compartiment muqueux (lavages broncho-alvéolaires, ganglions médiastinaux) alors que la voie d'immunisation IM n'induit que des réponses LT-CD8⁺ spécifiques fonctionnelles dans la rate. STxB-E7 est d'ailleurs plus efficace que le polypeptide E7 non vectorisé pour induire des réponses muqueuses ou systémiques.

Dans un second temps nous avons montré que cette immunisation IN prophylactique (Prime Jour 0 par STxB-E7 + α -GalCer – Boost Jour 14 par STxB-E7) permettait de protéger les souris contre une greffe de cellules tumorales dans la muqueuse sublinguale alors que la voie

IM ne permettait pas une protection aussi efficace. Dans un modèle thérapeutique (greffe – Prime J5 – Boost J10) beaucoup plus agressif, la voie d’immunisation IN a permis de protéger 100% des souris alors que la voie IM en a protégé moins de 30%. Ces résultats ont également été validés dans un modèle de tumeur pulmonaire.

Afin d’aller plus loin dans la compréhension des mécanismes de cette protection tumorale induite par la vaccination IN nous avons mis en évidence la présence de LT-CD8⁺ intratumoraux *in situ* suite à une vaccination muqueuse intranasale, alors qu’après vaccination IM les LT-CD8⁺ sont localisés en périphérie de la tumeur mais ne l’infiltrent pas. De plus le nombre de LT-CD8⁺ spécifiques intratumoraux après vaccination IN est 40 fois plus élevé. L’élimination des LT-CD8⁺ par des anticorps déplétant abolit complètement l’effet anti-tumoral de la vaccination muqueuse indiquant un rôle majeur de ces cellules dans la protection observée.

Nous avons ensuite montré que le CD49a et le CD103 sont surexprimés par les LT-CD8⁺ des lavages bronchoalvéolaires (LBA) après vaccination IN alors qu’ils ne le sont pas par les LT-CD8⁺ spécifiques systémiques (rate). Le CD49a est également surexprimé par les LT-CD8⁺ spécifiques intratumoraux. Nous avons donc neutralisé (anticorps bloquants) les molécules CD103⁺ ou les molécules CD49a⁺ dans notre modèle thérapeutique tumoral ; les souris traitées par l’anticorps anti-CD49a ont montré une diminution de l’infiltration des LT-CD8⁺ au sein des tumeurs qui était corrélée à une diminution de la survie indiquant que le CD49a pourrait être nécessaire à la migration intratumorale ou à la rétention intratumorale des LT-CD8⁺. Malgré une expression élevée de CD103 sur les LT-CD8⁺ spécifiques nous n’avons pas noté de différence de survie en bloquant cette molécule ; l’explication pourrait résider dans le fait que notre modèle tumoral n’exprime pas la E-Cadhérine, le ligand de CD103. Il est intéressant de noter que la voie d’immunisation IN protège aussi bien contre les tumeurs sous-cutanées que la voie IM, mais que les LT-CD8⁺ spécifiques intratumoraux de ces tumeurs sous-cutanées n’expriment pas le CD49a. Nous avons montré que cette expression de CD49a à la surface des LT-CD8⁺ est dépendante des DC. En effet seules les DC des poumons de souris immunisées par voie IN avec STxB-OVA ont permis d’induire le CD49a sur les LT-CD8⁺ spécifiques de OVA alors que les DC de la rate prélevées après une immunisation par STxB-OVA par voie IM ne présentaient pas cette propriété.

Finalement, nous avons montré que les tumeurs muqueuses sont plus infiltrées en LT-CD8⁺ CD49a⁺ que les tumeurs non muqueuses chez l'Homme indiquant que nos résultats pourraient être extrapolés pour les tumeurs humaines.

Ces résultats permettent de mettre en évidence pour la première fois l'importance d'induire une immunité locale muqueuse anti-tumorale pour protéger contre une tumeur muqueuse et le rôle de la voie d'immunisation pour l'obtention de cette réponse muqueuse. Nous avons également montré que l'intégrine CD49a joue un rôle dans cette réponse anti-tumorale et que l'induction d'expression de cette intégrine est dépendante des DC muqueuses.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

Troisième travail : Les lymphocytes T CD8⁺ résidents mémoires jouent un rôle majeur dans la protection anti-tumorale

« Article en cours de préparation »

Titre en anglais : Tissue-resident memory T cells play a major role in tumor protection

Auteurs : Mevyn Nizard et al.

Effector T lymphocytes (Teff) are classically considered as the main actors of antitumoral immune response. Here we show for the first time the critical role of tissue-resident memory T cells (Trm) in the protection against orthotopic tongue tumor challenge after STxB-E7 immunization. A transcriptional and a flow cytometric analysis confirmed the presence of Trm in broncho alveolar lavages characterized by the expression of CD49a and CD103. Inhibiting the ability of CD8⁺T cells to migrate to tissues using FTY720 treatment showed a critical role of Trm and not circulating CD8⁺ T cells for anti-tumor effect. Neutralizing transforming growth factor- β (TGF- β) antibody elicited a decrease of Trm induction in vivo associated with reduced tumor protection. Parabiosis experiments showed that circulating T cells alone were not able to trigger tumor protection. Together, this results highlight for the first time the critical role of Trm in anti-tumor response, and refine the characterization of this T cell subset. Finally, the Trm might be used as a new surrogate markers of clinical and preclinical therapeutic vaccines.

Résumé :

Les lymphocytes T effecteurs sont classiquement considérés comme les acteurs principaux des réponses immunitaires anti-tumorales. Nos travaux montrent que les

lymphocytes T résidents mémoires (Trm) ont un rôle majeur dans la protection contre des tumeurs TC1 orthotopiques de la langue après vaccination par STxB-E7. En effet, une analyse transcriptomique a montré la présence de Trm dans les lavages broncho-alvéolaires de souris immunisées et l'analyse par cytométrie en flux nous a permis de définir ces Trm par les marqueurs CD103 et CD49a. L'inhibition de la migration des LT-CD8+ dans les tissus par le FTY720 montre que les souris sont toujours protégées après vaccination muqueuse et ce uniquement grâce aux Trm en l'absence d'afflux de LT circulants. Par ailleurs nous avons modulé négativement le nombre de Trm in vivo par un traitement avec un anticorps anti-TGF- β (Transforming Growth Factor- β) et montré que la diminution des Trm était corrélée à une plus faible protection anti-tumorale. Par ailleurs, grâce à des expériences de parabioses, nous avons montré que les LT circulants ne permettent pas de protéger seuls contre une tumeur. Nos résultats mettent en avant pour la première fois le rôle des Trm dans la protection tumorale et complètent la caractérisation de ces cellules. Ils ouvrent également la voie vers de nouveaux biomarqueurs de l'efficacité clinique et préclinique des vaccins thérapeutiques.

Matériels et Méthodes

Transcriptome

Des souris C57BL/6 ont été immunisées par STxB-E7 (20µg) + α-GalCer (2µg) par voie IN ou IM puis immunisées une seconde fois par STxB-E7 (20µg) 14 jours après (prime-boost). Sept jours après la seconde immunisation, les LBA ou les rates des souris ont été récupérés et les LT-CD8⁺tet⁺CD44^{hi} ont été triés par trieur de cellules BD FACSAria II, l'ARN des cellules a été extrait grâce au kit QIAGEN® RNeasy Plus Micro Kit puis génotypé par puce à ADN (Affymetrix) par la plateforme de génomique et transcriptomique de l'Institut Cochin. Les données ont été normalisées grâce à Bioconductor par un algorithme RMA. Les analyses statistiques ont été faites grâce au logiciel Partek®GS. Dans un premier temps, les variations dans l'expression génique ont été analysées par regroupement hiérarchique non supervisé. Une analyse « one way ANOVA » pour chaque gène a été effectuée et appariée par un test de Tukey. Dans un second temps, nous avons utilisé la p-value et le fold change pour filtrer et sélectionner les gènes différentiellement exprimés. L'analyse fonctionnelle a été faite grâce au logiciel Ingenuity (Ingenuity® Systems, USA).

Parabiose

Des souris C57BL/6 ont été immunisées (prime-boost) puis la chirurgie est effectuée 7 jours après la seconde immunisation. Le protocole précis de parabiose est décrit dans l'article publié par Duyverman AM et collègues dans Nature Protocols²⁹⁶. Les étapes sont les suivantes :

- Les souris sont soigneusement rasées et la peau désinfectée à l'aide de Bétadine à usage vétérinaire
- Anesthésie générale (par un mélange de kétamine et de xylazine (100 mg kétamine/kg et 10 mg xylazine/kg) par voie intrapéritonéale) des deux souris (même âge, même poids) en parallèle
- Une ligne d'incision est faite à l'aide d'un marqueur permanent sur la peau des souris (même taille et opposée)

- Incision de la peau de la souris 1, seule la couche superficielle de la peau doit être séparée (la peau est disséquée du bas ventre jusqu'à la région dorsale de la souris)
- Une fois la peau disséquée ; à l'aide d'une pince et de ciseaux, une fine couche de muscles recouvrant les côtes d'environ 2 cm de long est récupérée. (maintien à l'aide de liquide physiologique des tissus ainsi que des yeux des souris afin d'éviter leur assèchement)
- La peau de la souris numéro 2 est disséquée de la même façon que la première (en laissant solidaire cette fois ci la peau du bas ventre)
- Les deux souris sont positionnées l'une en face de l'autre
- Le muscle de la souris 1 est suturé sur le muscle costal de la souris 2 à l'aide de sutures fines 7.0
- La peau est finalement recousue l'une à l'autre à l'aide d'agrafes Michel
- La moitié des agrafes seront retirées après une semaine, la seconde partie tombe seule
- Tous les protocoles, critères d'arrêts, problèmes sont minutieusement décrits dans l'article de Nature Protocols²⁹⁶.

Ce protocole a été soumis et approuvé par le comité d'éthique de Paris Descartes sous le numéro de projet 14-009.

Traitement anti-TGF- β

Les souris ont été traitées par un anticorps anti-TGF- β (BioXcel) ou son isotype par voie intrapéritonéale. Les souris sont immunisées par STxB-E7 + α -GalCer et traitées par 200 μ g d'anticorps anti-TGF- β le même jour, puis traitées 3 fois par semaines à raison de 100 μ g d'anticorps par injection. Les souris sont ensuite immunisées une seconde fois par STxB-E7 puis traitées avec 200 μ g d'anti-TGF- β puis traitées 3 fois la semaine qui suit le boost à raison de 100 μ g par injection. Le traitement a été arrêté une semaine après le boost des souris dans tous les cas.

Traitement FTY720

Le FTY720 (Cayman Chemical) a été injecté aux souris par voie intrapéritonéale tous les jours à partir de la veille de la greffe tumorale à 0,5 mg/kg/souris/jour. La lymphopénie sanguine a été vérifiée par mesure des lymphocytes totaux grâce à un automate Hemavet 950 FS (Drew Scientific).

1. Les LT-CD8⁺tet⁺ des LBA ont un phénotype de LT résidents mémoires

Nous avons montré dans le modèle de vaccination intranasale par STxB-E7 que les LT-CD8⁺ spécifiques des antigènes localisés au site de la tumeur sont nécessaires à la régression tumorale. Les dogmes actuels considèrent les T_{eff} comme les acteurs majeurs de la réponse anti-tumorale. Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes de cette immunité anti-tumorale, nous avons trié les LT-CD8⁺ mémoires spécifiques (Tet⁺CD8⁺CD44^{hi}) des LBA après immunisation prophylactique par voie intranasale et les LT-CD8⁺ mémoires spécifiques (Tet⁺CD8⁺CD44^{hi}) de la rate après immunisation par voie intramusculaire. Nous avons extrait l'ARN de ces cellules et effectué une analyse transcriptomique de ces deux populations cellulaires. Nous avons ensuite effectué une analyse comparative afin de mettre en évidence les différences d'expressions géniques entre ces deux populations. Le phénotype des LT-CD8⁺ mémoires des LBA présentait de grandes similitudes avec celui des Trm décrit par Mackay et ses collègues¹⁷⁵. Le **tableau 1** montre l'expression différentielle statistiquement significative entre les gènes des LT-CD8⁺ des LBA par rapport aux gènes exprimés par les LT-CD8⁺ mémoires de la rate et spécifiques du même antigène ; parmi les gènes surexprimés des LT-CD8⁺ du LBA on retrouve : le *CD103* (*itgae*), le *CD49a* (intégrine $\alpha 1\beta 1$ – *itga1* (intégrine alpha 1) et *itgb1* (intégrine beta 1)), le *CD69*, le *TGF- β 1*, les *Gzm b* et *k*, l'*IFN- γ 1* ; le gène *s1pr1* est par contre sous exprimé dans cette population. Nous avons précédemment observé une augmentation d'expression du CD49a et du CD103 par cytométrie, ce que confirme cette analyse. Le fait que le CD49a soit un marqueur de survie à long terme²⁹⁷, qu'il ait été montré comme étant un marqueur de Trm dans le cerveau¹⁸⁴ et enfin, qu'il soit très significativement présent sur les LT-CD8⁺ des LBA par rapport aux LT-CD8⁺ de la rate (*itga1* : p-value = 0,00039 avec une différence d'expression génique (fold-change) de 10,2 et *itgb1* : 0,00019 avec un fold-change de 2) nous a incité à considérer le CD49a comme un marqueur des Trm des LBA. Nous avons donc vérifié l'expression par les cellules des LBA du CD49a et du CD103 (qui est le marqueur classiquement utilisé pour identifier les Trm) parmi les LT-CD8⁺ spécifiques. Les LT-CD8⁺ des LBA exprimaient effectivement ces deux marqueurs (**Figure 1 A.**).

Symbole	p-value (IN vs. IM)	Fold-Change (IN vs. IM)	Description
<i>Cdh1</i>	8.37601e-006	9.78007	cadherin 1
<i>Cd244</i>	0.0351428	2.30112	CD244 natural killer cell receptor 2B4
<i>Itga1</i>	0.000394506	10.234	integrin alpha 1
<i>Skil</i>	0.000191129	2.69014	SKI-like

<i>Litaf</i>	0.00816968	3.98691	LPS-induced TN factor
<i>Chn2</i>	0.0254657	3.24576	chimerin (chimaerin) 2
<i>Inpp4b</i>	0.00733592	1.81802	inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II
<i>Itgae</i>	0.00783414	12.2342	integrin alpha E, epithelial-associated
<i>Rgs1</i>	0.000117565	7.13831	regulator of G-protein signaling 1
<i>Rgs2</i>	0.0112388	2.51599	regulator of G-protein signaling 2
<i>Itga4</i>	0.000100016	2.99929	integrin alpha 4
<i>Itgb1</i>	0.000186908	2.07827	integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)
<i>Nrp1</i>	0.000216547	6.04297	neuropilin 1
<i>L1cam</i>	0.000301622	2.89273	L1 cell adhesion molecule
<i>Itgav</i>	0.0029678	2.0298	integrin alpha V
<i>Itgax</i>	0.00504102	2.14555	integrin alpha X
<i>Ccl3</i>	0.0158177	6.5167	chemokine (C-C motif) ligand 3
<i>Ccr8</i>	0.0238727	7.81886	chemokine (C-C motif) receptor 8
<i>Cd69</i>	0.0441022	1.57301	CD69 antigen
<i>Gzmb</i>	0.0026725	4.70964	granzyme B
<i>Gzmk</i>	0.000717274	16.1893	granzyme K
<i>Ifngr1</i>	0.000902577	1.52844	interferon gamma receptor 1
<i>Tgfb1</i>	0.00298231	1.45522	transforming growth factor, beta 1
<i>Sema6d</i>	1.43154e-007	7.11534	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6D
<i>Qpct</i>	0.000723051	5.44708	glutaminyl-peptide cyclotransferase (glutaminyl cyclase)
<i>Klrc1</i>	0.00660027	2.44536	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1
<i>Fgf13</i>	0.000142502	-2.04061	fibroblast growth factor 13
<i>Slamf6</i>	0.00307283	-2.12131	SLAM family member 6
<i>Sidt1</i>	4.49924e-005	-2.63139	SID1 transmembrane family, member 1
<i>Rasgrp2</i>	4.96269e-005	-3.54737	RAS, guanyl releasing protein 2
<i>S1pr1</i>	0.000726345	-1.7019	sphingosine-1-phosphate receptor 1
<i>Cmah</i>	2.45047e-005	-2.79481	cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase
<i>Fam65b</i>	0.00368236	-1.54242	family with sequence similarity 65, member B
<i>Ly6c2</i>	0.00130726	-1.7496	lymphocyte antigen 6 complex, locus C2
<i>Ly6c1</i>	0.0395886	-2.23292	lymphocyte antigen 6 complex, locus C1

Tableau 1. Expression différentielle des gènes des LT-CD8⁺ spécifiques mémoires des LBA. Le tableau représente les gènes surexprimés ou sous-exprimés de façon statistiquement significative ($p < 0,05$) par les LT-CD8⁺ spécifiques mémoires des LBA induits après vaccination IN comparés à ceux exprimés par les LT-CD8⁺ spécifiques mémoires de la rate induits après vaccination IM. En orange les gènes surexprimés par les LT-CD8⁺ des LBA par rapport aux LT-CD8⁺ de la rate, en vert les gènes sous-exprimés par les LT-CD8⁺ des LBA par rapport aux

LT-CD8⁺ de la rate. Le « fold change » représente la différence de quantité entre les gènes des LT-CD8⁺ des LBA et des LT-CD8⁺ de la rate (si le gène X a un fold-change de 2 par rapport au gène Y, X est 2 fois plus exprimé que le gène Y ; si son fold change est de -2, X est 2 fois moins exprimé que Y). Ces gènes sont caractéristiques des Trm. Ces résultats de transcriptomiques ont été réalisés sur 2 expériences distinctes avec plus de 4 souris par groupe.

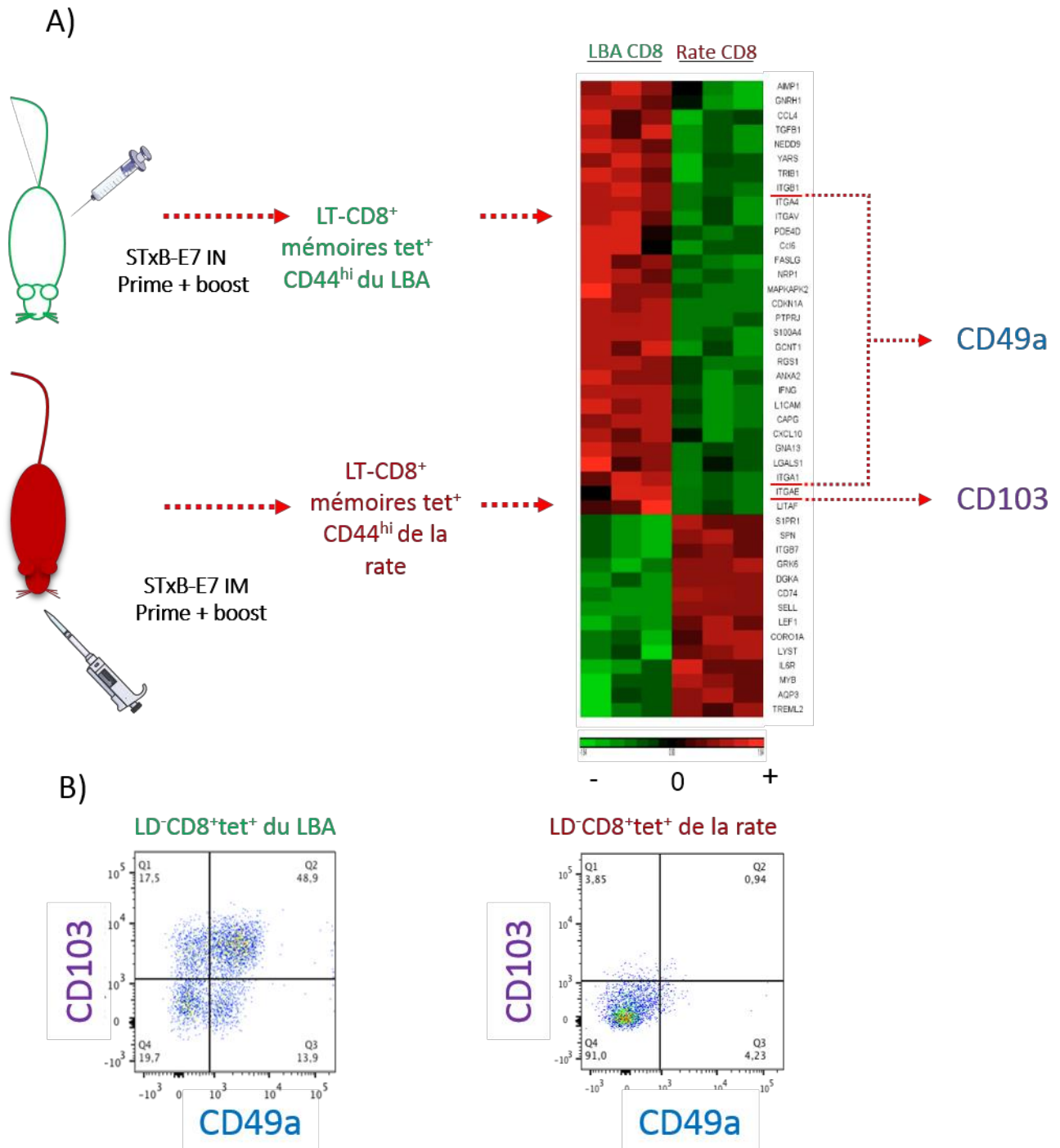


Figure 1. Mise en évidence des Trm du LBA. A. Les souris ont été immunisées par voie intranasale ou intramusculaire par STxB-E7 + α -GalCer à J0 (prime) et par STxB-E7 à J14

(boost). À J21 les lavages bronchoalvéolaires des souris immunisées par voie intranasale ont été récupérés ainsi que les rates des souris immunisées par voie intramusculaire. Les cellules ont été marquées par tétramère D^b-E7₃₉₋₄₇, et avec des anticorps anti-CD8 et anti-CD44 associé à un marqueur de mort cellulaire (Live/Dead). Les LT-CD8⁺Tet⁺CD44^{hi} ont été triés et l'ARN extrait. Une analyse transcriptomique a montré que les LT-CD8⁺ spécifiques d'antigène des LBA avaient un profil phénotypique caractéristique des Trm sur la Heat map (rouge = sur exprimé, vert = sous-exprimé) non retrouvé sur les LT-CD8⁺ mémoires spécifiques du même antigène de la rate. **B.** Dot-plots représentatifs des LT-CD8⁺ des LBA : les LT-CD8⁺Tet⁺ vivants des LBA et de la rate ont été analysés par cytométrie en flux et les marqueurs CD49a et CD103 sont bien exprimés sur les cellules des LBA mais pas sur les cellules de la rate. Les analyses transcriptomiques ont été effectuées sur trois échantillons de chacune des populations ; les analyses phénotypiques ont été réalisées sur plus de 10 LBA. Ces résultats ont été obtenus sur plus de 20 souris.

Les Trm des LBA sont donc CD8⁺tet⁺CD103⁺CD49a⁺; néanmoins les résultats phénotypiques montrent 4 populations de LT-CD8⁺ spécifiques ; la population CD49a⁺CD103⁻, la population CD49a⁻CD103⁺, la population CD49a⁺CD103⁺ et la population double négative CD49a⁻CD103⁻. Nous avons marqué la population double négative par le CD62L afin de déterminer si ces cellules étaient des Tem ou des Tcm. Les cellules LT-CD8⁺tet⁺CD49a⁻CD103⁻ sont CD62L⁻ donc présentent le phénotype des Tem (**Figure 2 A.**). Nous avons ensuite analysé ces quatre populations au cours du temps (J0, J7, J30, J90) sur les LT-CD8⁺tet⁺ des LBA après vaccination (prime – boost) (**Figure 2 B.**). Le nombre absolu de ces populations est représenté sur la **figure 2 C.** et **D.** Les souris non vaccinées ne présentent aucune population de LT-CD8⁺ dans les LBA. À J7 après le boost, les LT-CD8⁺tet⁺ étaient CD49a⁻CD103⁺, CD49a⁺CD103⁻, CD49a⁺CD103⁺ ou CD49a⁻CD103⁻. Il apparaît très clairement qu'à J7 les Trm les plus fréquents sont les Trm double positifs CD49a et CD103. De façon intéressante, le CD103 est présent à J7 mais n'est quasiment plus présent sur les LT-CD8⁺tet⁺ des LBA aux J30 et J90 ; en revanche, le CD49a est lui présent sur plus de 95% des LT-CD8⁺ spécifiques à J30 et J90. Aux vues de ces résultats, nous avons considéré les populations LT-CD8⁺tet⁺CD49a⁻CD103⁻, LT-CD8⁺tet⁺CD49a⁻CD103⁺ et LT-CD8⁺tet⁺CD49a⁺CD103⁺ comme des Trm. La population double négative LT-CD8⁺tet⁺CD49a⁻CD103⁻ a été définie comme Tem. La cinétique d'apparition et de contraction des Trm et des Tem dans le LBA est représentée en nombre absolu sur la **figure 2C.** et **D.** Il apparaît que la population de Trm diminue au court du temps, mais reste présente dans les LBA à J90. La population de Tem est présente dans les LBA au jour 7 mais en très faible nombre

et n'est plus détectable à J30 et J90 (**Figure 2D. et E.**). Les Trm représentent la population de LT-CD8⁺ majoritairement induite dans les LBA après immunisation muqueuse et celle qui persiste dans le temps dans notre modèle vaccinal.

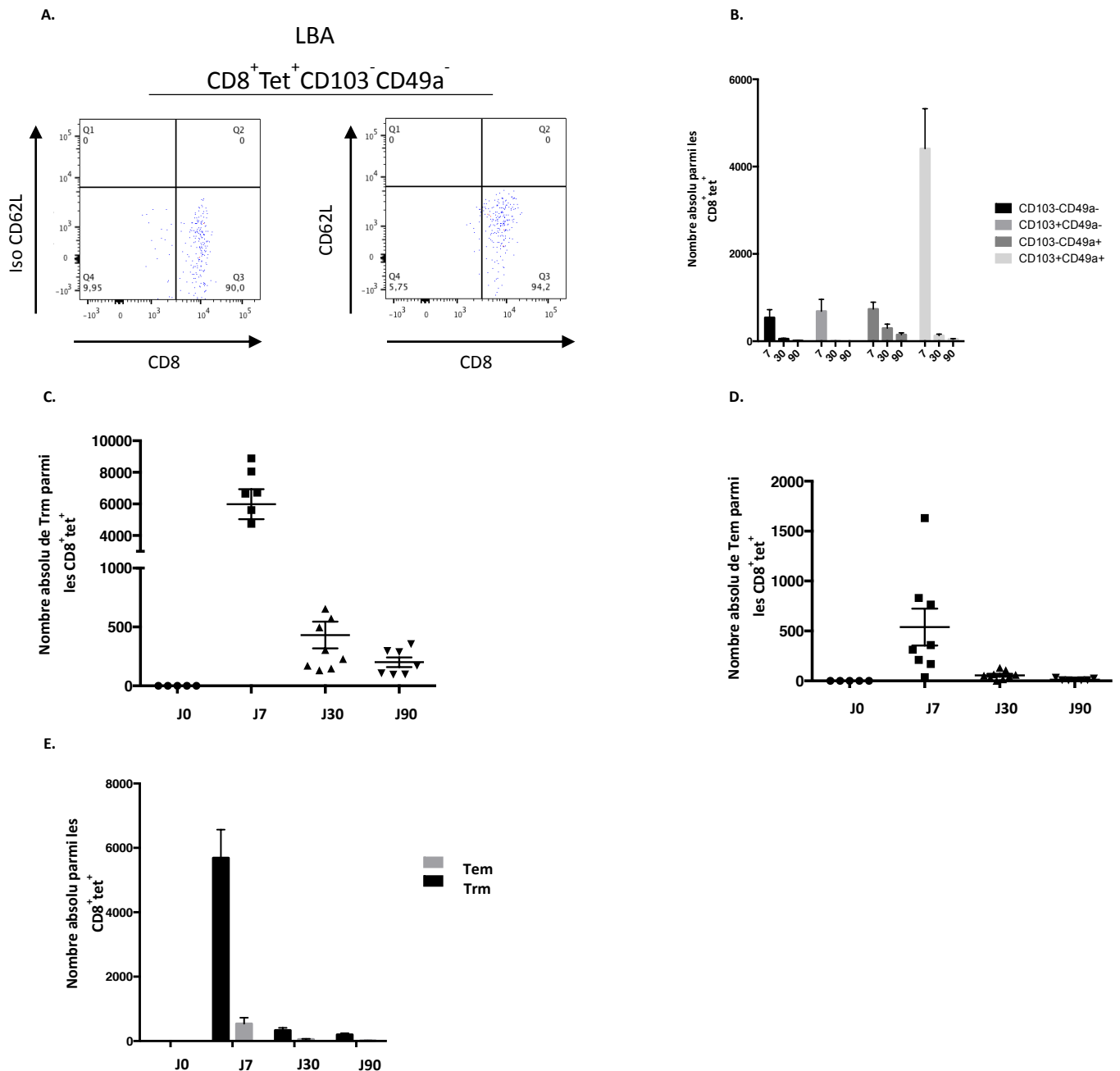


Figure 2. Cinétique d'apparition des Trm et Tem. Les souris ont été immunisées par STxB-E7 (prime – boost) en intranasal et les LBA recueillies **A.** Expression de CD62L par les populations vivantes LT-CD8⁺Tet⁺CD103⁻CD49a⁻ dans les LBA de souris 7 jours après l'immunisation ; cette population double négative est également CD62L⁻ ce qui correspond à la population de Tem.

B. Cinétique d'apparition en nombre absolu des quatre populations de LT-CD8⁺ spécifiques dans les LBA de souris naïves (J0) et des souris vaccinées 7, 30 et 90 jours après l'immunisation. (CD103⁻CD49a⁻ ; CD103⁺CD49a⁻ ; CD103⁻CD49a⁺ ; CD103⁺CD49a⁺) **C.** Cinétique d'apparition en nombre absolu des Trm dans les LBA de souris naïves (J0) et des souris vaccinées 7, 30 et 90 jours après l'immunisation. Les Trm correspondent aux trois populations LT-CD8⁺ spécifiques CD103⁺CD49a⁻ ; CD103⁻CD49a⁺ ; CD103⁺CD49a⁺. **D.** Cinétique d'apparition en nombre absolu des Tem dans les LBA de souris naïves (J0) et des souris vaccinées 7, 30 et 90 jours après l'immunisation. Les Tem correspondent à la population double négative CD8⁺Tet⁺CD103⁻CD49a⁻. **E.** Cinétique d'apparition en nombre absolu des Trm et des Tem au cours du temps. Chaque expérience a été reproduite 2 fois et comporte au minimum 6 souris.

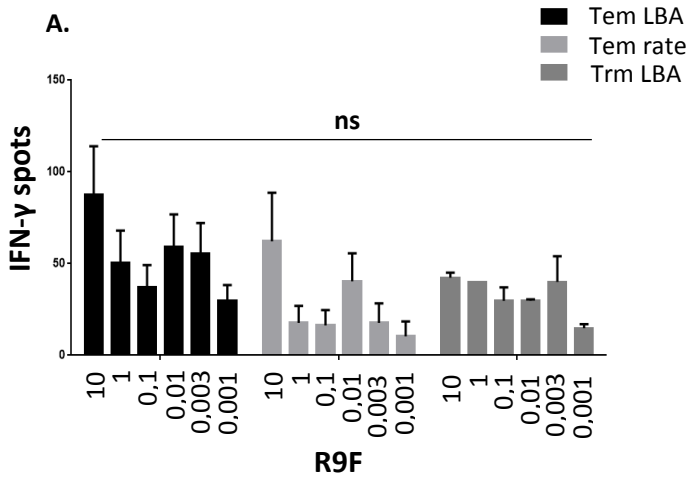
2. Fonctionnalité des LT résidents mémoires et rôle dans la protection anti-tumorale

Nous avons ensuite voulu vérifier la capacité des Trm à induire une protection anti-tumorale *in vivo*. Nous avons pour cela immunisé des souris (prime – boost) et récupéré les LBA à J7 après le boost, nous avons trié les Trm des LBA et les Tem de la rate et des LBA puis vérifié la sécrétion d'IFN- γ . Les deux populations sécrètent de l'IFN- γ reflétant leur fonctionnalité sans différence significative entre les Tem de la rate ou des LBA et les Trm des LBA (**Figure 3A.**) Il ne semble pas y avoir également de différence d'avidité entre ces deux populations (**Fig 3A.**). Nous avons par la suite immunisé des souris avec STxB-E7 par voie intranasale (prime – boost) puis nous avons greffé 50 000 TC1 dans la muqueuse sublinguale au jour 21. Pour cette expérience nous avons traité les souris par du FTY720 (0,5mg/kg/jour) dès le jour 20 ; cette molécule induit une diminution d'expression du S1PR1 par les lymphocytes responsables de leur rétention dans les ganglions et dans la rate ce qui empêche la recirculation de ces cellules^{298,299}. De façon attendue, dans le sang des souris traitées par le FTY720, la lymphopénie est visible dès le premier jour de traitement (**Figure 3B.**).

Les souris immunisées, traitées par le FTY720 et greffées survivent à plus de 50% en dépit du non recrutement des lymphocytes du sang, de la rate et des ganglions, alors que les souris contrôles décèdent toutes. Il est intéressant de noter que les souris contrôles non immunisées, traitées par le FTY720 décèdent plus rapidement que les souris contrôles non immunisées non traitées par le FTY720 (**Figure 3C.**). De plus, lorsque nous analysons la présence de lésions tumorales sur ces souris, il apparaît que les souris traitées par le FTY720

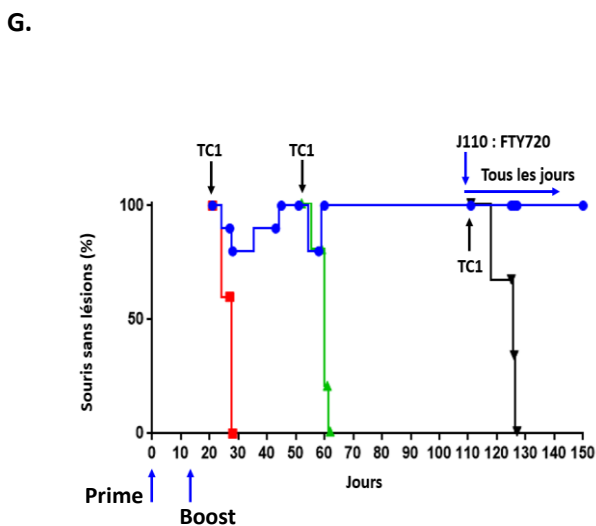
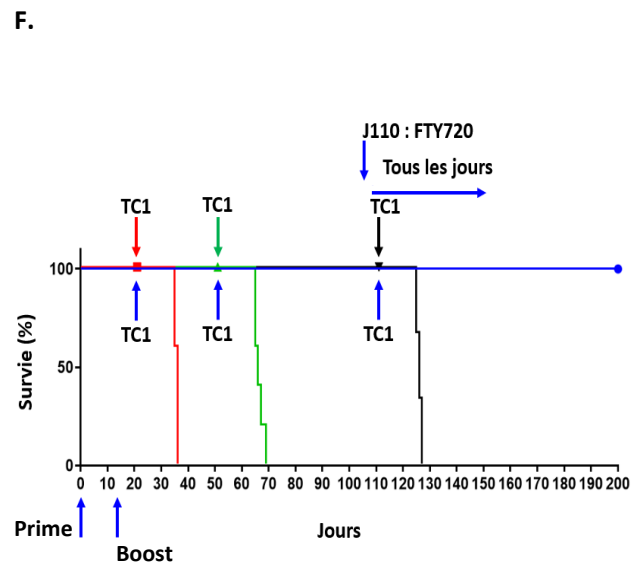
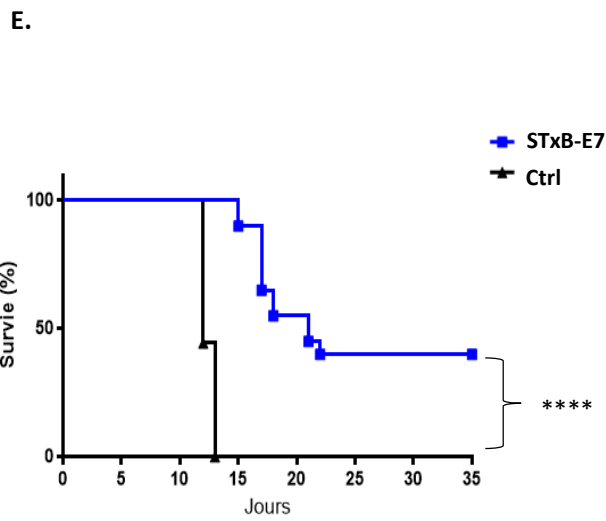
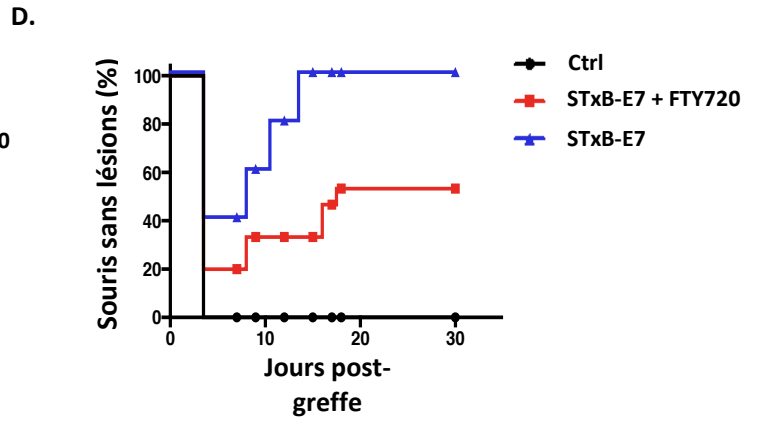
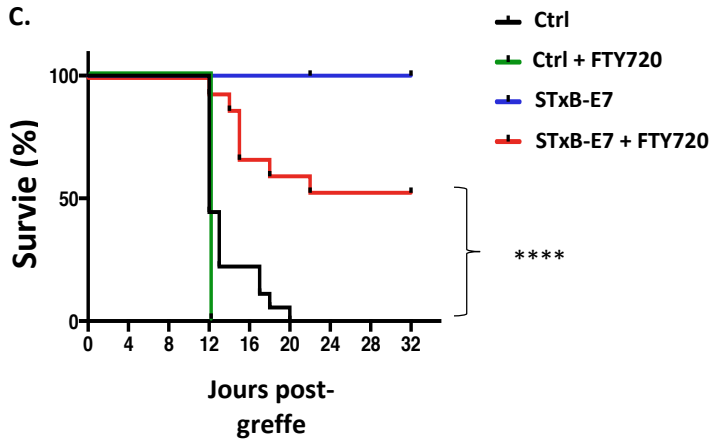
mettent plus de temps à contrôler la tumeur que les souris immunisées non traitées mais permettent néanmoins une protection partielle significative (**Figure 3D.**). Ces résultats montrent que les LT résidents locaux permettent de protéger 50% des souris. 50% des souris ne contrôlent pas la tumeur ce qui pourrait s'expliquer par le non recrutement des cellules circulantes, qui auraient donc également un rôle dans la protection tumorale à un temps précoce après immunisation.

Les résultats précédents montrent que la cinétique de contraction des Trm au fil du temps correspond à une diminution drastique du nombre de Trm entre le J7, le J30 et le J90. Nous avons voulu vérifier que les Trm à J30 avaient toujours la capacité de protéger. Pour cela nous avons immunisé des souris avec STxB-E7 (prime – boost) puis greffé 50 000 TC1 dans la langue des souris au jour 30. Environ 40% des souris immunisées survivent à cette greffe tumorale à distance de l'immunisation (**Figure 3E.**). Il est à noter qu'à J30, ces souris ne présentent que des Trm dans leur LBA. Pour améliorer cet effet anti-tumoral à distance nous avons immunisé des souris (prime – boost), greffé 50 000 TC1 dans la langue des souris au jour 7 et analysé la survie. À 16 jours post-greffe, 100% des souris immunisées survivent alors que les souris contrôles décèdent toutes. 30 jours après cette première greffe, nous avons greffé une seconde fois 50 000 TC1 dans les langues des souris qui avaient été précédemment protégées; à 18 jours, 100% des souris immunisées greffées survivent alors que les souris contrôles meurent rapidement. Nous avons ensuite attendu 60 jours après cette seconde greffe et nous avons greffé une troisième fois les souris qui avaient contrôlé deux fois la croissance tumorale ; pour cette troisième greffe, nous avons traité les souris avec du FTY720 un jour avant la greffe. Malgré le traitement, ces souris ont toutes contrôlé les tumeurs sans récurrence à J200 (**Figure 3F.**). Il est intéressant de noter que 20% des souris immunisées présentent des lésions tumorales visibles à l'œil nu après la première greffe tumorale et les contrôlent après 25 jours ; après la seconde greffe, 20% des souris présentent des lésions tumorales également, mais cette fois-ci le contrôle des tumeurs est total après seulement 7 jours ; après la troisième greffe, malgré le traitement par le FTY720, aucune souris ne présente de lésion tumorale. Après 2 greffes tumorales, les cellules immunitaires mémoires résidentes localement induites sont suffisantes pour protéger contre une troisième greffe et de façon plus efficace même 60 jours après la dernière rencontre avec l'antigène tumoral (**Figure 3F. et G.**).



B.

Groupe / paramètre (unité)	Résultats	Gamme normale	Anomalie hématoologique
Souris contrôles / Lymphocytes (K/ μ L)	3.92	0.9 – 9.3	Normal
Souris traitées / Lymphocytes (K/ μ L)	0.09	0.9 – 9.3	Lymphocytopenie






Légendes F. et G.

- STxB-E7 Prime – Boost – TC1 J21 – TC1 J51 – FTY720 J110 – TC1 J111
- Ctrl 1 TC1 J21
- ▲ Ctrl 2 TC1 J51
- ▼ Ctrl 3 TC1 J111

Figure 3. Fonctionnalité des cellules résidentes mémoires. **A.** Elispot IFN- γ effectué avec des Tem de la rate, des Tem des LBA ou des Trm des LBA triés 7 jours après le boost de souris vaccinées (prime – boost). Les trois populations sécrètent de l'IFN- γ sans différence significative quel que soit la concentration de peptides utilisée pour la stimulation (expérience d'avidité). **B.** Mesure des lymphocytes totaux (Hemavet 950 FS) sur des sangs de souris traitées ou non par le FTY720. **C.** Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie de souris contrôles non vaccinées (Ctrl), de souris contrôles traitées par le FTY720 (Ctrl + FTY720), de souris immunisées (STxB-E7 IN), de souris immunisées traitées par le FTY720 (STxB-E7 IN + FTY720). Les souris ont été greffées 7 jours après le boost ; la survie des souris du groupe STxB-E7 IN + FTY720 est significative par rapport aux souris contrôles. **D.** Représentation du pourcentage de souris de l'expérience décrite en **C.** n'ayant plus de lésions tumorales sublinguales visibles à l'œil nu dans les groupes Ctrl, STxB-E7 IN et STxB-E7 IN + FTY720. **E.** Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie de souris immunisées (prime – boost) et greffées à J30 dans la muqueuse sublinguale avec des TC1. **F.** Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie des souris immunisées (STxB-E7 IN) greffées avec des TC1 aux jours 21, 51, 111 et des souris contrôles non immunisées 1, 2 et 3 (Ctrl 1, 2, 3) greffées respectivement aux jours 21, 51 et 111 ; les souris STxB-E7 IN ont été traitées à partir du jour 110 tous les jours par 0,5mg/kg de FTY720 en ip. **G.** Représentation du pourcentage de souris de l'expérience décrite en **F.** n'ayant plus de lésions tumorales sublinguales visibles à l'œil nu dans les groupes STxB-E7 IN, Ctrl 1, Ctrl 2 et Ctrl 3. Chaque expérience comporte plus de 5 souris par groupe et a été reproduite au minimum 3 fois (Les expériences des figures **F** et **G** ont été reproduites 2 fois). Ns = différence non significative. **** indique $p < 0,0001$.

3. Les LT-CD8⁺ spécifiques circulantes seules ne protègent pas contre une greffe tumorale

Nous avons montré que la protection tumorale était fortement corrélée avec la présence de Trm ; nous nous sommes demandés ensuite si les LT circulants (Teff, Tem) étaient capables de protéger à eux seuls les souris contre une greffe tumorale. Nous avons immunisé des souris (prime – boost) et avons connecté chirurgicalement (par parabiose) le système sanguin de ces souris (parabionte immunisé ) avec le système sanguin de souris naïves (parabionte non immunisé ). Cette opération chirurgicale permet aux deux systèmes sanguins d'être connectés après 7 jours (). Nous avons vérifié la présence de LT-CD8⁺tet⁺ dans la rate des deux parabiontes et confirmé la présence de LT-CD8⁺ spécifiques dans ces deux compartiments (**Figure 4A.**). En revanche, la présence de Trm dans les LBA a été détectée de façon significative dans les parabiontes immunisés (**Figure 4A.** et **B.**) tandis qu'ils sont à la

limite de la détection dans les parabiontes non immunisés, indiquant ainsi la présence de LT circulants et Trm dans les parabiontes immunisés et la présence de LT circulants dans les parabiontes non immunisés mais une très faible présence de Trm dans les parabiontes non immunisés (**Figure 4B.**). Nous avons ensuite greffé chez les souris parabiosées, 7 jours après la chirurgie (14 jours après le boost) 50 000 TC1 dans la langue des parabiontes non immunisés et suivi la survie. Toutes les souris parabiosées avec parabiontes non immunisés greffés décèdent aussi rapidement que les souris contrôles (souris naïves greffées), alors que près de 25% des parabioses avec parabiontes immunisés greffés survivent (**Figure 4C.**). Ces résultats mettent en avant le fait que les cellules circulantes seules ne sont pas capables de contrôler la croissance tumorale dans un site muqueux sans cellules résidentes induites localement ; ils confirment également le fait qu'une immunisation locale muqueuse permet d'obtenir des réponses anti-tumorales locales muqueuses mais pas sur d'autres sites muqueux à distance.

Par ailleurs, il est à noter que dans les parabiontes immunisés, la protection est plus faible que celle observée chez des souris sauvages immunisées pour une raison non expliquée (stress chirurgical ? Immunosuppression associée à la chirurgie ?).

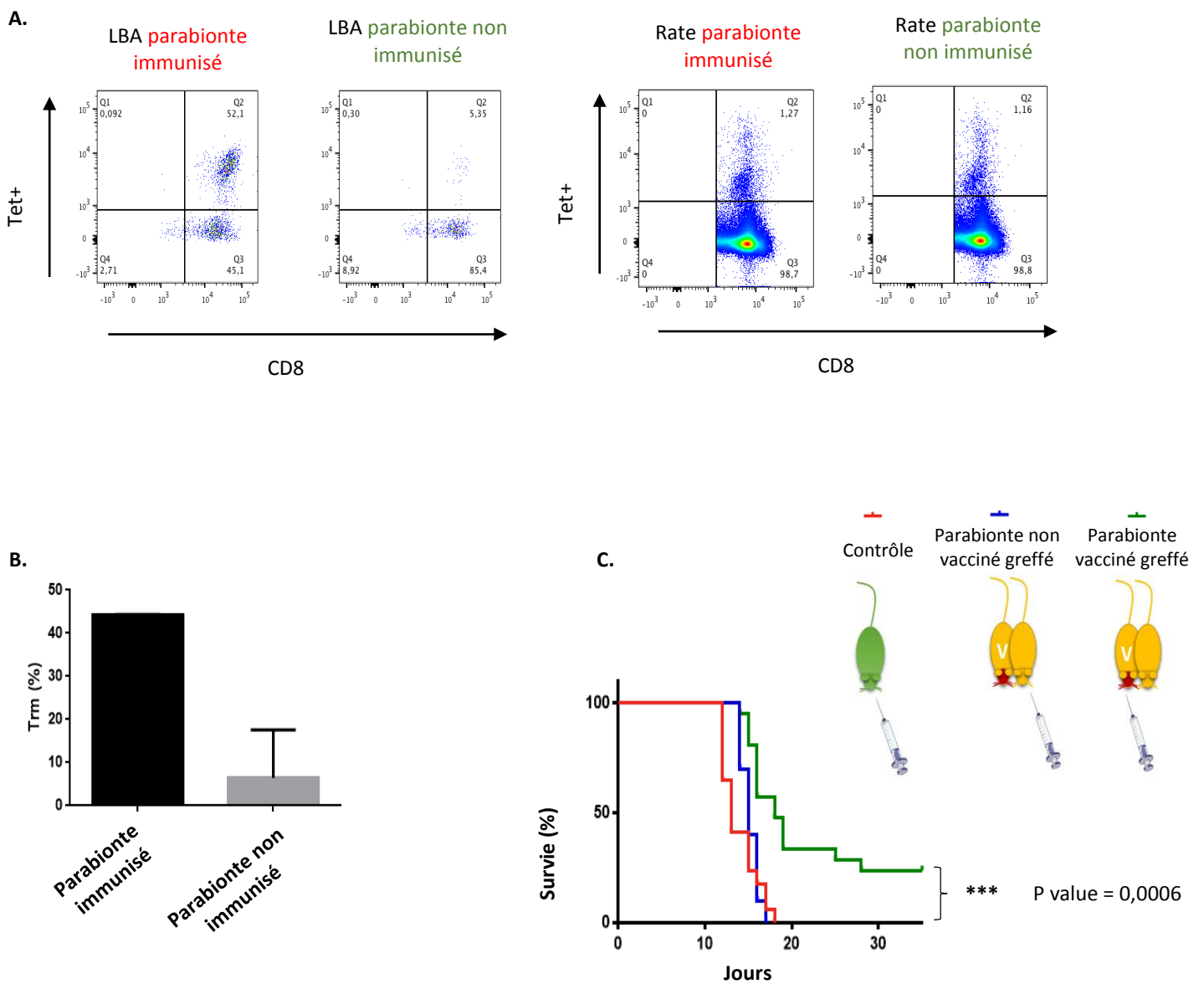


Figure 4. Les LT-CD8⁺ circulants sans les LT-CD8⁺ résidents ne protègent pas contre une greffe tumorale. Des souris immunisées (STxB-E7) ont été chirurgicalement parabiosées (connexion du système sanguin par chirurgie) avec des souris non immunisées sept jours après le boost. **A.** Dot plots représentatifs des LBA et des rates de parabiontes marqués pour les LT-CD8⁺ spécifiques trente jours après le boost (23 jours post-chirurgie). **B.** Histogramme représentatif du pourcentage de Trm dans les LBA des parabiontes immunisés ou non immunisés 30 jours après le boost. **C.** Sept jours après la chirurgie, les souris immunisées (parabionte vacciné greffé) ou non immunisées (parabionte non vacciné greffé) des parabioses ont été greffées dans la muqueuse sublinguale avec 50 000 TC1 et comparées à des souris naïves non immunisées non « parabiosées » (Contrôle). Les expériences de parabioses ont été réalisées sur plus de 5 souris par groupe et reproduites 4 fois. *** indique $p < 0,001$.

4. La modulation de l'apparition des Trm par l'anti-TGF- β diminue la protection anti-tumorale

Dans une dernière série d'expériences, nous avons voulu diminuer *in vivo* le nombre de Trm dans le LBA et évaluer son impact sur la croissance tumorale. Nos analyses transcriptomiques montraient que de nombreux gènes exprimés par les Trm étaient régulés par le TGF- β (**Figure supplémentaire 1.**). Par ailleurs, il a été montré que le TGF- β jouait un rôle dans la différenciation des Trm^{227,300}. Nous avons donc cherché à inhiber le TGF- β pour moduler les Trm.

Nous avons ainsi immunisé des souris (prime – boost) que nous avons traitées simultanément par un anticorps anti-TGF- β neutralisant (STxB-E7 IN + Anti-TGF β) ou par son isotype contrôle (STxB-E7 IN + Iso anti-TGF β). A J30 après l'immunisation, les LBA des souris STxB-E7 IN + anti-TGF β présentent une diminution significative de Trm en comparaison aux LBA des souris STxB-E7 IN + Iso anti-TGF β (**Figure 5A.**). De façon notable, les deux populations de Trm CD49a⁺CD103⁻ et CD49a⁺CD103⁺ sont diminuées (**Figure 5A.**). Les Tem circulants des souris traitées par l'anti-TGF- β sont légèrement augmentés par rapport aux souris non traitées. D'autre part, 5 jours après la greffe tumorale, l'analyse des tissus linguaux a également montré des différences significatives du nombre de Trm entre les deux groupes (**Figure 5B.**). En inhibant le TGF- β , nous avons pu moduler négativement l'apparition de Trm dans les LBA au jour 30 ; nous avons donc greffé 50 000 TC1 dans la langue de souris 30 jours après l'immunisation et leurs traitements par l'anti-TGF- β ou par son isotype. Les souris STxB-E7 IN + anti-TGF β contrôlent moins bien la croissance tumorale (> 60% des souris) que les souris immunisées traitées par l'isotype (< 40%) malgré le pourcentage de cellules circulantes plus élevées dans ces souris (p=0,0490) (**Figure 5C.**). Ces résultats démontrent la capacité de régulation négative de l'apparition des Trm par l'anti-TGF- β au niveau des LBA et au niveau des tissus linguaux. Cette diminution des Trm corrèle avec une moins bonne efficacité anti-tumorale du vaccin thérapeutique.

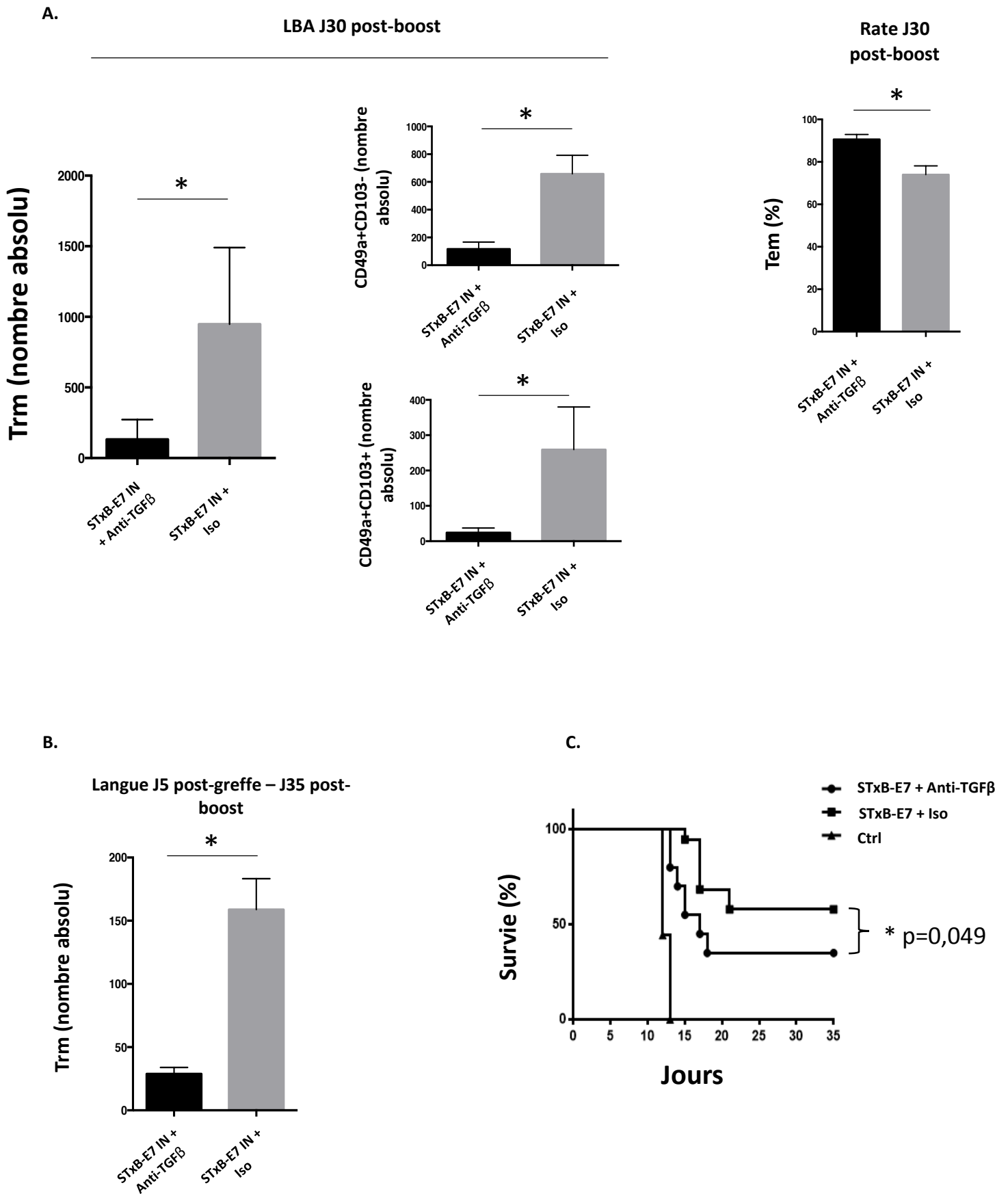


Figure 5. Modulation négative de l'apparition des Trm par l'anti-TGFβ. Des souris ont été immunisées (prime – boost) et traitées par l'anti-TGF-β (STxB-E7 IN + Anti-TGFβ) ou son isotype (STxB-E7 IN + Iso) (100µg en ip 3 fois par semaine ; 200 µg le jour des immunisations) ;

le traitement a été arrêté une semaine après le boost des souris. **A.** Histogramme du nombre absolu de Trm dans les LBA des deux groupes de souris 30 jours après le boost (les deux populations combinées sont représentées dans la figure de gauche ; les populations CD49a⁺CD103⁻ et CD49a⁺CD103⁺ dans les figures centrales) ; le pourcentage des Tem de la rate des deux groupes est représenté dans la figure de droite. **B.** À J30 après le boost, les souris sont greffées avec des TC1 dans la muqueuse sublinguale. Cinq jours après la greffe, les tissus linguaux sont analysés par cytométrie en flux ; le nombre absolu de Trm entre les deux groupes est représenté sur cet histogramme. **C.** Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie des deux groupes de souris greffées J30 après le boost. Ces expériences ont été réalisées sur 6 souris minimum (**A. B.**) et sur 5 souris par groupe, répétées 3 fois (**C.**). Les valeurs représentées correspondent à la valeur moyenne \pm SD. * indique $p < 0,05$.

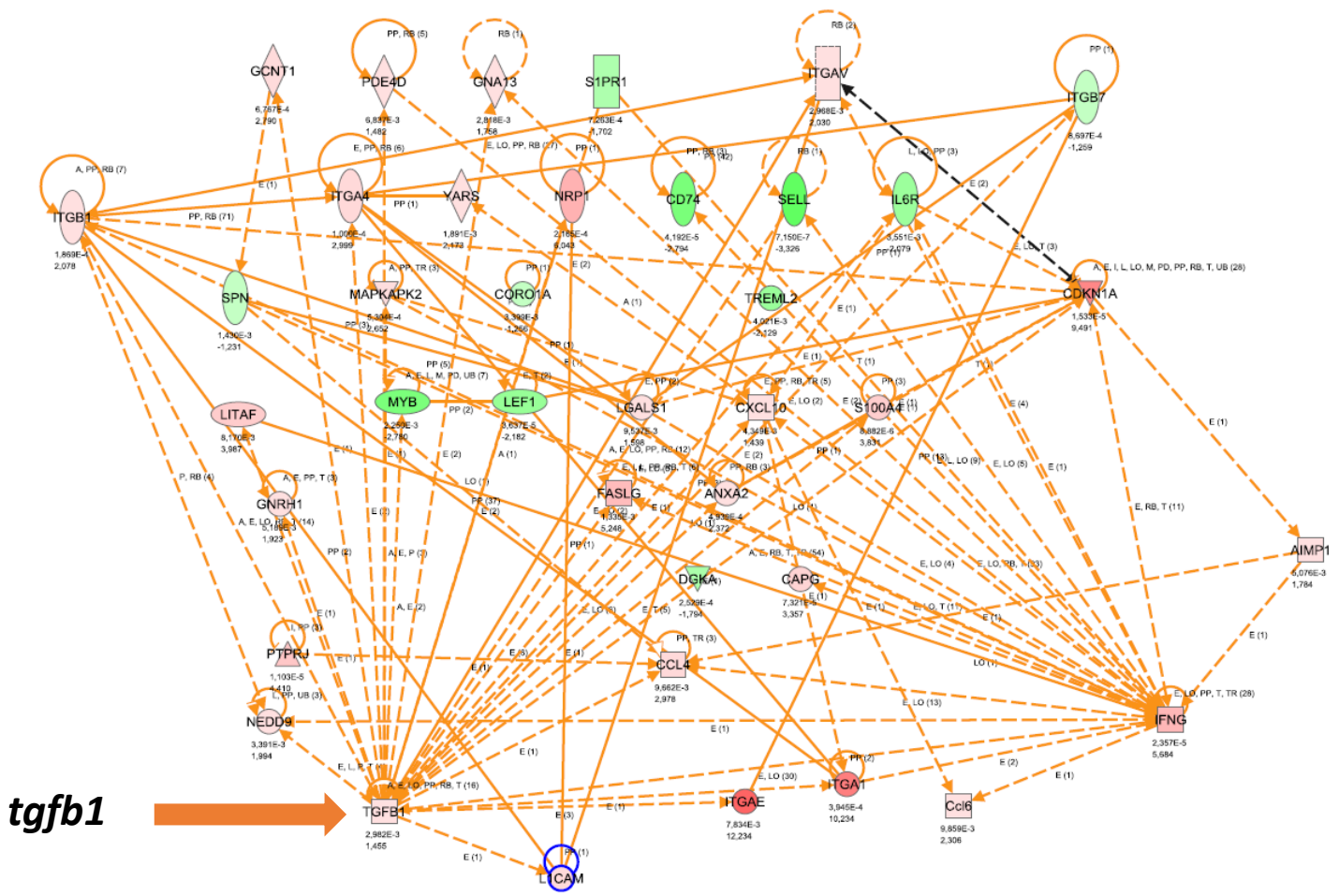


Figure supplémentaire 1. Interactome du TGF-β. Cette image correspond aux résultats des données de transcriptomiques (Figure 1. et 2.). La couleur représente le taux d'expressions des gènes des LT-CD8⁺ mémoires des LBA par rapport aux LT-CD8⁺ mémoire de la rate, le vert

correspond aux gènes sous-exprimés dans les LT-CD8⁺ mémoires des LBA, le rouge correspond aux gènes surexprimés dans les LT-CD8⁺ mémoires des LBA ; plus l'intensité de la couleur est élevée, plus le gène est exprimé (rouge) ou sous-exprimé (vert). Les flèches en pointillées correspondent aux interactions indirectes entre les gènes, les flèches pleines correspondent aux interactions directes entre les gènes. Le gène du TGF- β est impliqué dans un très grand nombre d'interactions, notamment avec les gènes du CD49a (*itga1* et *itgb1*) et le gène du CD103 (*itgae*).

Discussion

Légende de la discussion :

Rouge = Figure de l'article publié dans Science Translational Medicine

Bleu = Figure de l'article publié dans Molecular Cancer Therapeutics

Vert = Figure des résultats du 3^{ème} travail (Article en préparation)

1. La vaccination par STxB-E7

1.1. Induction d'une réponse LT-CD8⁺ spécifique d'un antigène

Au cours de ces travaux nous avons montré que la vaccination par STxB-E7 associée à l' α -GalCer permet d'induire des LT-CD8⁺ spécifiques dans la rate après vaccination par voie intramusculaire ou par voie intranasale alors que le peptide E7 seul (associé à l' α -GalCer) lui, ne permet pas d'induire ces réponses (**Figure 1 A.**). Ces réponses LT-CD8⁺ spécifiques sont multifonctionnelles de par leur sécrétion d'IFN- γ (**Figure 1 B.**) et d'IL-2 et sont cytotoxiques *in vivo* (**Figure suppl 2.**). Nous avons donc réussi à développer une stratégie vaccinale capable d'induire de fortes réponses LT-CD8⁺ spécifiques au profil multifonctionnel typique Th1, considéré comme favorable au contrôle des infections chroniques et des cancers^{97,301}. Ces travaux prolongent des travaux antérieurs sur l'intérêt de STxB comme vecteur vaccinal pour l'induction de réponses LT-CD8⁺ spécifiques d'antigènes^{33,236,291}.

1.2. Rôle de l'immunité locale dans la protection anti-tumorale

Comme abordé dans le chapitre 2.1. de l'introduction, de nombreux travaux dans le domaine de l'infectiologie montrent que la voie d'immunisation muqueuse (orale, intrarectale, intranasale, intravaginale) permet d'induire de meilleures réponses immunitaires antivirales au niveau des sites muqueux que la voie d'immunisation systémique (parentérale, sous-cutané, intramusculaire)^{129,302-304}. Néanmoins il a été montré que l'utilisation de vaccin reposant sur des virus recombinants injectés par voie IM ou IN permet d'induire des réponses comparables au niveau des muqueuses^{305,306}. Ces résultats pourraient trouver une explication dans la capacité des vecteurs viraux à diffuser dans les tissus notamment muqueux après leur administration par voie systémique.

Nos résultats vont dans le sens des travaux du groupe de Belyakov³⁰²⁻³⁰⁴. Seule l'immunisation par voie IN muqueuse a permis d'induire des LT-CD8⁺ spécifiques fonctionnels dans les compartiments muqueux (LBA, ganglions cervicaux et ganglions médiastinaux) (**Figure 3 A. et B.**) ainsi qu'une protection anti-tumorale prophylactique et thérapeutique après greffe de tumeurs dans un site muqueux (langue), alors que l'immunisation systémique par voie IM n'a induit que des réponses systémiques (**Figure 2.**). Ces résultats ont été confirmés également sur un second modèle tumoral du poumon bien plus agressif (**Figure 2 D. et E.**). Cette réponse muqueuse plus faible après vaccination systémique pouvait être améliorée après irradiation localisée de la tumeur induisant une augmentation de la protection anti-tumorale ainsi qu'une augmentation de l'infiltration intratumorale des LT-CD8⁺ spécifiques de l'antigène E7 dont nous discuterons dans le chapitre 5. (**Figure 1.**)

Dans ces travaux, nous nous sommes focalisés sur un modèle orthotopique de tumeurs de la langue ou des poumons afin de caractériser les réponses anti-tumorales de notre immunothérapie à l'opposé de la majorité des travaux précliniques qui se basent sur des modèles de tumeurs sous-cutanées ; ces greffes sous-cutanées sont simples et reproductibles mais ne miment pas les localisations anatomiques réelles des tumeurs. Chaque localisation possède un microenvironnement particulier qui peut influencer sur la réponse anti-tumorale locale, c'est pour cela que nous avons développé ces modèles orthotopiques³⁰⁷ (**Figure 2 A. et D.**). D'autre part les cellules tumorales que nous greffons expriment l'antigène E7 de l'HPV16 qui est présent dans de nombreuses tumeurs ORL chez l'Homme ce qui en fait un modèle de tumeur de la sphère ORL pertinent, bien qu'il ne soit pas spontané.

Enfin, nous avons montré que la vaccination par voie IM induit une protection anti-tumorale contre une greffe sous-cutanée de la tumeur TC1 indiquant que la voie intramusculaire permet la protection contre une tumeur systémique alors qu'elle ne permet pas d'induire une protection efficace contre une tumeur muqueuse. Il est intéressant de remarquer que la voie IN a également permis de protéger contre la croissance des tumeurs sous-cutanées ce qui indique que la voie d'immunisation IN muqueuse permet de protéger efficacement contre les tumeurs muqueuses et systémiques alors que la voie d'immunisation IM systémique ne permet de protéger efficacement que contre les tumeurs systémiques (**Figure 7 A. et B.**). Ces résultats suggèrent l'existence d'une compartimentalisation des réponses anti-tumorales LT-CD8⁺ spécifiques d'antigènes.

2. Caractéristiques des LT-CD8⁺ localement induits

2.1. Phénotype Trm

2.1.1. Phénotype

Les voies d'immunisation IN et IM sont donc différentes dans leur capacité d'induction de la réponse immunitaire anti-tumorale. En triant les cellules mémoires induites par ces deux immunisations nous avons montré que les cellules des LBA induites par vaccination IN possédaient le phénotype des Trm. Elles possèdent une signature moléculaire caractéristique (**Tableau 1.**) et expriment des molécules distinctives de cette population comme le CD49a et le CD103 (**Figure 1 B.**). Nous avons montré de façon étonnante qu'à temps tardif après la vaccination le CD49a est quasiment (95%) toujours présent sur les Trm et que le CD103 n'est présent que sur les cellules exprimant le CD49a (**Figure 2.**). Il est important de remarquer que certains travaux décrivent des Trm qui n'expriment pas le CD103 dans certaines localisations et que certains Trm n'expriment pas le CD69¹⁹². Les résultats que nous décrivons sont en accord avec la littérature et permettent de préciser le phénotype des Trm via le marqueur CD49a.

2.1.2. Rôle du CD49a

Le CD49a (aussi identifié VLA-1, $\alpha 1\beta 1$ ou ITGA1/ITGB1) est une intégrine présente sur plusieurs types cellulaires comme les LT-CD8⁺ ³⁰⁸, les NK³⁰⁹, les monocytes, les cellules épithéliales et mésenchymateuses²⁹⁷ ce qui n'en fait pas un marqueur spécifique des Trm. Cette intégrine est présente chez l'Homme et chez la souris et leurs séquences génétiques sont orthologues (homologues entre les deux espèces et descendent d'une séquence unique du dernier ancêtre commun aux deux espèces). Les chercheurs ont montré plusieurs rôles de cette intégrine dont deux prédominent :

- 1) une action sur la migration intra tissulaire ou rétention cellulaire en interagissant avec le collagène de type IV³¹⁰
- 2) un rôle sur la survie des LT^{308,311-315}

Nos résultats indiquent que la voie d'immunisation IN induit des LT-CD8⁺ spécifiques qui expriment le CD49a précocement après l'immunisation mais également 30 et 90 jours après l'immunisation allant dans le sens des travaux précédemment publiés^{308,311-316} (**Figure 2.**). Cette intégrine est exprimée par les LT-CD8⁺ spécifiques infiltrant les tumeurs sublinguales après une vaccination par voie IN (**Figure 5 F.**) alors qu'elle n'est pas exprimée par les LT-CD8⁺ spécifiques infiltrant les tumeurs sous-cutanées après une vaccination par voie IM (**Figure 7 C.**). Egalement, lorsque nous inhibons la migration des cellules qui expriment le CD49a à l'aide d'anticorps neutralisants, la protection tumorale est amoindrie et le nombre de LT-CD8⁺ intratumoraux est diminué confirmant également le rôle du CD49a dans la migration cellulaire (**Figure 6.**). Néanmoins, en raison de la non spécificité d'expression de CD49a par les Trm, nous ne pouvons exclure un rôle d'autres cellules exprimant le CD49a dans la protection tumorale observée. De plus, nous avons montré la présence du CD49a sur les LT-CD8⁺ spécifiques intratumoraux muqueux chez la souris mais également chez l'Homme alors que les LT-CD8⁺ intratumoraux des tumeurs non muqueuses humaines expriment significativement moins le CD49a (**Figure 8.**). Ces résultats montrent pour la première fois l'expression du CD49a par les Trm muqueux (seule l'expression transcriptomique a auparavant été démontrée) qui dans ce contexte semble permettre 1) la migration des LT-CD8⁺ vers les sites tumoraux et 2) la survie des Trm à long terme.

2.1.3. Rôle du CD103

L'intégrine CD103 (aussi identifié α_E ou ITGAE) est une molécule présente sur de nombreux types cellulaires comme les LT-CD8⁺, les DC, les mastocytes et les LT-CD4⁺ ce qui n'en fait donc pas un marqueur unique des Trm. Cette intégrine est codée par le gène *itgae* orthologue entre la souris et l'Homme. Le CD103 se dimérise avec l'intégrine β_7 (ITGB7) pour former l'intégrine $\alpha_E\beta_7$ qui interagit avec la E-Cadhérine. Même si le CD103 est exprimé par plusieurs types cellulaires, il est désormais clairement établi qu'il s'agit d'un marqueur consensuel des Trm. De récents travaux montrent que la présence des Trm CD103⁺ au sein de tumeurs humaines est associée à un pronostic favorable dans la survie des patients³¹⁷⁻³¹⁹. L'interaction du CD103 avec la E-Cadhérine permet le positionnement des granules cytotoxiques à l'interface entre les cellules cibles et les LT-CD8⁺ spécifiques induisant ainsi

l'exocytose du contenu des granules³²⁰. L'induction de l'expression du CD103 par les LT-CD8⁺ repose sur l'engagement du TCR des LT-CD8⁺ et nécessite la présence de TGF- β . Les facteurs de transcription SMAD et NFAT jouent un rôle important dans l'induction de CD103 après cette costimulation des LT³²¹⁻³²⁴. Nos résultats montrent que les LT-CD8⁺ spécifiques des LBA induits après vaccination par voie IN expriment le CD103 aux jours 7, 30 et 90 après immunisations (**Figure 2 B.**). En revanche, lorsque nous neutralisons la migration à l'aide d'anticorps bloquant le CD103, nous n'avons pas observé de diminution de la protection tumorale ni de diminution de l'infiltrat lymphocytaire T CD8⁺ (**Figure 6 A. et C.**). Ceci pourrait s'expliquer du fait que le modèle tumoral TC1 n'exprime pas la E-Cadhérine, le CD103 n'aurait donc pas de rôle dans la migration intratumorale et dans la cytotoxicité des LT-CD8⁺ dans ce modèle (**Figure suppl 6.**). Ce même résultat a d'ailleurs été décrit dans un travail sur la migration des Treg intratumoraux³²⁵. Ces données n'excluent pas que le CD103 pourrait avoir un rôle dans la migration, la rétention tissulaire comme le décrivent de nombreux travaux ni son rôle dans l'effet cytotoxique^{323,326}. Nous avons montré que 7 jours après immunisation IN par STxB-E7, le CD103 est exprimé seul ou co-exprimé avec le CD49a ; il est intéressant de noter que le CD103 n'est plus exprimé seul à 30 ou 90 jours après l'immunisation mais qu'il est quasiment exclusivement co-exprimé avec le CD49a (**Figure 2.**). Ceci pourrait être dû au rôle du CD49a dans le maintien de la survie à long terme des LT-CD8⁺.

2.1.4. Rôle des cellules dendritiques

De nombreux travaux ont montré l'importance des DC dans l'imprinting des LT-CD8⁺ comme discuté dans le chapitre **3.1.3.** de l'introduction. Nos travaux vont dans ce sens ; nous avons démontré que seules les DC muqueuses des poumons étaient capables d'induire l'expression du CD49a sur des LT-CD8⁺ activés alors que les DC de la rate n'avaient pas cette capacité dans les mêmes conditions (**Figure suppl 5.**). D'autre part il est décrit que les DC CD1c⁺ humaines isolées du poumon permettent d'induire le CD103 et le CD49a sur les LT-CD8⁺ muqueux spécifiques via la sécrétion de TGF- β ³²⁴. La vaccination par voie IN favorise l'accès de l'antigène aux DC muqueuses, il est possible que la voie systémique ne permette pas un accès facilité aux DC muqueuses diminuant ainsi la capacité de la réponse immunologique muqueuse. Nos résultats indiquent que le vecteur vaccinal STxB permet de cibler différentes

sous-populations de DC CD11c⁺CD11b⁺ (population qui présente la plus forte expression de CMH-I spécifique du peptide), CD8⁺ et CD103⁺ dont nous avons montré qu'elles sont toutes capables de présentation croisée *in vivo* (**Figure suppl 1.**).

Malgré nos efforts nous n'avons pas encore clairement isolé la sous-population de DC responsable de cet imprinting muqueux et continuons à caractériser les DC migratoires des voies respiratoires et du NALT et les DC résidentes des ganglions médiastinaux et cervicaux. Il se peut que différentes sous populations de DC au niveau des muqueuses soient capables de cet imprinting muqueux.

2.2. Rôle des Trm dans la protection anti-tumorale

2.2.1. Rôle direct des Trm et cinétique de la protection anti-tumorale

Les résultats que nous avons obtenus lors de ces travaux indiquent que les LT-CD8⁺ sont cruciaux dans la protection anti-tumorale dans notre modèle (**Figure 4 A. et C.**). La voie d'immunisation intranasale par STxB permet d'induire deux populations principales dans les LBA, les Trm et les Tem qui sont impliquées dans la protection anti-tumorale. Ces deux populations sont capables de sécréter de l'IFN- γ et ne présentent pas de différences en terme de fonctionnalité et d'avidité par rapport aux LT-CD8⁺ mémoires de la rate (**Figure 3 A.**). Nous avons montré indirectement via l'inhibition du recrutement de LT circulants du compartiment systémique que les Trm de façon isolée sont capables d'exercer une protection anti-tumorale significative (50% de survie), 7 jours après le boost immunologique (**Figure 3 B. C. et D.**). L'efficacité des Trm à J7 après le boost n'est pas totale ce qui peut être expliqué potentiellement d'une part parce qu'aucune autre cellule du système immunitaire ne peut atteindre la région lésionnelle et d'autre part parce que le nombre de Trm est faible. Un premier argument en faveur de l'importance du nombre de Trm présent pour la protection anti-tumorale a été d'observer que 30 jours après l'immunisation, le nombre de Trm présent dans les LBA était diminué et que la protection tumorale l'était également (**Figure 2 C. et 3 E.**). Un second argument était qu'après une seconde greffe tumorale de souris vaccinées ayant contrôlé la tumeur une première fois, les lésions étaient contrôlées plus rapidement (**Figure 3 G.**) ; lorsque nous avons isolé le compartiment sublingual en traitant les souris par du

FTY720, 50 jours après un second challenge tumoral, la croissance des tumeurs était immédiatement contrôlée (**Figure 3 G.**) ; ces résultats suggèrent que le nombre de Trm localement induit par notre immunothérapie influe sur l'efficacité de la réponse anti-tumorale locale. Des expériences sont actuellement en cours afin de déterminer le nombre de Trm présents dans le tissu lingual et dans les LBA juste avant une troisième greffe tumorale. Ce résultat corrobore les travaux du groupe de David Masopust montrant que le nombre de LT-CD8⁺ préexistants est inversement corrélé à la rapidité de leur différenciation ainsi qu'au maintien de la capacité proliférative de ces cellules²⁸. Un troisième argument qui va dans ce sens concerne la modulation négative du nombre de Trm par le TGF- β . Il a été démontré que le TGF- β jouait un rôle pivot dans la différenciation des Trm et l'interactome tiré de nos résultats de transcriptomiques vont également dans ce sens (**Figure suppl 1.**). De plus, nous avons montré que l'injection d'un anticorps neutralisant le TGF- β provoquait une réduction dans les LBA et dans la muqueuse sublinguale du nombre de Trm qui est corrélée à une diminution significative de la survie des souris (**Figure 5.**). Ces résultats suggèrent également que le nombre de Trm influence l'efficacité clinique de la réponse anti-tumorale.

2.2.2. Rôle indirect des Trm dans la protection tumorale

Le groupe de David Masopust a démontré que lorsque les Trm rencontrent à nouveau l'antigène de façon anamnétique, ils sont capables de sécréter de l'IFN- γ qui induit une sécrétion de chimiokines inflammatoires provoquant le recrutement de LT-CD8⁺ mémoires circulants¹⁹⁴. Un autre travail du même groupe a montré que les Trm pouvaient induire l'activation des cellules NK mais dans notre modèle, nous n'avons pas retrouvé ces cellules au contact du tissu tumoral (**Figure suppl 4.**)³²⁷. Nous avons montré dans des expériences de parabioses que les LT-CD8⁺ mémoires spécifiques circulants seuls ne permettent pas de protéger contre un challenge tumoral (**Figure 4.**). Les Teff ne semblent donc pas suffisants pour protéger contre la greffe de tumeurs muqueuses dans notre modèle. Il faut toutefois noter que notre modèle tumoral n'exprime pas l'E-Cadhérine dont l'un des ligands est le KLRG1 qui est exprimé par les Teff ; l'interaction entre ces deux molécules induit une signalisation intracellulaire responsable de fonctions immunorégulatrices qui pourraient expliquer ces résultats dans notre modèle³²⁸.

3. Limites de l'étude des Trm

Les Trm représentent donc une population lymphocytaire T CD8⁺ mémoire, résidente capable de protéger contre le développement de tumeurs muqueuses. De nombreux travaux ont montré cette capacité de protection dans des modèles infectieux^{192,194,327} mais notre travail montre pour la première fois le rôle des Trm dans la protection contre des tumeurs. Le nombre des Trm induits par notre modèle vaccinal est faible ce qui complique leur caractérisation. Pour envisager un transfert adoptif de ces cellules, il faudrait pouvoir en induire énormément. *In vitro* nous avons essayé de nombreuses cinétiques et de nombreux mélanges cytokiniques (IL-15, TGF- β , TNF α , IL-33, ...) sans réussir à induire une différenciation des LT-CD8⁺ murines suffisamment marquée pour pouvoir les transférer. D'autre part il n'existe pas, à notre connaissance, de marqueur unique des Trm ce qui en fait une population difficile à éliminer spécifiquement. Nous avons tenté différentes stratégies de déplétion des Trm sans succès comme l'injection localisée à la langue d'anti-CD8 ou l'injection intratrachéale d'anti-CD8. D'un autre point de vue nous avons essayé d'amplifier les Trm locaux par une injection intratrachéale de LT-CD8⁺ activés sans réussir à augmenter le nombre final de Trm dans les LBA.

4. Mécanismes de la synergie radiothérapie-vaccin

De façon intéressante nous avons montré que la voie d'immunisation IM permet d'induire des T mémoires dans la rate associés à une faible protection anti-tumorale muqueuse (**Figure 1. Et 2 C.**) alors que cette immunisation associée à la radiothérapie permet d'améliorer très significativement la protection anti-tumorale (**Figure 1.**). Le remodelage du microenvironnement tumoral et la normalisation vasculaire suggèrent que les LT-CD8⁺ spécifiques circulants peuvent accéder plus facilement au stroma tumoral contribuant ainsi au contrôle de la tumeur (**Figure 2. Et 4.**). A l'instar de nos résultats, d'autres travaux ont montré que la normalisation vasculaire induit l'infiltration intratumorale de LT-CD8⁺ et que ces cellules sont des éléments clés dans la réponse anti-tumorale après radiothérapie³²⁹⁻³³¹. Cette synergie a déjà été observée avec différents vaccins ou avec des immunomodulateurs impliquant d'autres mécanismes que la normalisation vasculaire ce qui suggère que cet effet synergique est potentiellement dû à de multiples mécanismes³³²⁻³³⁴. Par

exemple, il a été rapporté que lors d'une faible irradiation localisée (2Gy), il existait une amélioration du recrutement de LT-CD8⁺ intratumoraux associée à une meilleure régression tumorale. Cet effet était secondaire à une repolarisation des macrophages M2 en un phénotype M1 exprimant iNOS. Cette repolarisation des macrophages et la présence de LT-CD8⁺ favorisait dans un second temps la normalisation vasculaire³³⁵. Dans un modèle de thérapie cellulaire par des LT-CD8⁺ de type TH17, il a été montré que les DC irradiées sécrétaient de l'IL-12 qui favorise la différenciation des LT-CD8⁺ en lymphocytes cytotoxiques anti-tumoraux³³⁶. Enfin, un travail du groupe de Wu CY. a montré que la radiothérapie augmentait l'infiltration de la tumeur par des cellules myéloïdes de type MDSC et macrophages de type M2. De façon intéressante lors d'une association thérapeutique associant la radiothérapie et un vaccin thérapeutique, les LT-CD8⁺ induits sont capables de lyser ces cellules myéloïdes présentant des peptides antigéniques. Cet effet des LT-CD8⁺ contribue à la synergie observée avec la radiothérapie³³².

En extrapolant nos résultats, la radiothérapie localisée pourrait permettre de modifier le microenvironnement de la tumeur qui par divers mécanismes pourrait potentiellement induire le recrutement des LT-CD8⁺ mémoires circulants au même titre que les Trm induits après immunisation IN le font. Ces observations sont basées sur des corrélations qu'il sera intéressant d'approfondir à l'avenir.

5. Extension des résultats

5.1. Autres tumeurs muqueuses

Nos observations sur la compartimentalisation de la réponse immunitaire après vaccination sont appuyées par d'autres études. Entre autre, Wakabayashi A. et ses collègues ont montré qu'une immunothérapie *per os* était nécessaire pour induire une réponse LT-CD8⁺ spécifique et le contrôle des tumeurs gastriques alors que la voie d'immunisation sous-cutanée n'avait pas d'effet protecteur³³⁷. Un travail de Bourquin C et de ses collègues ajoute un argument en faveur de la compartimentalisation immunitaire ; en transférant des LT-CD8⁺ spécifiques par voie sous-cutanée ils ont pu induire une protection contre les tumeurs sous-cutanées mais n'ont pas observé de protection contre les tumeurs gastriques³³⁸. Il faut garder

à l'esprit que ces résultats sont dépendants des modèles vaccinaux et animaux utilisés ; par exemple, le groupe de Nardelli-Haefliger a montré dans un modèle thérapeutique que la vaccination muqueuse intranasale ou intravaginale induit de plus faibles réponses contre une tumeur vaginale que la vaccination sous-cutanée. Ces résultats pourraient être expliqués par la composition unique de la muqueuse vaginale dans laquelle il est très difficile d'induire des réponses LT-CD8⁺ ; ils pourraient également être expliqués par une protection humorale permettant le rejet de la tumeur. En effet, la compartimentalisation immunitaire est moins claire pour la réponse humorale que cellulaire, les anticorps ont la capacité de diffuser dans les tissus (y compris les muqueuses) par transsudation comme c'est le cas pour les vaccins prophylactiques contre l'HPV et contre les virus grippaux administrés par voie systémique. Malgré ces possibilités, plusieurs travaux montrent la capacité de la voie d'immunisation intranasale à induire des réponses LT-CD8⁺ dans la muqueuse vaginale^{339,340}.

Nos travaux ainsi que ceux d'autres suggèrent donc que la voie d'immunisation doit être considérée dans l'induction des réponses cellulaires immunitaires anti-tumorales.

5.2. Echecs des thérapies chez l'Homme

La grande majorité des essais cliniques reposant sur des vaccins thérapeutiques contre les cancers muqueux ont montré à ce jour des résultats très limités³⁴¹. Parmi les grands espoirs thérapeutiques contre les cancers du poumon, le vaccin Mage-A3 et le Stimuvax (L-BLP25 ou Tecemotide) ont été testés dans un essai clinique de phase III mais n'ont pas démontré de bénéfice clinique chez des patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules³⁴²⁻³⁴⁵. Un autre vaccin, le CIMAvax[®]EGF, n'a montré qu'une très faible influence positive sur la survie d'un sous-groupe de patients qui devaient être en très bon état général, avec une tumeur de stade IV et âgés de moins de 60 ans³⁴⁶. Également, le GVAX[®] dans un essai de phase I/II et le Belagenpunmatucel-L (Lucanix[®]) dans un essai de phase III n'ont pas montré de résultats significatifs dans la survie des patients traités et atteints de cancers du poumon³⁴⁷.

Ces échecs thérapeutiques successifs malgré des résultats préliminaires prometteurs pourraient potentiellement s'expliquer par le mode d'administration du vaccin ; toutes ces thérapies ont été administrées par voie intramusculaire systémique. Compte tenu de nos

travaux, la voie systémique intramusculaire pourrait être à l'origine de ces mauvais résultats cliniques ; nos résultats suggèrent fortement que la voie d'immunisation muqueuse pourrait améliorer les réponses cliniques et augmenter les chances de succès des vaccins thérapeutiques chez l'Homme ciblant des tumeurs muqueuses. Ceci contraste avec le succès des immunomodulateurs (anti-PD-1) observés dans les tumeurs du poumon³⁴⁸. Néanmoins, comme précédemment mentionné, cette compartimentalisation ne semble pas opérer pour les anticorps qui peuvent diffuser dans tous les sites muqueux de l'organisme même après une administration systémique.

5.3. Rôle pronostique des Trm chez l'Homme

Nous avons montré que la présence de LT-CD8⁺CD49a⁺ dans les tumeurs muqueuses chez l'Homme est significativement plus élevée que dans les tumeurs non muqueuses et nos résultats suggèrent très fortement que ces Trm sont impliqués dans la régression et dans la protection tumorale. Par ailleurs nous avons mis en place des marquages par immunofluorescence des Trm CD103⁺/E-Cadhérine ou CD49a⁺ sur des coupes congelées de tumeurs pulmonaires humaines dans une étude rétrospective actuellement en cours de traitement statistique. Ensemble, ces données laissent penser que chez l'Homme les Trm pourraient jouer un rôle majeur dans le pronostic des patients. Trois travaux très récents ont d'ailleurs démontré que la présence de Trm CD103⁺ dans les tumeurs des poumons, de la vessie ou dans les tumeurs de l'ovaires était de bon pronostic³¹⁷⁻³¹⁹.

5.4. Traitement des patients

La sous-unité B de la toxine de Shiga que nous utilisons comme vecteur vaccinal n'est pas toxique et est peu immunogène²⁹¹, ce qui en fait un vecteur tout à fait intéressant pour le développement d'immunothérapie chez l'Homme. De plus, l' α -Galactosylcéramide est testé dans de nombreux essais cliniques et n'a pas montré de toxicité associée à ce jour³⁴⁹⁻³⁵¹. D'autre part d'autres adjuvants (GM-CSF et CpG) utilisables en clinique ont montré une synergie avec STxB³⁵². La capacité d'induction d'une réponse anti-tumorale efficace de vaccins reposant sur STxB pourrait être transposée chez l'Homme sans contre-indications préclinique

et clinique actuelle. Par ailleurs, nous avons montré que la radiothérapie et STxB-E7 agissent en synergie et que cette combinaison permet d'induire des réponses anti-tumorales bien plus efficaces que la radiothérapie seule ou que l'immunothérapie seule (**Figure 1.**). De plus nous avons montré que cette combinaison permet la protection complète des souris lors d'une seconde greffe tumorale longtemps après la première greffe indiquant une mémoire immunitaire anti-tumorale (**Figure 2.**). Ces résultats s'insèrent aisément dans une optique clinique réaliste puisque la radiothérapie constitue le traitement utilisé actuellement chez les patients atteints de cancer des VADS (**Chapitre 5.4.2. de l'introduction**). La mémoire immunitaire induite par ces vaccins pourrait diminuer les risques de récurrences des patients. Le traitement des patients atteints de cancers de la sphère ORL liés à l'HPV par STxB-E7 associé à la radiothérapie est une perspective envisageable à court terme. Nos résultats montrent que la vaccination par voie IN induit un taux de survie des souris lors de traitements prophylactiques et thérapeutiques de 100% ; il sera particulièrement intéressant d'associer la radiothérapie à l'immunisation muqueuse par STxB-E7 dans ces essais cliniques. Enfin, de façon plus générale, nos résultats compilés avec ceux de la littérature indiquent que la vaccination par voie muqueuse semble être une voie prometteuse dans le traitement des tumeurs muqueuses.

6. Synthèse des travaux

Ces travaux s'inscrivent dans un processus de recherche préclinique qui nous a permis de valider un vaccin basé sur la sous-unité B non toxique de la toxine de Shiga couplé à un antigène et associée à un adjuvant, l' α -Galactosylcéramide. Cette association induit de forte réponses LT-CD8⁺ spécifiques multifonctionnelles systémiques. Nous avons montré que la vaccination par voie muqueuse intranasale permet l'induction de ces réponses LT-CD8⁺ dans les compartiments muqueux alors que la vaccination systémique classiquement utilisée n'a pas cette capacité. De plus cette vaccination muqueuse, qu'elle soit prophylactique ou thérapeutique, permet de protéger les souris contre la croissance de tumeurs de façon bien plus efficace que la vaccination systémique. Nous avons montré que les LT-CD8⁺ étaient nécessaires à cette protection et que la radiothérapie synergise avec le vaccin et améliore la survie des souris. Nos résultats montrent pour la première fois le rôle des Trm en cancérologie, ils contribuent très largement à la protection anti-tumorale, et sont de bon pronostic chez les patients atteints de cancers muqueux. Nos résultats permettent d'affiner le phénotype des Trm grâce à l'intégrine CD49a qui est impliquée à la fois dans la migration et/ou la rétention des cellules et dans la survie à long terme de ces cellules. Nos travaux ouvrent de nouvelles perspectives dans le traitement des patients atteints de cancer muqueux et pourront rapidement mener à des essais pour les valider.

Références bibliographiques

1. Encyclopédie Larousse en ligne - cancer. at <http://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/cancer/11745>
2. Response, N. *et al.* Plasticity in Tumor-Promoting Inflammation : Impairment of Macrophage Recruitment Evokes a Compensatory. **10**, 329–339 (2008).
3. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).
4. Benchetrit, F. *et al.* [Cytotoxic T lymphocytes: role in immunosurveillance and in immunotherapy]. *Bull. Cancer* **90**, 677–85
5. Pellegrini, M., Belz, G., Bouillet, P. & Strasser, A. Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 14175–80 (2003).
6. Joshi, N. S. *et al.* Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* **27**, 281–95 (2007).
7. Sarkar, S. *et al.* Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *J. Exp. Med.* **205**, 625–640 (2008).
8. Huster, K. M. *et al.* Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 5610–5 (2004).
9. Kaech, S. M. *et al.* Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat. Immunol.* **4**, 1191–8 (2003).
10. Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C. & Lefrançois, L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nat. Immunol.* **1**, 426–32 (2000).
11. Yuzefpolskiy, Y., Baumann, F. M., Kalia, V. & Sarkar, S. Early CD8 T-cell memory precursors and terminal effectors exhibit equipotent in vivo degranulation. *Cell. Mol. Immunol.* (2014). doi:10.1038/cmi.2014.48

12. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708–12 (1999).
13. Schwendemann, J., Choi, C., Schirmacher, V. & Beckhove, P. Dynamic differentiation of activated human peripheral blood CD8⁺ and CD4⁺ effector memory T cells. *J. Immunol.* **175**, 1433–9 (2005).
14. Wherry, E. J. *et al.* Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat. Immunol.* **4**, 225–34 (2003).
15. Gattinoni, L. *et al.* A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat. Med.* **17**, 1290–7 (2011).
16. Buzon, M. J. *et al.* HIV-1 persistence in CD4⁺ T cells with stem cell-like properties. *Nat. Med.* **20**, 139–42 (2014).
17. Flynn, J. K. *et al.* Quantifying susceptibility of CD4⁺ stem memory T-cells to infection by laboratory adapted and clinical HIV-1 strains. *Viruses* **6**, 709–26 (2014).
18. Flynn, J. K. & Gorry, P. R. Stem memory T cells (TSCM)-their role in cancer and HIV immunotherapies. *Clin. Transl. Immunol.* **3**, e20 (2014).
19. Lugli, E. *et al.* Identification, isolation and in vitro expansion of human and nonhuman primate T stem cell memory cells. *Nat. Protoc.* **8**, 33–42 (2013).
20. Cieri, N. *et al.* IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. *Blood* **121**, 573–84 (2013).
21. Wei, Y. *et al.* Induction of autologous tumor killing by heat treatment of fresh human tumor cells: involvement of gamma delta T cells and heat shock protein 70. *Cancer Res.* **56**, 1104–10 (1996).
22. Mackensen, A. *et al.* Evidence for in situ amplification of cytotoxic T-lymphocytes with antitumor activity in a human regressive melanoma. *Cancer Res.* **53**, 3569–73 (1993).
23. Harty, J. T. & Bevan, M. J. Responses of CD8(+) T cells to intracellular bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 89–93 (1999).

24. Jass, J. R. Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J. Clin. Pathol.* **39**, 585–9 (1986).
25. Pagès, F. *et al.* Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2654–66 (2005).
26. Clark, W. H. Tumour progression and the nature of cancer. *Br. J. Cancer* **64**, 631–44 (1991).
27. Fridman, W. H. *et al.* Immune infiltration in human cancer: prognostic significance and disease control. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **344**, 1–24 (2011).
28. Fraser, K. A., Schenkel, J. M., Jameson, S. C., Vezys, V. & Masopust, D. Preexisting high frequencies of memory CD8⁺ T cells favor rapid memory differentiation and preservation of proliferative potential upon boosting. *Immunity* **39**, 171–83 (2013).
29. Porter, D. L., Levine, B. L., Kalos, M., Bagg, A. & June, C. H. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **365**, 725–33 (2011).
30. Rosenberg, S. A. Cell transfer immunotherapy for metastatic solid cancer—what clinicians need to know. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **8**, 577–85 (2011).
31. Kantoff, P. W. *et al.* Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **363**, 411–22 (2010).
32. Fong, L. *et al.* Activated lymphocyte recruitment into the tumor microenvironment following preoperative sipuleucel-T for localized prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **106**, (2014).
33. Vingert, B. *et al.* The Shiga toxin B-subunit targets antigen in vivo to dendritic cells and elicits anti-tumor immunity. *Eur. J. Immunol.* **36**, 1124–35 (2006).
34. Badoual, C. *et al.* [PD-1 and PDL-1 expression in cancer: significance and prognostic value]. *Med. Sci. (Paris)*. **29**, 570–2 (2013).
35. Tumeh, P. C. *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* **515**, 568–571 (2014).

36. Boon, T., Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J. & van der Bruggen, P. Human T cell responses against melanoma. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 175–208 (2006).
37. Tartour, E. *et al.* Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. *Cancer Metastasis Rev.* **30**, 83–95 (2011).
38. Bercovici, N. *et al.* Analysis and characterization of antitumor T-cell response after administration of dendritic cells loaded with allogeneic tumor lysate to metastatic melanoma patients. *J. Immunother.* **31**, 101–12 (2008).
39. Williams, M. A., Tyznik, A. J. & Bevan, M. J. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* **441**, 890–3 (2006).
40. Romagnani, S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann. Allergy. Asthma Immunol.* **85**, 9–18; quiz 18, 21 (2000).
41. Cottrez, F. & Groux, H. Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. *Transplantation* **77**, S12–5 (2004).
42. Takayanagi, H. New developments in osteoimmunology. *Nat. Rev. Rheumatol.* **8**, 684–9 (2012).
43. Végran, F., Apetoh, L. & Ghiringhelli, F. Th9 Cells: A Novel CD4 T-cell Subset in the Immune War against Cancer. *Cancer Res.* **75**, 475–9 (2015).
44. Végran, F. *et al.* The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells. *Nat. Immunol.* **15**, 758–66 (2014).
45. Duhén, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* **10**, 857–63 (2009).
46. Trifari, S., Kaplan, C. D., Tran, E. H., Crellin, N. K. & Spits, H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of

- interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat. Immunol.* **10**, 864–71 (2009).
47. Durán-Aniotz, C. *et al.* The immunological response and post-treatment survival of DC-vaccinated melanoma patients are associated with increased Th1/Th17 and reduced Th3 cytokine responses. *Cancer Immunol. Immunother.* **62**, 761–72 (2013).
 48. Qin, S. *et al.* Th22 cells are associated with hepatocellular carcinoma development and progression. *Chin. J. Cancer Res.* **26**, 135–41 (2014).
 49. Protti, M. P., Monte, L. D. & Lullo, G. D. Tumor antigen-specific CD4+ T cells in cancer immunity: from antigen identification to tumor prognosis and development of therapeutic strategies. *Tissue Antigens* **83**, 237–46 (2014).
 50. Yu, S. *et al.* Elevated Th22 cells correlated with Th17 cells in peripheral blood of patients with acute myeloid leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 1927–45 (2014).
 51. Benchetrit, F. *et al.* Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood* **99**, 2114–21 (2002).
 52. Tartour, E. *et al.* Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res.* **59**, 3698–704 (1999).
 53. Raulet, D. H. & Vance, R. E. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 520–31 (2006).
 54. Fernandez, N. C. *et al.* Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat. Med.* **5**, 405–11 (1999).
 55. Holloway, A. F., Rao, S., Chen, X. & Shannon, M. F. Changes in chromatin accessibility across the GM-CSF promoter upon T cell activation are dependent on nuclear factor kappaB proteins. *J. Exp. Med.* **197**, 413–23 (2003).
 56. Curiel, T. J. *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* **10**, 942–9 (2004).

57. Onizuka, S. *et al.* Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res.* **59**, 3128–33 (1999).
58. Ladoire, S., Martin, F. & Ghiringhelli, F. Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **60**, 909–18 (2011).
59. Badoual, C. *et al.* Revisiting the prognostic value of regulatory T cells in patients with cancer. *J. Clin. Oncol.* **27**, e5–6; author reply e7 (2009).
60. Carreras, J. *et al.* High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* **108**, 2957–64 (2006).
61. Poutahidis, T., Kleinewietfeld, M. & Erdman, S. E. Gut microbiota and the paradox of cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* **5**, 157 (2014).
62. Crome, S. Q. *et al.* Inflammatory effects of ex vivo human Th17 cells are suppressed by regulatory T cells. *J. Immunol.* **185**, 3199–208 (2010).
63. Gey, A. *et al.* Granulocytic myeloid-derived suppressor cells inversely correlate with plasma arginine and overall survival in critically ill patients. *Clin. Exp. Immunol.* **180**, 280–288 (2015).
64. Liu, C. *et al.* Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host. *Blood* **109**, 4336–42 (2007).
65. Gabrilovich, D. I. & Nagaraj, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 162–74 (2009).
66. Abrams, S. I. & Waight, J. D. Identification of a G-CSF-Granulocytic MDSC axis that promotes tumor progression. *Oncoimmunology* **1**, 550–551 (2012).
67. Huang, Y. *et al.* Distinct roles of VEGFR-1 and VEGFR-2 in the aberrant hematopoiesis associated with elevated levels of VEGF. *Blood* **110**, 624–31 (2007).
68. Chalmin, F. *et al.* Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of

- mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J. Clin. Invest.* **120**, 457–71 (2010).
69. Noman, M. Z. *et al.* PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J. Exp. Med.* **211**, 781–90 (2014).
 70. Bruchard, M. *et al.* Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat. Med.* **19**, 57–64 (2013).
 71. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**, 677–86 (2004).
 72. Foucher, E. D. *et al.* IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. antagonistic effects of GM-CSF and IFN γ . *PLoS One* **8**, e56045 (2013).
 73. Lin, H. *et al.* Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* **320**, 807–11 (2008).
 74. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. & Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* **23**, 549–55 (2002).
 75. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 953–64 (2005).
 76. Hao, N.-B. *et al.* Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 1–11 (2012).
 77. Duluc, D. *et al.* Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* **110**, 4319–30 (2007).
 78. Liu, C.-Z. *et al.* Overexpression and immunosuppressive functions of transforming growth factor 1, vascular endothelial growth factor and interleukin-10 in epithelial ovarian cancer. *Chin. J. Cancer Res.* **24**, 130–7 (2012).

79. Sabat, R. *et al.* Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 331–44 (2010).
80. Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O’Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 683–765 (2001).
81. Laxmanan, S. *et al.* Vascular endothelial growth factor impairs the functional ability of dendritic cells through Id pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**, 193–8 (2005).
82. Johnson, B. F., Clay, T. M., Hobeika, A. C., Lyerly, H. K. & Morse, M. A. Vascular endothelial growth factor and immunosuppression in cancer: current knowledge and potential for new therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* **7**, 449–60 (2007).
83. Gabrilovich, D. I. *et al.* Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* **2**, 1096–103 (1996).
84. Huang, B. *et al.* CCL2/CCR2 pathway mediates recruitment of myeloid suppressor cells to cancers. *Cancer Lett.* **252**, 86–92 (2007).
85. Terme, M. *et al.* VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. *Cancer Res.* **73**, 539–49 (2013).
86. Adotevi, O. *et al.* A decrease of regulatory T cells correlates with overall survival after sunitinib-based antiangiogenic therapy in metastatic renal cancer patients. *J. Immunother.* **33**, 991–8 (2010).
87. Ko, J. S. *et al.* Direct and differential suppression of myeloid-derived suppressor cell subsets by sunitinib is compartmentally constrained. *Cancer Res.* **70**, 3526–36 (2010).
88. Ko, J. S. *et al.* Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clin. Cancer Res.* **15**, 2148–57 (2009).
89. Finke, J. H. *et al.* Sunitinib reverses type-1 immune suppression and decreases T-regulatory cells in renal cell carcinoma patients. *Clin. Cancer Res.* **14**, 6674–82 (2008).

90. Abe, F. *et al.* Therapeutic activity of sunitinib for Her2/neu induced mammary cancer in FVB mice. *Int. Immunopharmacol.* **10**, 140–5 (2010).
91. Voron, T. *et al.* VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *J. Exp. Med.* **212**, 139–48 (2015).
92. Sanjabi, S., Zenewicz, L. A., Kamanaka, M. & Flavell, R. A. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**, 447–53 (2009).
93. Connolly, E. C. & Akhurst, R. J. The complexities of TGF- β action during mammary and squamous cell carcinogenesis. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **12**, 2138–49 (2011).
94. Flavell, R. A., Sanjabi, S., Wrzesinski, S. H. & Licona-Limón, P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 554–67 (2010).
95. Töpfer, K. *et al.* Tumor evasion from T cell surveillance. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 918471 (2011).
96. Juin, P., Geneste, O., Gautier, F., Depil, S. & Campone, M. Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 455–65 (2013).
97. Galon, J. *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* **313**, 1960–4 (2006).
98. Salama, P. *et al.* Tumor-Infiltrating FOXP3+ T Regulatory Cells Show Strong Prognostic Significance in Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **27**, 186–192 (2008).
99. Badoual, C. *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin. Cancer Res.* **12**, 465–72 (2006).
100. Allard, M.-A. *et al.* Linear quantification of lymphoid infiltration of the tumor margin: a reproducible method, developed with colorectal cancer tissues, for assessing a highly variable prognostic factor. *Diagn. Pathol.* **7**, 156 (2012).

101. Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 298–306 (2012).
102. Kim, S. *et al.* Zonal difference and prognostic significance of foxp3 regulatory T cell infiltration in breast cancer. *J. Breast Cancer* **17**, 8–17 (2014).
103. Ishigami, S. *et al.* Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* **88**, 577–83 (2000).
104. Villegas, F. R. *et al.* Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* **35**, 23–8 (2002).
105. Coca, S. *et al.* The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* **79**, 2320–8 (1997).
106. Jin, S. *et al.* NK cell phenotypic modulation in lung cancer environment. *PLoS One* **9**, e109976 (2014).
107. Mao, Y., Keller, E. T., Garfield, D. H., Shen, K. & Wang, J. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **32**, 303–15 (2013).
108. Hasmim, M. *et al.* Cutting edge: Hypoxia-induced Nanog favors the intratumoral infiltration of regulatory T cells and macrophages via direct regulation of TGF- β 1. *J. Immunol.* **191**, 5802–6 (2013).
109. Cassavaugh, J. & Lounsbury, K. M. Hypoxia-mediated biological control. *J. Cell. Biochem.* **112**, 735–44 (2011).
110. Harris, A. L. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 38–47 (2002).
111. Yang, C. *et al.* Analysis of hypoxia-induced metabolic reprogramming. *Methods Enzymol.* **542**, 425–55 (2014).
112. Topalian, S. L., Drake, C. G. & Pardoll, D. M. Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell* **27**, 450–461 (2015).

113. Badoual, C. *et al.* PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res.* **73**, 128–38 (2013).
114. Mlecnik, B. *et al.* Biomolecular network reconstruction identifies T-cell homing factors associated with survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* **138**, 1429–40 (2010).
115. Carreras, J. *et al.* High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1470–6 (2009).
116. Sun, S. *et al.* PD-1(+) immune cell infiltration inversely correlates with survival of operable breast cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* **63**, 395–406 (2014).
117. Giraldo, N. A. *et al.* Orchestration and Prognostic Significance of Immune Checkpoints in the Microenvironment of Primary and Metastatic Renal Cell Cancer. *Clin. Cancer Res.* (2015). doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2926
118. Thompson, R. H. *et al.* PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **13**, 1757–61 (2007).
119. Gros, A. *et al.* PD-1 identifies the patient-specific CD8⁺ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J. Clin. Invest.* **124**, 2246–59 (2014).
120. Eggermont, A. M. M., Maio, M. & Robert, C. Immune Checkpoint Inhibitors in Melanoma Provide the Cornerstones for Curative Therapies. *Semin. Oncol.* **42**, 429–435 (2015).
121. Schadendorf, D. *et al.* Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol.* (2015). doi:10.1200/JCO.2014.56.2736
122. Homet Moreno, B., Parisi, G., Robert, L. & Ribas, A. Anti-PD-1 Therapy in Melanoma. *Semin. Oncol.* **42**, 466–473 (2015).
123. Nivolumab Approved for Lung Cancer. *Cancer Discov.* **5**, OF1 (2015).

124. Soria, J.-C., Marabelle, A., Brahmer, J. R. & Gettinger, S. Immune Checkpoint Modulation for Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* **21**, 2256–2262 (2015).
125. Shin, D. S. & Ribas, A. The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: what's here, what's next? *Curr. Opin. Immunol.* **33C**, 23–35 (2015).
126. Granier, C. J. *et al.* Conditional inactivation of PDCD2 induces p53 activation and cell cycle arrest. *Biol. Open* **3**, 821–31 (2014).
127. Rizvi, N. A. *et al.* Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science (80-.)*. **348**, 124–8 (2015).
128. Snyder, A. *et al.* Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **371**, 141119140020009 (2014).
129. Nizard, M. *et al.* Mucosal vaccines: novel strategies and applications for the control of pathogens and tumors at mucosal sites. *Hum. Vaccin. Immunother.* **10**, 2175–87 (2014).
130. Kiyono, H. & Fukuyama, S. NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 699–710 (2004).
131. Brownstein, D. G., Rebar, A. H., Bice, D. E., Muggenburg, B. A. & Hill, J. O. Immunology of the lower respiratory tract. Serial morphologic changes in the lungs and tracheobronchial lymph nodes of dogs after intrapulmonary immunization with sheep erythrocytes. *Am. J. Pathol.* **98**, 499–514 (1980).
132. Pabst, R. & Gehrke, I. Is the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) an integral structure of the lung in normal mammals, including humans? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **3**, 131–5 (1990).
133. Cesta, M. F. Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Pathol.* **34**, 599–608 (2006).
134. Russell, M. W. Immunization for protection of the reproductive tract: a review. *Am. J. Reprod. Immunol.* **47**, 265–8 (2002).
135. Sato, A. *et al.* Vaginal memory T cells induced by intranasal vaccination are critical for protective T cell recruitment and prevention of genital HSV-2 disease. *J. Virol.* **88**, 13699–708 (2014).

136. Cuburu, N. *et al.* Sublingual immunization with nonreplicating antigens induces antibody-forming cells and cytotoxic T cells in the female genital tract mucosa and protects against genital papillomavirus infection. *J. Immunol.* **183**, 7851–9 (2009).
137. Iwasaki, A. Mucosal dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 381–418 (2007).
138. Kraehenbuhl, J. P. & Neutra, M. R. Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 301–32 (2000).
139. Cerutti, A. The regulation of IgA class switching. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 421–34 (2008).
140. Strugnell, R. A. & Wijburg, O. L. C. The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 656–67 (2010).
141. Pasetti, M. F., Simon, J. K., Szein, M. B. & Levine, M. M. Immunology of gut mucosal vaccines. *Immunol. Rev.* **239**, 125–48 (2011).
142. Mueller, S. N. & Germain, R. N. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 618–29 (2009).
143. Wang, H., Peters, N. & Schwarze, J. Plasmacytoid dendritic cells limit viral replication, pulmonary inflammation, and airway hyperresponsiveness in respiratory syncytial virus infection. *J. Immunol.* **177**, 6263–70 (2006).
144. Grouard, G. *et al.* The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med.* **185**, 1101–11 (1997).
145. Asselin-Paturel, C. *et al.* Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat. Immunol.* **2**, 1144–50 (2001).
146. Svensson, M. *et al.* Retinoic acid receptor signaling levels and antigen dose regulate gut homing receptor expression on CD8⁺ T cells. *Mucosal Immunol.* **1**, 38–48 (2008).
147. Johansson-Lindbom, B. *et al.* Selective generation of gut tropic T cells in gut-associated lymphoid tissue (GALT): requirement for GALT dendritic cells and adjuvant. *J. Exp. Med.* **198**, 963–9 (2003).

148. Baker, K., Rath, T., Lencer, W. I., Fiebiger, E. & Blumberg, R. S. Cross-presentation of IgG-containing immune complexes. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 1319–34 (2013).
149. Segura, E. & Amigorena, S. Cross-presentation by human dendritic cell subsets. *Immunol. Lett.* **158**, 73–8 (2014).
150. Hoeffel, G. *et al.* Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* **27**, 481–92 (2007).
151. Mouriès, J. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood* **112**, 3713–22 (2008).
152. Oriss, T. B. *et al.* Dynamics of dendritic cell phenotype and interactions with CD4⁺ T cells in airway inflammation and tolerance. *J. Immunol.* **174**, 854–63 (2005).
153. Bakdash, G., Vogelpoel, L. T. C., van Capel, T. M. M., Kapsenberg, M. L. & de Jong, E. C. Retinoic acid primes human dendritic cells to induce gut-homing, IL-10-producing regulatory T cells. *Mucosal Immunol.* **8**, 265–78 (2015).
154. Haniffa, M. *et al.* Human tissues contain CD141^{hi} cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103⁺ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* **37**, 60–73 (2012).
155. Bachem, A. *et al.* Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c⁺CD141⁺ cells as homologues of mouse CD8⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* **207**, 1273–81 (2010).
156. Segura, E., Durand, M. & Amigorena, S. Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells. *J. Exp. Med.* **210**, 1035–47 (2013).
157. Guy-Grand, D., Malassis-Seris, M., Briottet, C. & Vassalli, P. Cytotoxic differentiation of mouse gut thymodependent and independent intraepithelial T lymphocytes is induced locally. Correlation between functional assays, presence of perforin and granzyme transcripts, and cytoplasmic granules. *J. Exp. Med.* **173**, 1549–52 (1991).

158. Guy-Grand, D. *et al.* Two gut intraepithelial CD8⁺ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J. Exp. Med.* **173**, 471–81 (1991).
159. Andrew, D. P., Rott, L. S., Kilshaw, P. J. & Butcher, E. C. Distribution of alpha 4 beta 7 and alpha E beta 7 integrins on thymocytes, intestinal epithelial lymphocytes and peripheral lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **26**, 897–905 (1996).
160. Lefrançois, L., Barrett, T. A., Havran, W. L. & Puddington, L. Developmental expression of the alpha IEL beta 7 integrin on T cell receptor gamma delta and T cell receptor alpha beta T cells. *Eur. J. Immunol.* **24**, 635–40 (1994).
161. Huang, Y. *et al.* Mucosal memory CD8⁺ T cells are selected in the periphery by an MHC class I molecule. *Nat. Immunol.* **12**, 1086–95 (2011).
162. Madakamutil, L. T. *et al.* CD8alpha-mediated survival and differentiation of CD8 memory T cell precursors. *Science* **304**, 590–3 (2004).
163. Walker, L. J. *et al.* Human MAIT and CD8 $\alpha\alpha$ cells develop from a pool of type-17 precommitted CD8⁺ T cells. *Blood* **119**, 422–33 (2012).
164. Renard, V., Romero, P., Vivier, E., Malissen, B. & Luescher, I. F. CD8 beta increases CD8 coreceptor function and participation in TCR-ligand binding. *J. Exp. Med.* **184**, 2439–44 (1996).
165. Karaki, S., Tanabe, M., Nakauchi, H. & Takiguchi, M. Beta-chain broadens range of CD8 recognition for MHC class I molecule. *J. Immunol.* **149**, 1613–8 (1992).
166. Walker, L. J. *et al.* CD8 $\alpha\alpha$ Expression Marks Terminally Differentiated Human CD8⁺ T Cells Expanded in Chronic Viral Infection. *Front. Immunol.* **4**, 223 (2013).
167. Cheroutre, H. & Madakamutil, L. Acquired and natural memory T cells join forces at the mucosal front line. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 290–300 (2004).
168. Guo, X., Tanaka, Y. & Kondo, M. Thymic precursors of TCR $\alpha\beta$ (+)CD8 $\alpha\alpha$ (+) intraepithelial lymphocytes are negative for CD103. *Immunol. Lett.* **163**, 40–8 (2015).

169. Klose, C. S. N. *et al.* The transcription factor T-bet is induced by IL-15 and thymic agonist selection and controls CD8 $\alpha\alpha$ (+) intraepithelial lymphocyte development. *Immunity* **41**, 230–43 (2014).
170. Kwong, B. & Lazarevic, V. T-bet orchestrates CD8 $\alpha\alpha$ IEL differentiation. *Immunity* **41**, 169–71 (2014).
171. Guy-Grand, D. *et al.* Extrathymic T cell lymphopoiesis: ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice. *J. Exp. Med.* **197**, 333–41 (2003).
172. Cheroutre, H., Lambolez, F. & Mucida, D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 445–56 (2011).
173. Weitkamp, J.-H. *et al.* Small intestinal intraepithelial TCR $\gamma\delta$ + T lymphocytes are present in the premature intestine but selectively reduced in surgical necrotizing enterocolitis. *PLoS One* **9**, e99042 (2014).
174. Casey, K. A. *et al.* Antigen-independent differentiation and maintenance of effector-like resident memory T cells in tissues. *J. Immunol.* **188**, 4866–75 (2012).
175. Mackay, L. K. *et al.* The developmental pathway for CD103(+)/CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat. Immunol.* **14**, 1294–301 (2013).
176. Beura, L. K. & Masopust, D. SnapShot: resident memory T cells. *Cell* **157**, 1488–1488.e1 (2014).
177. Purwar, R. *et al.* Resident Memory T Cells (TRM) Are Abundant in Human Lung: Diversity, Function, and Antigen Specificity. *PLoS One* **6**, e16245 (2011).
178. Gebhardt, T. *et al.* Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat. Immunol.* **10**, 524–30 (2009).
179. Masopust, D. *et al.* Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *J. Exp. Med.* **207**, 553–64 (2010).

180. Hofmann, M. & Pircher, H. E-cadherin promotes accumulation of a unique memory CD8 T-cell population in murine salivary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 16741–6 (2011).
181. Shin, H. & Iwasaki, A. A vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells. *Nature* **491**, 463–7 (2012).
182. Ibraghimov, A. R. & Lynch, R. G. T cell specialization at environmental interfaces: T cells from the lung and the female genital tract of lpr and gld mice differ from their splenic and lymph node counterparts. *Eur. J. Immunol.* **24**, 1848–52 (1994).
183. Jameson, J. M., Cauvi, G., Witherden, D. A. & Havran, W. L. A keratinocyte-responsive gamma delta TCR is necessary for dendritic epidermal T cell activation by damaged keratinocytes and maintenance in the epidermis. *J. Immunol.* **172**, 3573–9 (2004).
184. Wakim, L. M. *et al.* The Molecular Signature of Tissue Resident Memory CD8 T Cells Isolated from the Brain. *J. Immunol.* **189**, 3462–3471 (2012).
185. Intlekofer, A. M. *et al.* Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat. Immunol.* **6**, 1236–44 (2005).
186. Verjans, G. M. G. M. *et al.* Selective retention of herpes simplex virus-specific T cells in latently infected human trigeminal ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 3496–501 (2007).
187. Masopust, D., Vezys, V., Wherry, E. J., Barber, D. L. & Ahmed, R. Cutting edge: gut microenvironment promotes differentiation of a unique memory CD8 T cell population. *J. Immunol.* **176**, 2079–83 (2006).
188. Iijima, N. & Iwasaki, A. T cell memory. A local macrophage chemokine network sustains protective tissue-resident memory CD4 T cells. *Science* **346**, 93–8 (2014).
189. Watanabe, R. *et al.* Human skin is protected by four functionally and phenotypically discrete populations of resident and recirculating memory T cells. *Sci. Transl. Med.* **7**, 279ra39 (2015).
190. Woodland, D. L. & Kohlmeier, J. E. Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 153–61 (2009).

191. Ahlers, J. D. & Belyakov, I. M. Memories that last forever: strategies for optimizing vaccine T-cell memory. *Blood* **115**, 1678–89 (2010).
192. Schenkel, J. M. & Masopust, D. Tissue-resident memory T cells. *Immunity* **41**, 886–897 (2014).
193. Mueller, S. N., Zaid, A. & Carbone, F. R. Tissue-resident T cells: dynamic players in skin immunity. *Front. Immunol.* **5**, 332 (2014).
194. Schenkel, J. M., Fraser, K. A., Vezys, V. & Masopust, D. Sensing and alarm function of resident memory CD8⁺ T cells. *Nat. Immunol.* **14**, 509–13 (2013).
195. Hogg, N. & Berlin, C. Structure and function of adhesion receptors in leukocyte trafficking. *Immunol. Today* **16**, 327–30 (1995).
196. Springer, T. A. Traffic Signals on Endothelium for Lymphocyte Recirculation and Leukocyte Emigration. *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 827–872 (1995).
197. Hammer, D. A. & Lauffenburger, D. A. A dynamical model for receptor-mediated cell adhesion to surfaces. *Biophys. J.* **52**, 475–87 (1987).
198. Melder, R. J., Munn, L. L., Yamada, S., Ohkubo, C. & Jain, R. K. Selectin- and integrin-mediated T-lymphocyte rolling and arrest on TNF-alpha-activated endothelium: augmentation by erythrocytes. *Biophys. J.* **69**, 2131–8 (1995).
199. Balkwill, F. R. The chemokine system and cancer. *J. Pathol.* **226**, 148–57 (2012).
200. Jaensson, E. *et al.* Small intestinal CD103⁺ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J. Exp. Med.* **205**, 2139–49 (2008).
201. Mikhak, Z., Strassner, J. P. & Luster, A. D. Lung dendritic cells imprint T cell lung homing and promote lung immunity through the chemokine receptor CCR4. *J. Exp. Med.* **210**, 1855–69 (2013).
202. Iwata, M. *et al.* Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* **21**, 527–38 (2004).

203. Mora, J. R. *et al.* Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science* **314**, 1157–60 (2006).
204. Mora, J. R. *et al.* Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin- and gut-associated lymphoid tissues. *J. Exp. Med.* **201**, 303–16 (2005).
205. Nizza, S. T. & Campbell, J. J. CD11b+ migratory dendritic cells mediate CD8 T cell cross-priming and cutaneous imprinting after topical immunization. *PLoS One* **9**, e91054 (2014).
206. Sigmundsdottir, H. *et al.* DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat. Immunol.* **8**, 285–93 (2007).
207. Liu, L., Fuhlbrigge, R. C., Karibian, K., Tian, T. & Kupper, T. S. Dynamic programming of CD8+ T cell trafficking after live viral immunization. *Immunity* **25**, 511–20 (2006).
208. Stevceva, L. *et al.* Both mucosal and systemic routes of immunization with the live, attenuated NYVAC/simian immunodeficiency virus SIV(gpe) recombinant vaccine result in gag-specific CD8(+) T-cell responses in mucosal tissues of macaques. *J. Virol.* **76**, 11659–76 (2002).
209. Krzysiek, R., de Goër de Herve, M.-G., Yang, H. & Taoufik, Y. Tissue competence imprinting and tissue residency of CD8 T cells. *Front. Immunol.* **4**, 283 (2013).
210. Allavena, P., Germano, G., Marchesi, F. & Mantovani, A. Chemokines in cancer related inflammation. *Exp. Cell Res.* **317**, 664–73 (2011).
211. Qian, B.-Z. *et al.* CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* **475**, 222–5 (2011).
212. Bellone, M. & Calcinotto, A. Ways to enhance lymphocyte trafficking into tumors and fitness of tumor infiltrating lymphocytes. *Front. Oncol.* **3**, 231 (2013).
213. Piersma, S. J. *et al.* High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Res.* **67**, 354–61 (2007).

214. Kmiecik, J. *et al.* Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level. *J. Neuroimmunol.* **264**, 71–83 (2013).
215. Sato, E. *et al.* Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 18538–43 (2005).
216. Leffers, N. *et al.* Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **58**, 449–59 (2009).
217. Sasada, T. & Suekane, S. Variation of tumor-infiltrating lymphocytes in human cancers: controversy on clinical significance. *Immunotherapy* **3**, 1235–51 (2011).
218. Matsumura, S. *et al.* Radiation-induced CXCL16 release by breast cancer cells attracts effector T cells. *J. Immunol.* **181**, 3099–107 (2008).
219. Germanov, E. *et al.* Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in homeostasis and activation of CD1d-restricted NKT cells. *J. Immunol.* **181**, 81–91 (2008).
220. Ohta, M. *et al.* The high expression of Fractalkine results in a better prognosis for colorectal cancer patients. *Int. J. Oncol.* **26**, 41–7 (2005).
221. Harlin, H. *et al.* Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment. *Cancer Res.* **69**, 3077–85 (2009).
222. Musha, H. *et al.* Selective infiltration of CCR5(+)CXCR3(+) T lymphocytes in human colorectal carcinoma. *Int. J. Cancer* **116**, 949–56 (2005).
223. Mulligan, A. M. *et al.* Tumoral lymphocytic infiltration and expression of the chemokine CXCL10 in breast cancers from the Ontario Familial Breast Cancer Registry. *Clin. Cancer Res.* **19**, 336–46 (2013).
224. Hong, M. *et al.* Chemotherapy Induces Intratumoral Expression of Chemokines in Cutaneous Melanoma, Favoring T-cell Infiltration and Tumor Control. *Cancer Res.* **71**, 6997–7009 (2011).

225. Jöhrer, K. *et al.* Tumour-immune cell interactions modulated by chemokines. *Expert Opin. Biol. Ther.* **8**, 269–90 (2008).
226. Moran, C. J. *et al.* RANTES expression is a predictor of survival in stage I lung adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **8**, 3803–12 (2002).
227. Franciszkiwicz, K. *et al.* Intratumoral induction of CD103 triggers tumor-specific CTL function and CCR5-dependent T-cell retention. *Cancer Res.* **69**, 6249–55 (2009).
228. Salerno, E. P., Olson, W. C., McSkimming, C., Shea, S. & Slingluff, C. L. T cells in the human metastatic melanoma microenvironment express site-specific homing receptors and retention integrins. *Int. J. Cancer* **134**, 563–74 (2014).
229. Pivarcsi, A. *et al.* Tumor immune escape by the loss of homeostatic chemokine expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19055–60 (2007).
230. Hudak, S. *et al.* Immune surveillance and effector functions of CCR10(+) skin homing T cells. *J. Immunol.* **169**, 1189–96 (2002).
231. Bierie, B. *et al.* Transforming growth factor-beta regulates mammary carcinoma cell survival and interaction with the adjacent microenvironment. *Cancer Res.* **68**, 1809–19 (2008).
232. Molon, B. *et al.* Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J. Exp. Med.* **208**, 1949–62 (2011).
233. Kerkar, S. P. *et al.* IL-12 triggers a programmatic change in dysfunctional myeloid-derived cells within mouse tumors. *J. Clin. Invest.* **121**, 4746–57 (2011).
234. De Monte, L. *et al.* Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.* **208**, 469–78 (2011).
235. Li, Y.-Q. *et al.* Tumor secretion of CCL22 activates intratumoral Treg infiltration and is independent prognostic predictor of breast cancer. *PLoS One* **8**, e76379 (2013).

236. Pere, H. *et al.* A CCR4 antagonist combined with vaccines induces antigen-specific CD8+ T cells and tumor immunity against self antigens. *Blood* **118**, 4853–62 (2011).
237. Bayry, J., Tartour, E. & Tough, D. F. Targeting CCR4 as an emerging strategy for cancer therapy and vaccines. *Trends Pharmacol. Sci.* **35**, 163–5 (2014).
238. Facciabene, A. *et al.* Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature* **475**, 226–30 (2011).
239. Motz, G. T. *et al.* Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. *Nat. Med.* **20**, 607–15 (2014).
240. Schaeue, D., Ratikan, J. a, Iwamoto, K. S. & McBride, W. H. Maximizing tumor immunity with fractionated radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **83**, 1306–10 (2012).
241. Murray, D., McBride, W. H. & Schwartz, J. L. Radiation biology in the context of changing patterns of radiotherapy. *Radiat. Res.* **182**, 259–72 (2014).
242. McBride, W. H. *et al.* A sense of danger from radiation. *Radiat. Res.* **162**, 1–19 (2004).
243. Apetoh, L. *et al.* Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.* **13**, 1050–9 (2007).
244. Kepp, O., Tesniere, A., Zitvogel, L. & Kroemer, G. The immunogenicity of tumor cell death. *Curr. Opin. Oncol.* **21**, 71–76 (2009).
245. Reits, E. A. *et al.* Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J. Exp. Med.* **203**, 1259–71 (2006).
246. Chakraborty, M. *et al.* External beam radiation of tumors alters phenotype of tumor cells to render them susceptible to vaccine-mediated T-cell killing. *Cancer Res.* **64**, 4328–37 (2004).

247. Gameiro, S. R. *et al.* Radiation-induced immunogenic modulation of tumor enhances antigen processing and calreticulin exposure, resulting in enhanced T-cell killing. *Oncotarget* **5**, 403–16 (2014).
248. Mauceri, H. J. *et al.* Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene therapy targeted by ionizing radiation selectively damages tumor vasculature. *Cancer Res.* **56**, 4311–4 (1996).
249. Levy, A. *et al.* Radiation therapy and immunotherapy: implications for a combined cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **85**, 278–87 (2013).
250. Mason, K. A. *et al.* Targeting toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides enhances tumor response to fractionated radiotherapy. *Clin. Cancer Res.* **11**, 361–9 (2005).
251. Brasel, K., De Smedt, T., Smith, J. L. & Maliszewski, C. R. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* **96**, 3029–39 (2000).
252. Formenti, S. C. & Demaria, S. Systemic effects of local radiotherapy. *Lancet. Oncol.* **10**, 718–26 (2009).
253. Li, Q., Teitz-Tennenbaum, S., Donald, E. J., Li, M. & Chang, A. E. In vivo sensitized and in vitro activated B cells mediate tumor regression in cancer adoptive immunotherapy. *J. Immunol.* **183**, 3195–203 (2009).
254. Syrjänen, S. Human papillomaviruses in head and neck carcinomas. *N. Engl. J. Med.* **356**, 1993–5 (2007).
255. Goon, P. K. C. *et al.* HPV & head and neck cancer: a descriptive update. *Head Neck Oncol.* **1**, 36 (2009).
256. Syrjänen, S. The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. *Ann. Oncol.* **21 Suppl 7**, vii243–5 (2010).
257. Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Anderson, W. F. & Gillison, M. L. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J. Clin. Oncol.* **26**, 612–9 (2008).
258. Kreimer, A. R., Clifford, G. M., Boyle, P. & Franceschi, S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas

- worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **14**, 467–75 (2005).
259. Hocking, J. S. *et al.* Head and neck cancer in Australia between 1982 and 2005 show increasing incidence of potentially HPV-associated oropharyngeal cancers. *Br. J. Cancer* **104**, 886–91 (2011).
260. Tsushima, F. *et al.* Predominant expression of B7-H1 and its immunoregulatory roles in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* **42**, 268–74 (2006).
261. Strome, S. E. *et al.* B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **63**, 6501–5 (2003).
262. Fiebig, H. H., Maier, A. & Burger, A. M. Clonogenic assay with established human tumour xenografts: correlation of in vitro to in vivo activity as a basis for anticancer drug discovery. *Eur. J. Cancer* **40**, 802–20 (2004).
263. Kim, S. Animal models of cancer in the head and neck region. *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* **2**, 55–60 (2009).
264. Vahle, A.-K. *et al.* Optimization of an orthotopic murine model of head and neck squamous cell carcinoma in fully immunocompetent mice--role of toll-like-receptor 4 expressed on host cells. *Cancer Lett.* **317**, 199–206 (2012).
265. Hoover, A. C. *et al.* The role of human papillomavirus 16 E6 in anchorage-independent and invasive growth of mouse tonsil epithelium. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg.* **133**, 495–502 (2007).
266. Lin, K. Y. *et al.* Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res.* **56**, 21–6 (1996).
267. Wu, A. *et al.* Innovative DNA vaccine for human papillomavirus (HPV)-associated head and neck cancer. *Gene Ther.* **18**, 304–12 (2011).
268. Vitale-Cross, L., Amornphimoltham, P., Fisher, G., Molinolo, A. A. & Gutkind, J. S. Conditional expression of K-ras in an epithelial compartment that includes the stem cells is sufficient to promote squamous cell carcinogenesis. *Cancer Res.* **64**, 8804–7 (2004).

269. Raimondi, A. R., Molinolo, A. & Gutkind, J. S. Rapamycin prevents early onset of tumorigenesis in an oral-specific K-ras and p53 two-hit carcinogenesis model. *Cancer Res.* **69**, 4159–66 (2009).
270. Moral, M. *et al.* Akt activation synergizes with Trp53 loss in oral epithelium to produce a novel mouse model for head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **69**, 1099–108 (2009).
271. Lee, T.-Y. *et al.* Human papillomavirus type 16 E6-specific antitumor immunity is induced by oral administration of HPV16 E6-expressing *Lactobacillus casei* in C57BL/6 mice. *Cancer Immunol. Immunother.* **59**, 1727–37 (2010).
272. Hildesheim, A. *et al.* Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial. *JAMA* **298**, 743–53 (2007).
273. Cifu, A. S. & Davis, A. M. Use of HPV vaccine in males and females. *JAMA* **312**, 1920–1 (2014).
274. Van der Burg, S. H. & Melief, C. J. M. Therapeutic vaccination against human papilloma virus induced malignancies. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 252–7 (2011).
275. Borysiewicz, L. K. *et al.* A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* **347**, 1523–7 (1996).
276. Kaufmann, A. M. *et al.* Safety and immunogenicity of TA-HPV, a recombinant vaccinia virus expressing modified human papillomavirus (HPV)-16 and HPV-18 E6 and E7 genes, in women with progressive cervical cancer. *Clin. Cancer Res.* **8**, 3676–85 (2002).
277. Baldwin, P. J. *et al.* Vaccinia-expressed human papillomavirus 16 and 18 e6 and e7 as a therapeutic vaccination for vulval and vaginal intraepithelial neoplasia. *Clin. Cancer Res.* **9**, 5205–13 (2003).
278. Davidson, E. J. *et al.* Effect of TA-CIN (HPV 16 L2E6E7) booster immunisation in vulval intraepithelial neoplasia patients previously vaccinated with TA-HPV (vaccinia virus encoding HPV 16/18 E6E7). *Vaccine* **22**, 2722–9 (2004).

279. Smyth, L. J. C. *et al.* Immunological responses in women with human papillomavirus type 16 (HPV-16)-associated anogenital intraepithelial neoplasia induced by heterologous prime-boost HPV-16 oncogene vaccination. *Clin. Cancer Res.* **10**, 2954–61 (2004).
280. Maldonado, L. *et al.* Intramuscular therapeutic vaccination targeting HPV16 induces T cell responses that localize in mucosal lesions. *Sci. Transl. Med.* **6**, 221ra13 (2014).
281. Santin, A. D. *et al.* Human papillomavirus type 16 and 18 E7-pulsed dendritic cell vaccination of stage IB or IIA cervical cancer patients: a phase I escalating-dose trial. *J. Virol.* **82**, 1968–79 (2008).
282. Kawana, K. *et al.* Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients. *Vaccine* **32**, 6233–9 (2014).
283. Welters, M. J. P. *et al.* Induction of tumor-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity in cervical cancer patients by a human papillomavirus type 16 E6 and E7 long peptides vaccine. *Clin. Cancer Res.* **14**, 178–87 (2008).
284. Welters, M. J. P. *et al.* Success or failure of vaccination for HPV16-positive vulvar lesions correlates with kinetics and phenotype of induced T-cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 11895–9 (2010).
285. Melief, C. J. M. & van der Burg, S. H. Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 351–60 (2008).
286. Bagarazzi, M. L. *et al.* Immunotherapy against HPV16/18 generates potent TH1 and cytotoxic cellular immune responses. *Sci. Transl. Med.* **4**, 155ra138 (2012).
287. Yoshitake, Y. *et al.* Phase II clinical trial of multiple peptide vaccination for advanced head and neck cancer patients revealed induction of immune responses and improved OS. *Clin. Cancer Res.* **21**, 312–21 (2015).
288. Lee, R. S. *et al.* Major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble tumor antigen fused to the B-fragment of Shiga toxin. *Eur. J. Immunol.* **28**, 2726–37 (1998).

289. Haicheur, N. *et al.* The B subunit of Shiga toxin fused to a tumor antigen elicits CTL and targets dendritic cells to allow MHC class I-restricted presentation of peptides derived from exogenous antigens. *J. Immunol.* **165**, 3301–8 (2000).
290. Haicheur, N. *et al.* The B subunit of Shiga toxin coupled to full-size antigenic protein elicits humoral and cell-mediated immune responses associated with a Th1-dominant polarization. *Int. Immunol.* **15**, 1161–71 (2003).
291. Adotevi, O. *et al.* B subunit of Shiga toxin-based vaccines synergize with alpha-galactosylceramide to break tolerance against self antigen and elicit antiviral immunity. *J. Immunol.* **179**, 3371–9 (2007).
292. Lovett, R., George, E. & Adler, A. NICE guidance on sipuleucel-T for asymptomatic or minimally symptomatic metastatic hormone-relapsed prostate cancer. *Lancet. Oncol.* **16**, 369–70 (2015).
293. Frey, B., Hehlhans, S., Rödel, F. & Gaipl, U. Modulation of inflammation by low and high doses of ionizing radiation: Implications for benign and malign diseases. *Cancer Lett.* (2015). doi:10.1016/j.canlet.2015.04.010
294. Mauge, L., Terme, M., Tartour, E. & Helley, D. Control of the adaptive immune response by tumor vasculature. *Front. Oncol.* **4**, 61 (2014).
295. Mondini, M. *et al.* Synergy of radiotherapy and a cancer vaccine for the treatment of HPV-associated head and neck cancer. *Mol. Cancer Ther.* (2015). doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-1015
296. Duyverman, A. M. M. J., Kohno, M., Duda, D. G., Jain, R. K. & Fukumura, D. A transient parabiosis skin transplantation model in mice. *Nat. Protoc.* **7**, 763–70 (2012).
297. Gardner, H. Integrin $\alpha 1\beta 1$. *Adv. Exp. Med. Biol.* **819**, 21–39 (2014).
298. Morris, M. A. *et al.* Transient T cell accumulation in lymph nodes and sustained lymphopenia in mice treated with FTY720. *Eur. J. Immunol.* **35**, 3570–80 (2005).
299. Arnon, T. I., Horton, R. M., Grigorova, I. L. & Cyster, J. G. Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress. *Nature* **493**, 684–8 (2013).

300. Bergsbaken, T. & Bevan, M. J. Proinflammatory microenvironments within the intestine regulate the differentiation of tissue-resident CD8⁺ T cells responding to infection. *Nat. Immunol.* **16**, 406–414 (2015).
301. Tartour, E. *et al.* Prognostic value of intratumoral interferon gamma messenger RNA expression in invasive cervical carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 287–94 (1998).
302. Belyakov, I. M. & Ahlers, J. D. What role does the route of immunization play in the generation of protective immunity against mucosal pathogens? *J. Immunol.* **183**, 6883–92 (2009).
303. Belyakov, I. M. *et al.* Mucosal AIDS vaccine reduces disease and viral load in gut reservoir and blood after mucosal infection of macaques. *Nat. Med.* **7**, 1320–6 (2001).
304. Belyakov, I. M., Ahlers, J. D., Nabel, G. J., Moss, B. & Berzofsky, J. A. Generation of functionally active HIV-1 specific CD8⁺ CTL in intestinal mucosa following mucosal, systemic or mixed prime-boost immunization. *Virology* **381**, 106–15 (2008).
305. Kaufman, D. R. *et al.* Trafficking of antigen-specific CD8⁺ T lymphocytes to mucosal surfaces following intramuscular vaccination. *J. Immunol.* **181**, 4188–98 (2008).
306. Kaufman, D. R., Bivas-Benita, M., Simmons, N. L., Miller, D. & Barouch, D. H. Route of adenovirus-based HIV-1 vaccine delivery impacts the phenotype and trafficking of vaccine-elicited CD8⁺ T lymphocytes. *J. Virol.* **84**, 5986–96 (2010).
307. Devaud, C. *et al.* Tissues in different anatomical sites can sculpt and vary the tumor microenvironment to affect responses to therapy. *Mol. Ther.* **22**, 18–27 (2014).
308. Conrad, C. *et al.* Alpha1beta1 integrin is crucial for accumulation of epidermal T cells and the development of psoriasis. *Nat. Med.* **13**, 836–42 (2007).
309. Marquardt, N. *et al.* Cutting Edge: Identification and Characterization of Human Intrahepatic CD49a⁺ NK Cells. *J. Immunol.* **194**, 2467–71 (2015).

310. Bank, I., Book, M. & Ware, R. Functional role of VLA-1 (CD49A) in adhesion, cation-dependent spreading, and activation of cultured human T lymphocytes. *Cell. Immunol.* **156**, 424–37 (1994).
311. Ben-Horin, S. & Bank, I. The role of very late antigen-1 in immune-mediated inflammation. *Clin. Immunol.* **113**, 119–29 (2004).
312. Ray, S. J. *et al.* The collagen binding alpha1beta1 integrin VLA-1 regulates CD8 T cell-mediated immune protection against heterologous influenza infection. *Immunity* **20**, 167–79 (2004).
313. Richter, M. V & Topham, D. J. The alpha1beta1 integrin and TNF receptor II protect airway CD8+ effector T cells from apoptosis during influenza infection. *J. Immunol.* **179**, 5054–63 (2007).
314. Meharra, E. J. *et al.* Reduced gut intraepithelial lymphocytes in VLA1 null mice. *Cell. Immunol.* **201**, 1–5 (2000).
315. Desban, N., Lissitzky, J.-C., Rousselle, P. & Duband, J.-L. alpha1beta1-integrin engagement to distinct laminin-1 domains orchestrates spreading, migration and survival of neural crest cells through independent signaling pathways. *J. Cell Sci.* **119**, 3206–18 (2006).
316. Sandoval, F. *et al.* Mucosal imprinting of vaccine-induced CD8⁺ T cells is crucial to inhibit the growth of mucosal tumors. *Sci. Transl. Med.* **5**, 172ra20 (2013).
317. Djenidi, F. *et al.* CD8+CD103+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes Are Tumor-Specific Tissue-Resident Memory T Cells and a Prognostic Factor for Survival in Lung Cancer Patients. *J. Immunol.* **194**, 3475–86 (2015).
318. Wang, B. *et al.* CD103(+) tumor-infiltrating lymphocytes predict a favorable prognosis in urothelial cell carcinoma of the bladder. *J. Urol.* (2015). doi:10.1016/j.juro.2015.02.2941
319. Webb, J. R., Milne, K., Watson, P., Deleeuw, R. J. & Nelson, B. H. Tumor-infiltrating lymphocytes expressing the tissue resident memory marker CD103 are associated with increased survival in high-grade serous ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **20**, 434–44 (2014).

320. Le Floc'h, A. *et al.* Alpha E beta 7 integrin interaction with E-cadherin promotes antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis. *J. Exp. Med.* **204**, 559–70 (2007).
321. Mokrani, M., Klibi, J., Bluteau, D., Bismuth, G. & Mami-Chouaib, F. Smad and NFAT pathways cooperate to induce CD103 expression in human CD8 T lymphocytes. *J. Immunol.* **192**, 2471–9 (2014).
322. Parker, C. M. *et al.* A family of beta 7 integrins on human mucosal lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 1924–8 (1992).
323. Zhang, N. & Bevan, M. J. Transforming growth factor- β signaling controls the formation and maintenance of gut-resident memory T cells by regulating migration and retention. *Immunity* **39**, 687–96 (2013).
324. Yu, C. I. *et al.* Human CD1c(+) Dendritic Cells Drive the Differentiation of CD103(+) CD8(+) Mucosal Effector T Cells via the Cytokine TGF- β . *Immunity* **38**, 818–30 (2013).
325. Anz, D. *et al.* CD103 is a hallmark of tumor-infiltrating regulatory T cells. *Int. J. Cancer* **129**, 2417–2426 (2011).
326. Piet, B. *et al.* CD8⁺ T cells with an intraepithelial phenotype upregulate cytotoxic function upon influenza infection in human lung. *J. Clin. Invest.* **121**, 2254–63 (2011).
327. Schenkel, J. M. *et al.* T cell memory. Resident memory CD8 T cells trigger protective innate and adaptive immune responses. *Science* **346**, 98–101 (2014).
328. Banh, C., Fugère, C. & Brossay, L. Immunoregulatory functions of KLRG1 cadherin interactions are dependent on forward and reverse signaling. *Blood* **114**, 5299–306 (2009).
329. Dirkx, A. E. M. *et al.* Anti-angiogenesis therapy can overcome endothelial cell anergy and promote leukocyte-endothelium interactions and infiltration in tumors. *FASEB J.* **20**, 621–30 (2006).
330. Griffioen, A. W., Damen, C. A., Blijham, G. H. & Groenewegen, G. Tumor angiogenesis is accompanied by a decreased inflammatory response of tumor-associated endothelium. *Blood* **88**, 667–73 (1996).

331. Demaria, S. & Formenti, S. C. Role of T lymphocytes in tumor response to radiotherapy. *Front. Oncol.* **2**, 95 (2012).
332. Wu, C.-Y. *et al.* Enhanced cancer radiotherapy through immunosuppressive stromal cell destruction in tumors. *Clin. Cancer Res.* **20**, 644–57 (2014).
333. Tseng, C.-W. *et al.* Low-dose radiation enhances therapeutic HPV DNA vaccination in tumor-bearing hosts. *Cancer Immunol. Immunother.* **58**, 737–48 (2009).
334. Vatner, R. E., Cooper, B. T., Vanpouille-Box, C., Demaria, S. & Formenti, S. C. Combinations of Immunotherapy and Radiation in Cancer Therapy. *Front. Oncol.* **4**, 325 (2014).
335. Klug, F. *et al.* Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS⁺/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy. *Cancer Cell* **24**, 589–602 (2013).
336. Bowers, J. S. *et al.* Dendritic Cells in Irradiated Mice Trigger the Functional Plasticity and Antitumor Activity of Adoptively Transferred Tc17 Cells via IL12 Signaling. *Clin. Cancer Res.* (2015). doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2294
337. Wakabayashi, A. *et al.* Suppression of an already established tumor growing through activated mucosal CTLs induced by oral administration of tumor antigen with cholera toxin. *J. Immunol.* **180**, 4000–10 (2008).
338. Bourquin, C. *et al.* Efficient eradication of subcutaneous but not of autochthonous gastric tumors by adoptive T cell transfer in an SV40 T antigen mouse model. *J. Immunol.* **185**, 2580–8 (2010).
339. Maeto, C., Rodríguez, A. M., Holgado, M. P., Falivene, J. & Gherardi, M. M. Novel mucosal DNA-MVA HIV vaccination in which DNA-IL-12 plus cholera toxin B subunit (CTB) cooperates to enhance cellular systemic and mucosal genital tract immunity. *PLoS One* **9**, e107524 (2014).
340. Manuri, P. R. *et al.* Intranasal immunization with synthetic peptides corresponding to the E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus type 16 induces systemic and mucosal cellular immune responses and tumor protection. *Vaccine* **25**, 3302–10 (2007).

341. Klebanoff, C. A., Acquavella, N., Yu, Z. & Restifo, N. P. Therapeutic cancer vaccines: are we there yet? *Immunol. Rev.* **239**, 27–44 (2011).
342. Kroemer, G., Zitvogel, L. & Galluzzi, L. Victories and deceptions in tumor immunology: Stimuvax[®]. *Oncoimmunology* **2**, e23687 (2013).
343. Vansteenkiste, J. *et al.* Adjuvant MAGE-A3 immunotherapy in resected non-small-cell lung cancer: phase II randomized study results. *J. Clin. Oncol.* **31**, 2396–403 (2013).
344. Ramlau, R. *et al.* A phase II study of Tg4010 (Mva-Muc1-IL2) in association with chemotherapy in patients with stage III/IV Non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **3**, 735–44 (2008).
345. Tartour, E. & Zitvogel, L. Lung cancer: potential targets for immunotherapy. *Lancet. Respir. Med.* **1**, 551–63 (2013).
346. Gonzalez, C. V. *et al.* CIMAvax^{®};®EGF vaccine therapy for non-small cell lung cancer: A weighted log-rank tests-based evaluation. *Mod. Chemother.* **02**, 51–56 (2013).
347. Ramlogan-Steel, C. A., Steel, J. C. & Morris, J. C. Lung cancer vaccines: current status and future prospects. *Transl. lung cancer Res.* **3**, 46–52 (2014).
348. Moreno, B. H. & Ribas, A. Anti-programmed cell death protein-1/ligand-1 therapy in different cancers. *Br. J. Cancer* **112**, 1421–7 (2015).
349. Motohashi, S. *et al.* A phase I-II study of alpha-galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *J. Immunol.* **182**, 2492–501 (2009).
350. Schneiders, F. L. *et al.* Clinical experience with α -galactosylceramide (KRN7000) in patients with advanced cancer and chronic hepatitis B/C infection. *Clin. Immunol.* **140**, 130–41 (2011).
351. Ishikawa, A. *et al.* A phase I study of alpha-galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**, 1910–7 (2005).

352. Tran T, De Oliveira Diniz M, Dransart E, Gey A, Godefroy S, Sibley C, Johannes L, T. E. A therapeutic Her2-Neu cancer vaccine alone or in combination with anti-Her2 mAb inhibits tumor growth in HLA-A2 transgenic mice. *AACR abstract* (2015). at <http://www.abstractsonline.com/plan/ViewAbstract.aspx?mID=3682&Key=eae2d342-dd5a-41ba-9eb4-63990d3122b8&cKey=097713cd-159b-496a-ace2-99b0b7ee5e73&mKey=19573a54-ae8f-4e00-9c23-bd6d62268424>

Annexes

Revue 1.

Revue publiée dans le journal Human Vaccine & Immunotherapeutics ; Impact Factor 2013 = 2,131 ; Rank Immunology = 104/144-Q3

Titre original : Mucosal vaccines: novel strategies and applications for the control of pathogens and tumors at mucosal sites.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

Revue 2.

**Author's View publiée dans le journal Oncoimmunology ; Impact Factor 2013 = 6,283 ; Rank
Oncology = 21/203-Q1**

**Titre original : Immunotherapy of HPV-associated head and neck cancer: Critical
parameters.**

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de la version de diffusion