



HAL
open science

Étude de la signalisation de l'intégrine $\alpha E(CD103)\beta 7$ dans les lymphocytes T cytotoxiques anti-tumoraux

Ludiane Gauthier

► **To cite this version:**

Ludiane Gauthier. Étude de la signalisation de l'intégrine $\alpha E(CD103)\beta 7$ dans les lymphocytes T cytotoxiques anti-tumoraux. Biologie cellulaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS149 . tel-01822164

HAL Id: tel-01822164

<https://theses.hal.science/tel-01822164>

Submitted on 24 Jun 2018

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.

NNT : 2017SACLS149

THÈSE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY
PRÉPARÉE A
L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE N°582
CANCÉROLOGIE : BIOLOGIE – MÉDECINE - SANTÉ

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par

Mme Ludiane Gauthier

Étude de la signalisation de l'intégrine $\alpha_E(CD103)\beta_7$ dans les lymphocytes T
cytotoxiques anti-tumoraux

Thèse présentée et soutenue à l'Institut Gustave Roussy, le 23 juin 2017 :

Composition du Jury :

M. Auclair Christian	Professeur, ENS Cachan	Président
Mme Ménasché Gaël	Chargée de recherche, INSERM	Rapporteur
Mme Jeannin Pascale	Professeur, CHU d'Angers	Rapporteur
Mme Terme Magali	Maître de conférence, Université Paris-Descartes	Examinatrice
M. Bismuth Georges	Directeur de recherche, Université Paris-Descartes	Examinateur
Mme Mami-Chouaib Fathia	Directrice de recherche, INSERM	Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Je souhaite adresser mes remerciements à tous les membres du jury pour avoir accepté de relire et juger mon travail de thèse. Je remercie le Pr Christian Auclair d'avoir accepté d'être président du jury de ma thèse. Je souhaite ensuite remercier sincèrement le Dr Gaël Ménasché et le Pr Pascale Jeannin d'avoir accepté d'être rapporteur et d'avoir pris le temps de juger mon travail dans un délai assez bref. Je remercie également le Dr Georges Bismuth et le Dr Magali Terme pour avoir accepté de faire partie du jury en tant qu'examinateur.

Je tiens à remercier le Dr Fathia Mami-Chouaib pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je vous remercie de m'avoir proposé ce sujet de thèse et de m'avoir permis d'être autonome dans l'apprentissage et la découverte du monde de la recherche. Votre aide et vos conseils apportés lors de la rédaction ont contribué à l'amélioration de ce manuscrit.

Je remercie le Dr Salem Chouaib de m'avoir ouvert la porte de son laboratoire pour mon stage de Master 2 ainsi que pour débiter ma thèse.

Je remercie le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur ainsi que la Ligue contre le Cancer pour leur soutien financier.

Je renouvelle mes remerciements à Georges Bismuth pour sa disponibilité, son temps, et ses conseils scientifiques précieux durant ma thèse. Je souhaite remercier Emmanuel Donnadieu pour son temps accordé, sa patience et son aide notamment sur les expériences calcium. Quelle agréable ambiance règne au 3ème étage de l'Institut Cochin !

Un grand merci à Christine Leroy, qui fait le maximum pour que l'unité fonctionne au mieux. Merci pour ta disponibilité sans faille et ton investissement.

Un grand merci aux filles, Marine, Stéphanie et Inès, pour votre soutien, scientifique et moral, votre aide, et tous les moments que nous avons partagé. Je ne sais par où commencer tellement je voudrais vous remercier. Sans vous, qui avez été omniprésentes, cette thèse aurait été bien différente. Je n'oublierais jamais tous ces fous rires, au labo ou en dehors, qui m'ont redonné le sourire. Gwen, merci pour ton soutien, moral et technique, et ta bonne humeur indéfectible. Merci à vous pour les "quelques" pauses chocolat sponsorisées Lindt !

Stéphane, merci pour ta (presque toujours) bonne humeur, tes conseils scientifiques et tes vastes sujets de discussions qui nous ont permis de ne jamais nous ennuyer !

Thouraya et Linda, nous avons traversé la thèse ensemble, et nous finissons ensemble. Je vous souhaite plein de belles choses pour la suite.

Élodie, Djazia, merci pour votre bonne humeur et votre soutien les derniers mois.

Merci à Aurélie dont la connaissance du contenu de chaque placard et rack des congélateurs a été plus qu'appréciée.

Marie, je te le dis mot à mot : merci ! Tu m'as guidée dans "l'apprentissage" au début de ma thèse dans une folle ambiance, et m'a donné l'envie de poursuivre après mon stage.

Merci aux stagiaires Stéphane et Magali qui ont contribué au projet CD103.

Merci à ceux qui ont contribué à la bonne ambiance du labo et qui étaient toujours là pour donner de bons conseils, Mehdi, Jérôme, Zaeem, Meriem, Yosra, Catherine ainsi que tous les autres membres de l'unité U1186.

Je souhaite remercier tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de cette thèse : Isabelle Vergnon qui m'a formée à l'art de la culture cellulaire et du feeder, Joël Raingeaud, Jérôme Salmon et Olivier Bluteau pour leurs conseils sur les virus et Jacques Bertoglio qui m'a donné un accès illimité à l'électroporateur. Une pensée émue pour Vasily Ogryzko qui m'a fait bénéficier de ses conseils en protéomique.

Je remercie la plateforme d'imagerie et de cytométrie de Gustave Roussy, ainsi que Sophie Desnoulez qui m'a formée au microscope, Yann Lecluse au cytomètre, et Phillipe Rameau pour les innombrables tris GFP assez matinaux.

Merci aux autres thésard(e)s avec qui j'ai traversé l'aventure doctorale, Émilie, Claudine, Norma, Stéphane pour leur soutien et leurs nombreux conseils.

Merci à mes amies qui sont là depuis longtemps : Lise, Marine, Mathilde, Justine, Julie, Raphaëlle et Leïla, qui m'ont toujours soutenue, écoutée et remonté le moral.

Merci à la famille Helliot, pour leurs nombreux encouragements pendant ces années. Un grand merci à ma famille au sens large, et en particulier à Émilien, Céline, Clélia, Vincent et surtout mes parents, qui me soutiennent depuis toujours et qui ont su me conseiller dans les moments difficiles. Merci à Tanguy, mon soutien de tous les jours. Les mots me manquent pour te remercier comme il se doit. Merci pour ta patience, tes encouragements et ton humour qui m'a toujours remonté le moral.

1.3	Intégrines et molécules de costimulation.....	32
1.4	Rôle du cytosquelette dans la formation des SI.....	33
1.4.1	<i>Réorganisation du cytosquelette d'actine à la SI.....</i>	33
1.4.2	<i>Réorganisation du cytosquelette de microtubules à la SI.....</i>	35
1.5	Mécano-sensibilité de la SI.....	35
1.6	Dissolution de la SI.....	36
2.	Fonctions effectrices des lymphocytes T	36
2.1	Synapses cytotoxiques	36
2.2	Voies de lyse.....	37
2.2.1	<i>Les granules cytotoxiques</i>	37
2.2.2	<i>Délivrance des granules cytotoxiques et rôle du MTOC.....</i>	38
2.2.3	<i>Mécanismes d'action de la voie perforine/granzyme</i>	41
3.	Échappement au système immunitaire.....	44
3.1	Modulation de l'expression de protéines.....	44
3.1.1	<i>Altération de la présentation antigénique.....</i>	44
3.1.2	<i>Perte d'expression des molécules d'adhérence</i>	44
3.1.3	<i>Molécules favorisant l'apoptose des lymphocytes</i>	45
3.2	Cellules immuno-suppressives	46
3.2.1	<i>Les cellules Treg</i>	46
3.2.2	<i>Les cellules suppressives dérivées des myéloïdes</i>	46
3.2.3	<i>Les TAM.....</i>	47
III.	LES INTÉGRINES	48
1.	Généralités	48
2.	Structure des intégrines	50
2.1	Sous-unité α des intégrines	50
2.2	Sous-unité β des intégrines	51
3.	Activation et recyclage des intégrines.....	52
3.1	Changement de conformation.....	52
3.2	Recyclage des intégrines.....	53
4.	Signalisation <i>inside-out</i>.....	55
4.1	Initiation de l'activation des intégrines.....	56
4.2	Protéines associées à la signalisation <i>inside-out</i>	57
4.2.1	<i>La taline</i>	57
4.2.2	<i>Les kindlines.....</i>	58
4.2.3	<i>Les GTPases.....</i>	59
4.2.4	<i>ILK, kinase ou pseudokinase ?.....</i>	60
4.3	<i>Clustering</i> des intégrines	61
5.	Signalisation <i>outside-in</i>.....	62
5.1	Protéines impliquées dans la signalisation <i>outside-in</i>	63
5.1.1	<i>La protéine FAK.....</i>	63
5.1.2	<i>La protéine Pyk2</i>	64
5.1.3	<i>Protéines tyrosine kinases de la famille Src et Syk.....</i>	64
5.1.4	<i>La paxilline</i>	65

6. L'intégrine CD103	67
6.1 Structure de l'intégrine CD103 et de son ligand E-cadhérine	67
6.2 Spectre d'expression de l'intégrine $\alpha_E(\text{CD103})\beta_7$	68
6.2.1 <i>Lymphocytes T effecteurs</i>	68
6.2.2 <i>Les cellules dendritiques CD103⁺</i>	69
6.2.3 <i>Les cellules Treg CD103⁺</i>	70
6.3 Régulation de l'expression de CD103	70
6.3.1 <i>Régulation transcriptionnelle de CD103</i>	70
6.3.2 <i>Le TGF-β et les voies smad et non-smad</i>	71
6.4 Fonctions de l'intégrine $\alpha_E\beta_7$	73
6.4.1 <i>Rôle dans la rétention des cellules T</i>	73
6.4.2 <i>Implication de CD103 dans la SI et la cytotoxicité</i>	74
6.5 Signalisation de CD103	75
OBJECTIFS DES TRAVAUX	77
RESULTATS	83
DISCUSSION	123
CONCLUSION GENERALE	133
PROCECURES EXPERIMENTALES.....	139
BIBLIOGRAPHIE	149
ANNEXES.....	177

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Susceptibilité des souris aux tumeurs selon leur statut immunitaire	5
Figure 2 : Règle des 3 E : élimination, équilibre et échappement	7
Figure 3 : Étapes séquentielles de l'extravasation des leucocytes dans les tissus.....	8
Figure 4 : Le cycle de la réponse immunitaire antitumorale.....	10
Figure 5 : Activation et désactivation d'un récepteur couplé aux protéines G	17
Figure 6 : Diversité des SI.....	21
Figure 7 : Structure de la synapse immunologique entre un lymphocyte T et une CPA.	22
Figure 8 : Dimensions des molécules exprimées à la surface du lymphocyte T et impliquées dans la SI	23
Figure 9 : Dynamique de la formation des microclusters et de la synapse immunologique....	25
Figure 10 : Les voies de signalisation en aval du TCR.....	29
Figure 11 : Vue d'ensemble de la signalisation calcique dans les cellules T.....	31
Figure 12 : Cinétique des réponses sécrétrices des lymphocytes T	37
Figure 13 : Modèle de biogénèse et exocytose des GC.....	41
Figure 14 : Voies apoptotiques activées par le granzyme B	43
Figure 15 : Les différentes familles d'intégrines.	49
Figure 16 : Organisation structurale des intégrines.....	51
Figure 17 : Mécanismes de recyclage des intégrines	55
Figure 18 : Biogénèse des adhésions focales	56
Figure 19 : Effecteurs clés de la signalisation <i>inside-out</i> des intégrines dans les lymphocytes T.....	57
Figure 20 : Conséquences de l'activation de l'intégrine.....	63
Figure 21 : Les partenaires protéiques de la paxilline.....	67
Figure 22 : Modélisation de l'interaction entre le domaine αI de l'intégrine $\alpha_E\beta_7$ et le domaine I de la E-cadhérine.....	68
Figure 23 : Signalisation du récepteur au TGF- β par les voies non Smad.....	73
Figure 24 : Modèle expérimental	80
Figure 25 : Modèle proposé de la signalisation <i>inside-out</i> et <i>outside-in</i> de l'intégrine CD103	137

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac	<i>Anticorps</i>
AC	<i>Adénylate Cyclase</i>
ADAP	<i>Adhesion and Degranulation-promoting Adaptor Protein</i>
ADN	<i>Acide désoxyribonucléique</i>
Ag	<i>Antigène</i>
AIRE	<i>Auto-Immune REgulator</i>
ARD	<i>Site akyrine</i>
BCG	<i>Bacille de Calmete et Guérin</i>
BCR	<i>Récepteurs des Cellules B</i>
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
Ca	<i>Calcium</i>
CBNPC	<i>Cancer Bronchique Non à Petites Cellules</i>
CC	<i>Chemokine</i>
CCR	<i>Chemokine Receptor</i>
CD	<i>Cluster de Différenciation</i>
CMH	<i>Complexe Majeur d'Histocompatibilité</i>
CPA	<i>Cellule Présentatrice d'Antigène</i>
CRAC	<i>Calcium Release Activated Calcium Chanel</i>
CTL	<i>Lymphocyte T cytotoxique</i>
DAG	<i>Diacylglycérol</i>
DC	<i>Cellules dendritiques</i>
EBV	<i>Virus Epstein-Barr</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EMT	<i>Transition Épithélio-Mésenchymateuse</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FasL	<i>Fas-Ligand</i>
FAT	<i>Focal Adhesion-Targeting</i>
Fc	<i>Fragment constant</i>
FERM	<i>4.1 protéine, Ezrine, Radixine, Moesine</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
GADS	<i>GRB2 related adaptor protein downstream of Shc</i>
GAP	<i>GTPase-Activating Proteins</i>
GC	<i>Granules Cytotoxiques</i>
GEF	<i>Guanin-nucleotide Exchange Factor</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GSK3	<i>Glycogene synthase kinase 3</i>
GvHD	<i>réaction du greffon contre l'hôte</i>
HEV	<i>High Endothelial Venules</i>
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
ICAM	<i>Intracellular adhesion molecule</i>
IEL	<i>Lymphocytes intra-épithélial</i>
IFN	<i>Interferon</i>
Ig	<i>Immunoglobuline</i>
IGF-IIR	<i>Insulin-like Growth Factor II Receptor</i>
Ikk	<i>Inhibitor of κB kinase</i>
IL	<i>Interleukine</i>

ILC	<i>Innate Lymphoid Cells</i>
ILK	<i>Integrin Linked Kinase</i>
ILTC	<i>Innate Like T Cells</i>
IP3	<i>Inositol triphosphate</i>
IPP	<i>ILK/Pinch/Parvin</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif</i>
ITK	<i>Interleukin-2 inducible T-cell Kinase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinases</i>
KD	<i>Kinase Domain</i>
KIR	<i>Killer cell Immunoglobulin Receptor</i>
LAP	<i>Latency-Associated Peptide</i>
LAT	<i>Linker for Activation of T cells</i>
LB	<i>Lymphocyte B</i>
Lck	<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LFA-1	<i>Leukocyte function-associated antigen 1</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharides</i>
MacMARCKS	<i>Macrophage-enriched Myristoylated Alanine Rich C Kinase Substrat</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MC	<i>Microclusters</i>
MCA	<i>Methylcholanthrène</i>
MEC	<i>Matrice extracellulaire</i>
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
Mg	<i>Mangésium</i>
MIDAS	<i>Metal Ion Dependent Adhesion Site</i>
Mn	<i>Manganèse</i>
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
MTOC	<i>Centre réorganisateur de microtubules</i>
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NKT	<i>Natural killer T</i>
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
pCMH	<i>Complexe CMH/peptide antigénique</i>
PD-1	<i>Programmed Death 1</i>
PD-L1	<i>Programmed Death-Ligand 1</i>
PGSL1	<i>P-selectin Glycoprotein Ligand 1</i>
ph	<i>Pleckstrin Homology</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
PI9	<i>Proteinase Inhibitor 9</i>
PINCH	<i>Particularly Interesting New Cysteine-Histidine-rich protein</i>
PIP2	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i>
PIPγ-90	<i>Phosphatidylinositol phosphate kinase type I</i>
PKA	<i>Protéine Kinase dépendante d'AMPc</i>
PKC	<i>Protéine Kinase C</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PMA	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>
PNRC	<i>Perinuclear Recycling Compartments</i>
PRR	<i>Patern Recognition Receptor</i>
PSI	<i>Plexin-Semaphorin-Integrin</i>
PTB	<i>Phosphotyrosine-binding domain</i>

PTK	<i>Protein Tyrosine Kinase</i>
Pyk2	<i>Proline-rich tyrosine Kinase 2</i>
RE	<i>Reticulum endoplasmique</i>
RhoA	<i>Ras Homolog gene family, member A</i>
RIAM	<i>Rap1-GTP interacting adapter molecule</i>
SFK	<i>Protéines tyrosines Kinases de la famille Src</i>
sh	<i>Short hairpin</i>
SH domain	<i>Src Homology domain</i>
SI	<i>Synapse Immunologique</i>
SKAP-55	<i>Src Kinase-associated protein</i>
SLP	<i>Synaptotagmin and Synaptotagmin-Like Protein</i>
Smac	<i>Supramolecular Activation Cluster</i>
Snare	<i>Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor</i>
TAA	<i>Tumor Associated Antigen</i>
TAM	<i>Tumor Associated Macrophage</i>
TAP	<i>Transporter Associated with antigen Processing</i>
tBid	<i>truncated BID</i>
TCR	<i>Récepteur des cellules T</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
Th	<i>T Helper</i>
TIL	<i>Lymphocytes Infiltrant la Tumeur</i>
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
Treg	<i>Lymphocytes T régulateurs</i>
TRM	<i>Tissue Resident Memory</i>
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VLA-4	<i>Very Late Antigen 4</i>
WASP	<i>Wiskott–Aldrich Syndrome Protein</i>
WAVE	<i>WASp-family verprolin-homologous protein-2</i>
WD-WAIT-1	<i>WD protein associated with integrin tails</i>
WT	<i>Wild Type</i>
ZAP-70	<i>z-chain (TCR)-associated protein kinase 70kDa</i>

AVANT-PROPOS

Le système immunitaire protège l'hôte contre différentes maladies et pathogènes, auxquels nous sommes continuellement exposés. Il est aujourd'hui admis que les cellules tumorales sont « repérées » par les cellules du système immunitaire et éliminées avant qu'elles ne deviennent des tumeurs. Ce mécanisme est appelé, immunosurveillance antitumorale. Cependant, la faible efficacité du système immunitaire combinée à l'échappement des cellules tumorales, peut conduire à l'apparition de cancers. Différentes stratégies thérapeutiques ont été établies ces dernières décennies parmi lesquelles la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Cependant, dans certains types de cancers, notamment le cancer du poumon, qui est le plus fréquent et le plus mortel dû à une détection tardive, ces stratégies restent assez peu efficaces. L'immunothérapie a pris une place considérable dans les traitements actuels dont l'objectif est d'induire une réponse spécifique du système immunitaire contre la tumeur. Pour exercer leurs fonctions, les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) doivent être capables de migrer vers la tumeur, d'entrer dans le tissu tumoral, de traverser l'espace interstitiel et enfin d'interagir avec leurs cibles, conduisant ainsi au déclenchement de leur activité cytotoxique indispensable à la destruction de la tumeur. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement des réponses immunitaires spécifiques pour permettre la mise au point de nouvelles stratégies d'immunothérapie plus efficaces.

C'est dans ce contexte que mon laboratoire d'accueil s'est intéressé à l'intégrine $\alpha_E(\text{CD}103)\beta_7$ (appelée CD103) exprimée à la surface des CTL infiltrant les tumeurs épithéliales. Son interaction avec la E-cadhérine, un marqueur des cellules épithéliales, sur les cellules tumorales, entraîne la polarisation et l'exocytose des granules cytotoxiques menant à la mort des cellules cibles. Ainsi, l'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier la signalisation de CD103 afin, à plus long terme, d'optimiser la réponse cytotoxique des lymphocytes T $\text{CD}8^+$ antitumoraux. La première partie de ce manuscrit présente les connaissances actuelles dans le domaine de l'immunité antitumorale ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse cytotoxique des lymphocytes T $\text{CD}8^+$. La seconde partie expose les résultats suivis d'une discussion.

INTRODUCTION

I. IMMUNITÉ ANTITUMORALE

Le système immunitaire est au cœur du contrôle de la majorité des tumeurs. Les cellules du système immunitaire circulent dans le sang et assurent une surveillance continue afin de détecter et d'éliminer les cellules anormales. Lorsque la surveillance immunitaire est déficiente ou surchargée, les tumeurs parviennent à se développer. Ceci est notamment valable à la phase initiale d'émergence des tumeurs, mais l'infiltration tumorale par des lymphocytes à un stade plus évolué reste un facteur pronostic important pour plusieurs tumeurs (Galon et al., 2012).

1. Immunosurveillance

1.1 Origine de l'immunosurveillance

La compréhension de l'impact du système immunitaire sur le processus de tumorigénèse captive depuis plus d'un siècle. Les premières observations de l'implication du système immunitaire dans la lutte contre les cellules tumorales datent du XIX^{ème} siècle. Elles ont été réalisées par William Coley, chirurgien des os et cancérologue, et indiquent des régressions d'ostéosarcome, tumeur des os agressive, chez des patients atteints d'érysipèle, une infection aiguë. L'injection d'un cocktail de bactéries inactivées fait aussi régresser les tumeurs, grâce à la réaction inflammatoire et l'activation du système immunitaire dont l'agressivité se dirige vers les cellules tumorales. Aujourd'hui, et depuis environ 40 ans, le traitement standard du cancer de la vessie consiste en l'injection répétée de bacille du BCG (Bacille de Calmette et Guérin) dans la vessie.

C'est au milieu du XX^e siècle que Medawar et ses collaborateurs démontrèrent l'implication d'une composante cellulaire dans le rejet de greffe allogénique, renforçant ainsi la théorie de l'immunosurveillance antitumorale. La présence de structures spécifiquement présentes à la surface des cellules tumorales pouvant être reconnues par le système immunitaire va de pair avec l'idée que ce dernier puisse stopper la prolifération des cellules anormales. Le concept de l'immunosurveillance des tumeurs a tout d'abord été énoncé par Ehrlich au début du XX^e siècle, puis approfondi par Burnet et Thomas en 1959. Ils ont émis l'hypothèse que le système immunitaire, et notamment les lymphocytes, jouent un rôle majeur dans la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales. Des expériences réalisées sur des souris syngéniques ont pu montrer que les tumeurs transplantées sont rejetées, à l'inverse des cellules normales (Billingham et al., 2010). De plus, les travaux de Boon, qui consistaient à cultiver *in vitro* des cellules issues d'une tumeur primaire avec des lymphocytes du sang

périphérique du même patient, ont permis de mettre en évidence la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire, démontrant ainsi l'existence d'antigènes (Ag) associés aux tumeurs (*Tumor Associated Antigens*, TAA) (van der Bruggen et al., 1991).

1.2 Arguments expérimentaux

Afin d'étudier le rôle du système immunitaire dans le contrôle de la prolifération des cellules tumorales, des souris immunodéficientes (*nude*) ont été utilisées comme modèle expérimental dans les années 1970. Aucune progression de tumeurs après exposition des souris *nude* ou sauvages (*Wild Type*, WT) à des agents chimiques n'a été observée (Rygaard and Povlsen, 1974; Stutman, 1974). De la même manière, la formation de tumeurs spontanées était similaire dans les deux groupes de souris. Le concept d'immunosurveillance est alors remis en cause, jusqu'au développement de souris totalement immunodéficientes. Il a en effet été découvert que les souris *nude* étaient un modèle imparfait car, malgré un nombre réduit, les souris possèdent tout de même des cellules NK (*Natural killer*) (Herberman and Holden, 1978; Maleckar and Sherman, 1987). Plus récemment, en 2001, Shankran a montré que les lymphocytes T et l'IFN- γ collaborent pour empêcher le développement de sarcomes induits par des carcinogènes et des carcinomes épithéliaux spontanés ainsi que pour sélectionner des cellules tumorales à immunogénicité réduite (Shankaran et al., 2001). Les souris déficientes pour les molécules Rag-2 sont incapables de réarranger les récepteurs spécifiques d'Ag (TCR, *T-cell Receptor* et BCR, *B-cell Receptor*) et n'expriment donc plus de cellules B, T et NKT. Ces souris Rag2^{-/-} développent plus rapidement et plus fréquemment des sarcomes induits par méthylcholanthrène (MCA) comparées aux souris sauvages (Figure 1). Par ailleurs, lorsque des tumeurs dérivées de souris Rag2^{-/-} sont transplantées dans des souris immunocompétentes, seulement 40% d'entre elles sont rejetées. À l'inverse, 100% des tumeurs dérivées de souris immunocompétentes progressent chez les souris sauvages et Rag2^{-/-}.

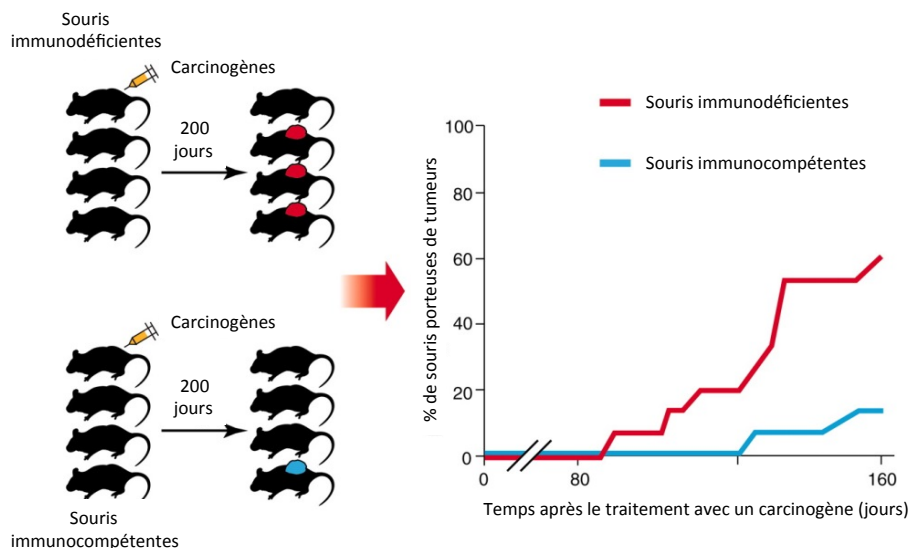


Figure 1 : Susceptibilité des souris aux tumeurs selon leur statut immunitaire

De nombreuses études ont démontré que les souris immunodéficientes développent plus de tumeurs que les souris immunocompétentes après traitement avec un carcinogène (Schreiber et al., 2011).

Les sarcomes dérivés de souris immunodéficientes sont plus immunogéniques que ceux qui proviennent de souris immunocompétentes, mettant en évidence le concept d'*immunoediting*. D'autres études chez la souris ont pu montrer que la déplétion de populations lymphocytaires $T\alpha\beta$ et $T\gamma\delta$ augmentait le nombre de sarcomes induits par le MCA par rapport aux souris non traitées, montrant le rôle de ces lymphocytes dans le contrôle des tumeurs induites par le MCA (Girardi et al., 2003; Girardi et al., 2001). Il en est de même pour les cellules NKT et NK puisque les souris déficientes en CD1d ou en cellules NK présentent un nombre plus élevé de tumeurs.

Des souris hétérozygotes $p53^{+/-}$ et déficientes pour le récepteur à l'IFN- γ (Kaplan et al., 1998) ou pour la perforine, contenu dans les granules cytotoxiques (GC) (Street et al., 2001), montrent une forte sensibilité aux agents chimiques et développent des tumeurs plus rapidement que les souris sauvages. Plus récemment, il a été montré dans un modèle murin que la transformation cellulaire déclenche l'expansion précoce de CTL non circulants ($NK1.1^+ CD49a^+ CD103^+$) résidents dans les tissus. Ces lymphocytes, distincts des cellules NK, T et iNKT (*invariant* NKT), sont dépendants de l'IL-15. Il s'agit des cellules ILC1 (*Type 1-like Innate Lymphoid Cells*) et d'ILTC1 (*Type 1 innate-like T cells*) qui semblent donc être impliquées dans le mécanisme d'immunosurveillance (Dadi et al., 2016). D'autres observations suggèrent que des progéniteurs myéloïdes précoces (progéniteurs de granulocytes-macrophages et progéniteurs lymphoïdes communs) provenant de souris porteuses de tumeurs, ont une capacité immunosuppressive importante et sont ainsi capables de réguler négativement l'immunosurveillance antitumorale (Pu et al., 2016).

1.3 Arguments épidémiologiques et cliniques

Chez l'Homme, différentes preuves épidémiologiques de l'immunosurveillance ont été établies. Le système immunitaire chez les enfants en bas âge ou chez les personnes âgées est plus faible, et c'est à ces âges que l'on retrouve le plus de cancers. De plus, l'incidence et le risque de cancer sont plus élevés chez les patients ayant subi une greffe d'organe, par rapport à la population générale (Gutierrez-Dalmau and Campistol, 2007). En effet, ces patients sont traités avec une combinaison d'immunosuppresseurs nécessaire pour la réalisation de la greffe. Les cancers cutanés et les lymphomes post-transplantation sont les plus fréquemment rencontrés chez les patients transplantés. Une augmentation de l'incidence du cancer est aussi retrouvée chez les patients atteints du VIH, virus qui affaiblit le système immunitaire (Boshoff and Weiss, 2002). L'ensemble de ces observations conforte l'hypothèse du rôle potentiel du système immunitaire dans la suppression précoce des cellules transformées.

Des régressions spontanées, partielles ou complètes, ont été observées chez 1 à 2% des patients atteints de cancer du rein ou de mélanome. L'implication d'une réaction lymphocytaire cytotoxique dirigée contre les cellules tumorales a été démontrée dans certains cas, suggérant leur implication dans la régression tumorale. De plus, des travaux plus récents ont montré une corrélation entre la présence d'infiltrat immunitaire et le bon pronostic clinique des tumeurs colorectales (Galon et al., 2006).

Le système immunitaire fonctionne ainsi comme un système suppresseur de tumeur. Cependant, ce procédé conduit à l'immunosélection de cellules tumorales capables de survivre et d'échapper au système immunitaire, expliquant le paradoxe de la formation de tumeur chez des individus immunocompétents.

1.4 Bases moléculaires de l'immunosurveillance et immunoediting

Schreiber a revisité le concept de l'immunosurveillance avec la théorie des 3 E, décomposant ainsi la progression tumorale en trois phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement (Dunn et al., 2004) (Figure 2). La phase d'élimination correspond au concept de l'immunosurveillance durant laquelle le système immunitaire détruit les cellules tumorales. Si les cellules de l'immunité ne parviennent pas à détruire toutes les cellules tumorales, une phase d'équilibre est ensuite atteinte, où la prolifération de la tumeur est maîtrisée, sans éradication complète. Le microenvironnement se met en place déclenchant des signaux inflammatoires qui aboutissent au recrutement des cellules du système immunitaire, telles que les cellules NK, les lymphocytes T, les macrophages et les cellules dendritiques (DC) (Girardi et al., 2001; Matzinger, 1994). Une pression de sélection exercée par les lymphocytes T va

entraîner la génération de cellules tumorales instables génétiquement, permettant l'apparition de variants tumoraux capables d'échapper au système immunitaire en étant faiblement immunogènes. Lors de cette phase d'échappement, seules les cellules tumorales résistantes à la lyse par les cellules du système immunitaire sont sélectionnées. Celui-ci pourrait donc jouer un rôle de « cancer *immunoediting* », permettant d'expliquer les phénomènes d'échappement tumoral chez un individu immunocompétent, résultant de plusieurs mécanismes différents (Khong and Restifo, 2002).

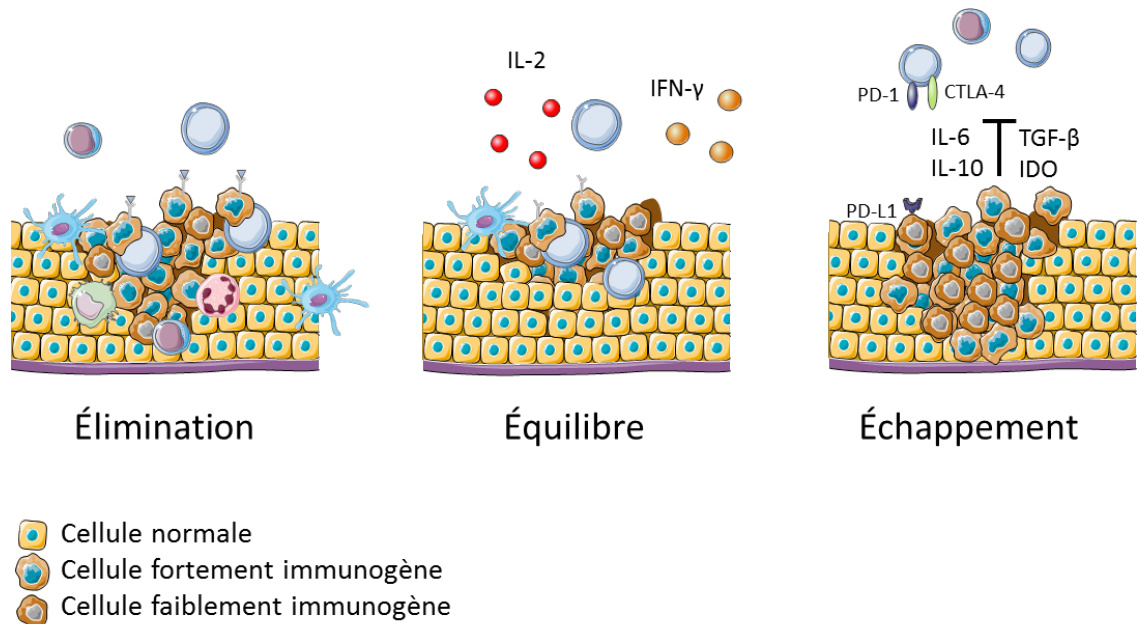


Figure 2 : Règle des 3 E : élimination, équilibre et échappement

La phase d'élimination correspond à la destruction des cellules tumorales par le système immunitaire dans le but d'empêcher le développement d'une tumeur. Si toutes les cellules tumorales ne sont pas éliminées, un état d'équilibre est atteint entre les cellules du système immunitaire et les cellules cancéreuses, les cellules immunitaires contrôlent la prolifération sans éradiquer la tumeur. Une pression de sélection est alors exercée qui aboutit à l'émergence de variants tumoraux résistants. La phase d'échappement est alors observée et les cellules tumorales vont échapper au système immunitaire et proliférer de manière incontrôlée.

2. Circulation lymphocytaire et diapédèse : deux étapes nécessaires à l'immunosurveillance

La circulation des cellules du système immunitaire est essentielle à l'immunosurveillance. Ces cellules circulent dans les organes lymphoïdes et dans les tissus périphériques. Le déclenchement de la réponse immunitaire se déroule au niveau des tissus lymphoïdes secondaires et des vaisseaux lymphatiques reliant les différents tissus au flux sanguin. La production et la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ ayant lieu dans les tissus lymphoïdes primaires, la migration des lymphocytes est nécessaire afin qu'ils rencontrent une cellule présentatrice d'antigène (CPA) présentant un peptide antigénique. La faible fréquence de précurseurs naïfs rend la probabilité de rencontre très faible (Blattman et al., 2002). La

migration vers les organes lymphoïdes secondaires se déroule en plusieurs étapes successives : le *rolling* des lymphocytes T sur les cellules endothéliales, leur ralentissement puis l'extravasation à travers l'endothélium pour rejoindre les organes lymphoïdes et les tissus (Figure 3). La mobilité des cellules est régulée par les chimiokines et leurs récepteurs, les molécules d'adhésion telles que les intégrines et sélectines, mais également par des changements morphologiques liés au cytosquelette. Les intégrines jouent un rôle essentiel dans l'adhésion et la rétention des cellules T dans les tissus.

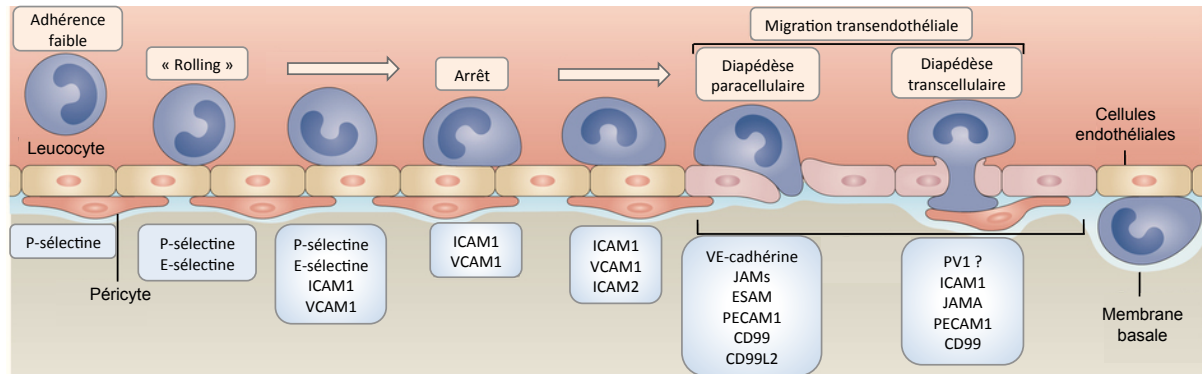


Figure 3 : Étapes séquentielles de l'extravasation des leucocytes dans les tissus

De nombreux récepteurs exprimés à la surface des cellules endothéliales vont permettre la capture, le *rolling* et l'arrêt des leucocytes. Ces étapes précèdent l'étape de transmigration à travers la barrière endothéliale, appelée diapédèse. (Vestweber, 2015).

L'attachement du leucocyte à la surface de l'endothélium a lieu grâce à l'interaction entre la L-sélectine et son ligand exprimé sur les cellules endothéliales la PGSL1 (*P-selectin glycoprotein ligand 1*). Par la suite, une adhésion transitoire et de faible intensité a lieu dans le but de ralentir les leucocytes. Après ces étapes d'attachement et de *rolling* du leucocyte sur l'endothélium, une étape d'adhésion ferme a lieu. Celle-ci implique l'interaction des intégrines leucocytaires VLA-4 (*Very Late Antigen 4*, $\alpha_4\beta_1$) et LFA-1 (*Leukocyte function-associated antigen 1*, $\alpha_L\beta_2$) avec leurs ligands respectifs VCAM-1 et ICAM-1. Les intégrines sont liées aux filaments d'actine, et grâce à leur queue cytoplasmique et à une cascade de signalisation impliquant entre autre α -PIX, Rac et Cdc42, la polymérisation de l'actine peut avoir lieu (Brakebusch and Fassler, 2003). L'adhésion est augmentée grâce à l'interaction des récepteurs aux chimiokines comme CXCR4, le récepteur de la chimiokine CXCL12 (Stein et al., 2000). Durant cette étape, les lymphocytes T vont s'étaler sur les cellules endothéliales et se polariser. La symétrie est perdue et la première étape est la redistribution des filaments d'actine qui va se concentrer au front de migration. Trois zones sont distinguées dans la cellule en mouvement :

- À l'avant, le front de migration (appelé *leading edge*) correspond à un large lamellipode. Cette zone dynamique contient des récepteurs aux chimiokines, les intégrines, des protéines de liaison à l'actine et l'actine.
- La zone centrale : le corps cellulaire avec le noyau et le centre réorganisateur de microtubules (MTOC) situé entre l'uropode et le corps cellulaire.
- L'uropode, composé de nombreux éléments du cytosquelette comme l'actine ou la tubuline.

La cellule T adopte un déplacement de type amiboïde, une migration rapide et dynamique avec une alternance d'extension de l'avant de la cellule et de rétraction de l'uropode. La succession de ces mouvements est régulée par des cycles de polymérisation et de contraction de l'acto-myosine. La cellule est alors capable de se déplacer à une vitesse de 30 $\mu\text{m}/\text{min}$, et ce sans dégradation du tissu ou de la matrice, lui permettant ainsi de trouver sa cellule cible en des temps relativement courts.

3. Le cycle de la réponse immunitaire antitumorale

Les lymphocytes T CD8⁺ sont les principaux acteurs de la réponse immunitaire antitumorale. Les cellules de l'immunité innée (macrophages et NK) recrutées dans la tumeur lysent les cellules tumorales et permettent ainsi le relargage de TAA. Ces derniers vont alors être phagocytés par les DC immatures présentes dans le microenvironnement tumoral. Celles-ci vont subir une maturation et migrer vers le ganglion lymphatique où elles vont être capables d'activer les lymphocytes T spécifiques de la tumeur. À leur tour, les lymphocytes T vont migrer vers le site tumoral et induire la mort des cellules tumorales de manière spécifique (Figure 4).

Les CPA sont essentielles pour établir le lien entre la réponse innée et adaptative, et sont responsables de la présentation de l'antigène aux lymphocytes T afin de conduire à leur activation.

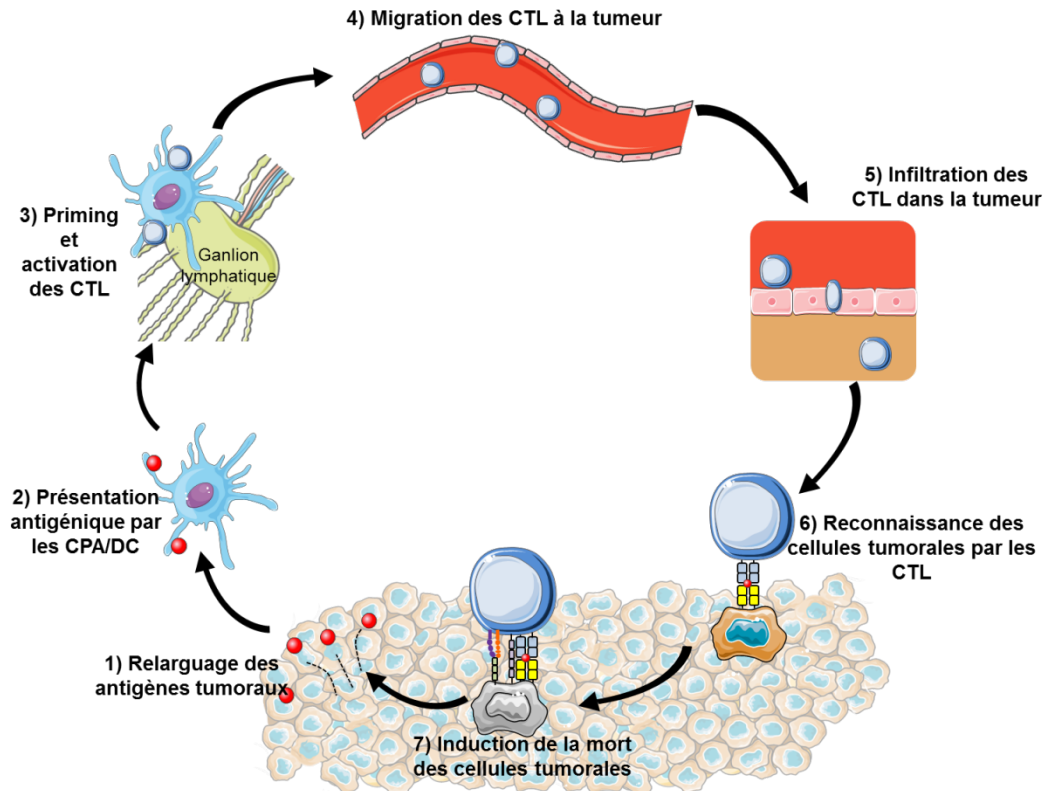


Figure 4 : Le cycle de la réponse immunitaire antitumorale

La génération d'une immunité antitumorale est un processus cyclique conduisant à une accumulation de facteurs immunostimulants permettant d'amplifier les réponses lymphocytaires T. La présence de facteurs inhibiteurs peut limiter la réaction immunitaire. On distingue sept étapes dans le cycle de la réponse antitumorale de la libération d'antigènes tumoraux à la lyse de la cellule tumorale. Adaptée de (Chen and Mellman, 2013).

3.1 Les DC, à l'interface entre l'immunité innée et adaptative

Les cellules dendritiques (DC) furent observées pour la première fois par Langerhans en 1868, au sein d'un épithélium cutané. Ce n'est que cent ans plus tard que Steinman a pu caractériser ces cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles : les DC. Ces cellules, qui proviennent d'un progéniteur hématopoïétique, sont présentes dans tout l'organisme sous forme immature, et prédominent dans la peau (cellules de Langerhans). Le progéniteur des DC génère soit des DC myéloïdes, $CD11c^+ CD123^{low}$, considérées comme les CPA professionnelles et sécrétant de l'IL-12, soit des DC plasmacytoïdes, $CD11c^- CD123^{high}$ et produisant de l'IFN. Les DC exercent un rôle de sentinelles en contrôlant continuellement les tissus. Les molécules et antigènes microbiens sont internalisés par les DC par différents mécanismes : l'endocytose, la phagocytose ou la pinocytose. Les DC immatures expriment différents récepteurs permettant l'endocytose, notamment le récepteur du mannose qui peut lier des glycoprotéines mannosylées exprimées par de multiples microorganismes. Elles expriment aussi les récepteurs pour le fragment constant (FcR) des IgG et IgE, les récepteurs

scavengers, et les récepteurs de la famille des lectines C. Les Ag internalisés sont ensuite apprêtés afin d'être présentés sous forme de peptides antigéniques aux lymphocytes T naïfs dans les organes lymphoïdes secondaires. Au cours de l'internalisation de l'Ag, les propriétés d'endocytose et de phagocytose sont perdues. À l'inverse, les molécules de costimulation telles que CD40, CD80, CD86, CMH-II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II), impliquées dans les interactions avec les lymphocytes T, sont surexprimées (Sallusto et al., 1999). Les DC sont les seules CPA capables de stimuler les lymphocytes T naïfs. En fonction des interactions cellulaires et des cytokines présentes dans le microenvironnement, les DC entrent dans un programme spécifique de maturation induisant différents types de réponses T. Ces cellules constituent donc l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

La maturation et la migration des DC vers les ganglions lymphatiques s'effectuent de manière simultanée. Plusieurs événements coordonnés ont lieu lors de la maturation. On distingue des changements de morphologie, de cytosquelette et de mobilité cellulaire permettant aux DC de migrer vers les ganglions lymphatiques.

D'autres changements phénotypiques et fonctionnels sont observés notamment la perte des récepteurs impliqués dans les processus de phagocytose et endocytose, la surexpression des molécules de costimulation et d'adhérence, la sécrétion de chimiokines, la translocation des complexes p-CMH à la surface et la sécrétion de cytokines permettant la polarisation des effecteurs immunitaires. La maturation est aussi associée à la diminution d'expression des récepteurs de chimiokines inflammatoires et l'expression *de novo* du récepteur de chimiokines CCR7, qui reconnaît les chimiokines CCL19 et CCL21 secrétées dans les zones riches en lymphocytes T des organes lymphoïdes secondaires. Les DC quittent alors les tissus inflammatoires et entrent dans la circulation lymphatique vers les ganglions lymphatiques drainants. L'engagement du TCR, associé au complexe CD3, avec le complexe p-CMH sur les DC, ainsi que les molécules de costimulation vont ainsi permettre de délivrer aux lymphocytes T les signaux de différenciation, d'activation et de prolifération.

3.2 Les lymphocytes au cœur de la réponse immunitaire antitumorale

Les lymphocytes T sont des petits leucocytes (7-9 μm de diamètre) qui se développent à partir de précurseurs dans les organes lymphoïdes primaires : la moelle osseuse et le thymus. Ils représentent 20 à 30% des leucocytes du sang périphérique. Ce sont des médiateurs essentiels de l'immunité adaptative car ils expriment des récepteurs spécifiques d'Ag, le TCR, leur permettant de reconnaître les antigènes présentés par les molécules de CMH à la surface des CPA. Une fois matures, ils vont rejoindre la circulation sanguine puis les organes

lymphoïdes périphériques à la recherche des Ag et vont retourner dans la circulation (sang et lymph) pour assurer le contrôle et l'élimination des cellules infectées ou transformées. Il existe plusieurs types de lymphocytes T, définis par leurs fonctions et leurs marqueurs membranaires. Les lymphocytes T $CD4^+$, dits auxiliaires ou *helper* (Th), capables de produire un large répertoire de cytokines et reconnaissant les peptides antigéniques présentés par le CMH-II, et les lymphocytes T $CD8^+$, dits cytotoxiques, qui reconnaissent les antigènes présentés par les molécules du CMH de classe I. Ils sont essentiels pour la mise en place d'une réponse immunitaire antitumorale efficace. Une fois recrutés et activés au site tumoral, ils peuvent agir par différentes voies pour induire la mort des cellules cibles.

4. Développement des lymphocytes T effecteurs

Les progéniteurs des cellules T ou pro-thymocytes, proviennent de la moelle osseuse et vont rejoindre le thymus par la circulation sanguine, leur permettant de se développer pour donner naissance à des lymphocytes T matures dits naïfs. Ces progéniteurs, jusqu'alors $CD4^-CD8^-CD3^-$ sont capables de se différencier en lymphocytes T, lymphocytes B (LB) ou cellules NK et vont subir des modifications phénotypiques. Une fois au thymus, ils vont recevoir un signal *via* le récepteur Notch qui va les orienter vers la lignée T, alors appelée thymocytes. Les gènes codant pour les chaînes du TCR vont se réarranger, aboutissant à la formation d'un pré-TCR puis d'un TCR mature permettant aux thymocytes d'interagir avec les autres cellules du thymus. Le but final est de produire des lymphocytes T susceptibles de reconnaître des antigènes du non-soi et ne réagissant pas avec des antigènes du soi. En premier lieu, une sélection positive des thymocytes, alors doubles positifs $CD4^+CD8^+$, a lieu au niveau du cortex, composée de cellules épithéliales qui présentent les molécules du CMH du soi. Le thymocyte reçoit un signal de survie uniquement lorsque la reconnaissance de la molécule du CMH se fait avec une faible affinité. Si la reconnaissance est de forte affinité, le thymocyte est considéré comme délétère pour le soi. Cette étape permet aussi l'élimination des lymphocytes T incapables de reconnaître le complexe p-CMH, on parle de reconnaissance restreinte par les molécules du CMH. Puis, au niveau de la médulla, ils vont rencontrer des DC et subir la sélection dite négative. Les cellules épithéliales thymiques médullaires expriment un facteur de transcription AIRE (*Auto-Immune-Regulator-Element*) permettant l'expression de peptides du soi qui seront internalisés par les DC. Les cellules recevant un signal trop intense via le TCR sont éliminées. Suite à cette succession d'étapes, les thymocytes donnent naissance à des lymphocytes T naïfs $CD4^+$ ou $CD8^+$ qui quittent le thymus par les

vaisseaux de la jonction cortico-médullaire. Le lymphocyte ne subira plus de mutation somatique ou de réarrangement des gènes du TCR.

4.1 Différenciation des lymphocytes T CD8⁺ en effecteurs cytotoxiques

Les lymphocytes T CD8⁺, principaux acteurs de la réponse immunitaire antitumorale spécifique, sont capables, suite à la reconnaissance du complexe p-CMH-I par leur TCR, d'accomplir leurs fonctions cytotoxiques. Pour accomplir ces fonctions, les lymphocytes T subissent une différenciation au cours de laquelle ils acquièrent leur fonction cytotoxique et sécrètent de cytokines comme l'IFN- γ . On distingue quatre sous-populations de lymphocytes T CD8⁺ : naïfs, effecteurs, effecteurs/mémoires et mémoires, chacun ayant des propriétés phénotypiques et fonctionnelles qui leurs sont propres. La rencontre du lymphocyte T naïf (CD45RA⁺/CCR7⁺/CD27⁺/CD28⁺) avec le complexe p-CMH-I à la surface des CPA professionnelles a lieu dans les tissus lymphoïdes. L'engagement du TCR entraîne l'expansion du lymphocyte. Les lymphocytes, alors effecteurs (CD45RA⁺/CCR7⁻/CD27⁻/CD28⁻), deviennent capables d'exprimer les molécules cytotoxiques nécessaires à la lyse de la cellule cible et perdent leur capacité de *homing* au niveau des ganglions lymphatiques (CCR7⁻/CD62L⁻). À l'inverse, ils expriment désormais des molécules d'adhésion telles que CD44 ou les intégrines β_1 et β_2 , ainsi que des récepteurs aux chimiokines inflammatoires tels que CCR5 et CCR2 (Kaech et al., 2002), leur permettant de migrer vers les tissus, au niveau des sites inflammatoires ou tumoraux. La fixation des chimiokines sur leurs récepteurs induit l'activation des intégrines telles que LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$) et l'expression de VLA-4, permettant l'adhésion des lymphocytes. L'expansion clonale qui fait suite à l'engagement du TCR est suivie par une phase de déclin au cours de laquelle la plupart des cellules activées vont rentrer en apoptose (Murali-Krishna et al., 1998). En effet, l'équilibre du compartiment lymphocytaire T doit être rétabli. Après élimination de l'antigène, la constitution d'un répertoire de cellules T mémoire est nécessaire pour permettre une réponse immunitaire plus rapide et plus efficace lors d'une réexposition à l'antigène. Ces cellules mémoires pourront résider dans les organes lymphoïdes secondaires. On distingue trois types de cellules mémoires selon la présence ou l'absence des molécules CCR7, CD62L et CD45RA. Les cellules T mémoires centrales (T_{CM}), CCR7⁺/CD45RA⁻/CD62L^{high} constituent un réservoir pour la génération rapide de nouvelles cellules T effectrices lors d'une nouvelle exposition à l'antigène. Les cellules mémoires effectrices (T_{EM}) sont quant à elles CCR7⁻/CD45RA⁻/CD62L^{low} et sont localisées dans les tissus périphériques et dans la circulation sanguine et lymphatique, prêtes à être déployées en cas de réinfection. Elles possèdent une grande

capacité proliférative et sécrètent rapidement des cytokines et des granules cytotoxiques après leur réactivation. Récemment, une troisième population de cellules mémoires a été décrite : les cellules mémoires résidentes dans le tissu (T_{RM}). Ces T_{RM} sont localisées dans la peau et les muqueuses et constituent ainsi une première ligne de défense contre toute réinfection locale (Gebhardt et al., 2009). Il a été montré que ces cellules sont capables de se mobiliser plus rapidement que les cellules de l'immunité innée, en produisant de l'IFN- γ . Les propriétés de ces T_{RM} seront décrites plus en détail dans le chapitre III.6.4.

4.2 Migration des cellules effectrices vers la cible

Les lymphocytes T activés suite à l'engagement du TCR (signal n°1), de signaux de costimulation (signal n°2) et des cytokines inflammatoires (signal n°3) vont perdre l'expression de CD62L et devenir incapables d'entrer dans les ganglions lymphatiques par les HEV. Les lymphocytes T effecteurs vont alors exprimer un ensemble de protéines contrôlant leur migration et localisation. La combinaison récepteurs - ligands exprimée par les cellules endothéliales et les T $CD8^+$ va réguler le recrutement spécifique dans le tissu où a lieu l'inflammation.

L'inflammation liée au développement tumoral conduit à l'infiltration des cellules effectrices dans le tissu, et notamment les lymphocytes T $CD8^+$. Après avoir franchi l'endothélium par transmigration, les lymphocytes se retrouvent dans un environnement riche en fibres de collagènes et autres composants, et se déplacent sur la matrice extracellulaire (MEC) et au niveau des jonctions entre cellules tumorales. Divers modèles, 2D ou 3D, *in vitro* ou *in vivo*, ont permis d'apporter des éléments nouveaux sur la migration et notamment sur le rôle des intégrines et du TCR dans ce phénomène.

Un modèle des différentes phases de migration des TIL a été proposé (Ng et al., 2008). Les CTL au sein des tumeurs sont initialement localisés à la périphérie avant de s'infiltrer au centre du tissu tumoral de manière dépendante de l'Ag (Boissonnas et al., 2007). Les CTL non spécifiques sont eux, incapables de migrer au sein de la tumeur. Les lymphocytes T périphériques sont capables de se déplacer à une vitesse rapide, grâce aux interactions des intégrines et de la MEC, jusqu'à la reconnaissance du peptide antigénique induisant l'arrêt de leur migration. Des interactions de durée variable, avec les cellules cibles, permettent aux TIL d'induire la lyse des cellules tumorales. Par microscope biphotonique, il a été montré que les phénomènes de recherche de cible par les lymphocytes sont similaires à ceux se déroulant dans les ganglions lymphatiques. Certains lymphocytes établissent des contacts séquentiels transitoires avec les cellules cibles, alors que d'autres interagissent de manière prolongée (plus

de 30 min) (Mrass et al., 2006), probablement pour l'induction de la mort de la cellule cible (Breart et al., 2008). Après la lyse de la cellule cible, les TIL se détachent des cellules tumorales, et poursuivent alors leur migration, de manière dépendante du TCR. Il semble que 6 heures soient nécessaires pour que le CTL soit capable de lyser une seconde cellule cible.

L'environnement rencontré par un lymphocyte T effecteur ou mémoire est différent de celui trouvé dans les organes lymphoïdes secondaires. En effet, il a été montré que la présence de fibres de collagène ou de protéines de la matrice extracellulaire jouait un rôle essentiel dans l'activation des cellules T. Les récepteurs au collagène, $\alpha_1\beta_1$ (CD49a) et $\alpha_2\beta_1$, sur les lymphocytes T activés, pourraient contribuer à retenir le lymphocyte dans le tissu afin de permettre son activation (Dustin and de Fougères, 2001; Salerno et al., 2014). Une fois que le lymphocyte T a pénétré dans le tissu, des modifications de l'expression des intégrines à la surface des lymphocytes T peuvent avoir lieu et sont essentielles pour la localisation, la rétention et les fonctions effectrices du lymphocyte T.

Des études contradictoires ont été effectuées sur le rôle des intégrines dans la migration cellulaire à travers une matrice de collagène. Des anticorps bloquants spécifiques des intégrines β_1 , β_2 , β_3 et α_V n'ont pas altéré le mouvement de cellules T dans des gels de collagène (Friedl et al., 1998). Par ailleurs, des DC de souris n'exprimant pas d'intégrines n'ont pas de défaut de migration *in vitro* ou *in vivo* (Lammermann et al., 2008). Ceci peut être expliqué par la contraction du cytosquelette d'actine qui conduit la cellule vers l'avant. Ces résultats suggèrent que les intégrines joueraient un rôle de rétention plutôt que de migration. Cette hypothèse est notamment appuyée par une étude montrant que l'expression des intégrines $\alpha_E\beta_7$, $\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_2\beta_1$ est significativement augmentée dans des métastases de mélanomes (Salerno et al., 2014). Il a été montré que dans les ganglions lymphatiques, les intégrines ne sont pas requises pour la migration interstitielle, tandis qu'elles semblent nécessaires pour la migration dans les tissus présentant une réaction inflammatoire (Overstreet et al., 2013). De plus, des études ont montré que des Ac dirigés contre des intégrines bloquaient la migration des lymphocytes (Schmidt and Friedl, 2010). Par exemple, un Ac monoclonal anti α_4 bloque la migration des leucocytes à travers la barrière hémato-encéphalique (O'Connor, 2007).

5. Les chimiokines dans la réponse immunitaire

Les cellules du système immunitaire peuvent communiquer non seulement par contact membranaire direct mais aussi grâce à des médiateurs solubles. Les cytokines, des glycoprotéines de faible poids moléculaire, sont produites et sécrétées par de nombreux types

cellulaires et permettent un dialogue intercellulaire nécessaire dans la régulation des fonctions biologiques telles que la prolifération, la différenciation, l'activation, la survie ou la mort cellulaire. Ces facteurs solubles sont essentiels dans les différentes fonctions des lymphocytes T et notamment pour la lyse des cellules tumorales par les lymphocytes T CD8⁺. L'activation des CTL par les cytokines peut se faire par différentes voies : autocrine, paracrine ou endocrine. Quel que soit le mode d'action, les cytokines doivent se fixer à des récepteurs membranaires spécifiques couplés aux protéines G afin d'induire une réponse inflammatoire efficace. Les cytokines sont un ensemble hétérogène de molécules, parmi lesquelles on trouve les plus connues : les interleukines, les facteurs de croissance, les interférons, les TNF (*Tumor Necrosis Factor*) et les chimiokines. Ce sont ces dernières que je détaillerai dans cette partie.

5.1 Les chimiokines et leurs récepteurs

Les chimiokines sont des cytokines ayant un pouvoir chimioattractant (*chemotactic cytokines*) contrôlant la migration des cellules entre les tissus ainsi que le positionnement et l'interaction des cellules dans un tissu. Elles sont impliquées dans la circulation, le *homing*, la rétention et l'activation des cellules immunitaires. Dans un contexte tumoral, les chimiokines sont essentielles pour permettre la migration et l'infiltration des effecteurs cytotoxiques au site tumoral. Bien que certaines d'entre elles contribuent à la croissance tumorale et à la formation de métastases, d'autres jouent un rôle antitumoral et permettent l'infiltration des lymphocytes au sein de la tumeur.

Il existe une cinquantaine de chimiokines réparties en 4 familles selon le nombre d'acides aminés présents entre les deux premières cystéines du domaine N-terminal (CC, CXC, CX3C et C), et une vingtaine de récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (Balkwill, 2012). Une chimiokine peut se fixer à plusieurs récepteurs, et plusieurs chimiokines peuvent se fixer sur un même récepteur. CXCR4 est le récepteur le plus largement exprimé à la surface des leucocytes. On le retrouve à la surface des lymphocytes T, LB, monocytes, neutrophiles et DC.

Grâce au déclenchement de signaux intracellulaires, les chimiokines peuvent agir sur la polarisation, la migration et l'adhérence des cellules immunitaires. La liaison d'une chimiokine à son récepteur active une molécule effectrice, généralement une phospholipase C (PLC) qui génère de l'inositol triphosphaste (IP3) et du diacylglycéril (DAG) induisant une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire et l'activation de la PKC (Figure 5). L'activation des GTPases conduit à la restructuration du cytosquelette et à des modifications morphologiques impliquant les capacités migratoire et adhésive.

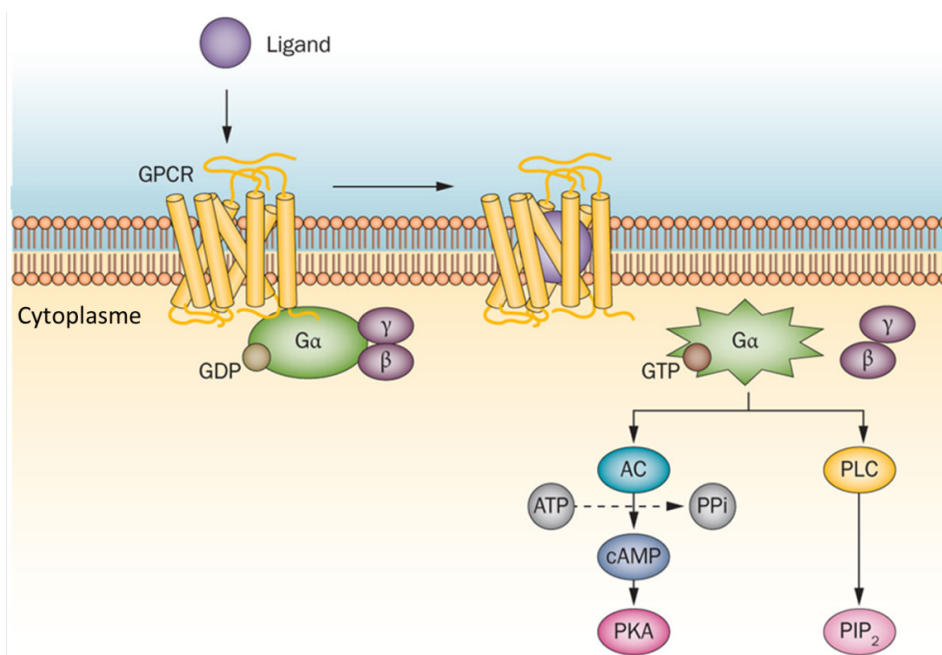


Figure 5 : Activation et désactivation d'un récepteur couplé aux protéines G

La liaison d'un ligand au récepteur inactif induit chez ce dernier des changements conformationnels qui sont transmis à la protéine G associée. Un échange GDP/GTP a lieu au niveau de la sous unité G qui entraîne la dissociation des sous unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ et l'activation de messagers secondaires ayant des propriétés biologiques spécifiques : G_{ai} , inhibition de l'adénylate cyclase (AC); G_{as} , activation de l'AC; G_{aq} , activation des phospholipases C (PLC) ; G_{a12} , activation des GTPases Rho ; $G\beta\gamma$, activation des PLC et des phosphoinositide-3-kinase (PI3K). L'activité GTPase de $G\alpha$, inhibée par sa liaison au complexe $G\beta\gamma$, permet l'hydrolyse spontanée du GTP en GDP+Pi et le retour à l'état inactif du récepteur. (Neumann et al., 2014)

5.2 Migration des CTL au site tumoral grâce aux chimiokines

Une fois activés dans les ganglions lymphatiques, les lymphocytes effecteurs vont migrer vers le site tumoral. La migration optimisée des cellules effectrices est un facteur déterminant pour une réponse antitumorale efficace, et c'est pourquoi la potentialisation du recrutement des lymphocytes T fait l'objet de diverses études. Il est désormais établi que l'infiltration de la tumeur par les lymphocytes T $CD8^+$ et les Th1 corrèle avec un bon pronostic et une survie prolongée des patients (Pages et al., 2010). Diverses chimiokines permettent le recrutement de ces lymphocytes. Les CTL peuvent notamment répondre aux chimiokines CCL3 (Maric and Liu, 1999), CCL5 (Mule et al., 1996), CCL20 (Fushimi et al., 2000) et CXCL10 (Luster and Leder, 1993) produites au site tumoral (Vicari and Caux, 2002). CCL5 fut l'une des premières chimiokines décrites dans la régulation de l'immunité antitumorale. Elle est détectée dans de nombreux cancers, notamment le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) et permet ainsi le recrutement de cellules immunitaires exprimant le récepteur CCR5. Dans le cas du cancer bronchique, la présence de CCL5 corrèle avec un bon pronostic, à l'inverse du cancer

du sein. Cela pourrait s'expliquer par le recrutement de populations cellulaires immunosuppressives tels que les TAM (*Tumor Associated Macrophage*) ou les lymphocytes T régulateurs (Treg).

Les chimiokines CXCL12 et CCL2, produites à la fois par les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement, sont aussi essentielles pour attirer les lymphocytes T effecteurs dans le tissu tumoral (Brown et al., 2007; Homey et al., 2002; Orimo et al., 2005). Les TIL peuvent eux aussi, sécréter des chimiokines telles que CCL3, CCL4 et CCL5 pour permettre le recrutement et l'activation de monocytes.

5.3 Localisation, mobilité et rétention intratumorale des CTL

Des études expérimentales ont montré que les CTL recrutés au site tumoral s'accumulent dans le stroma, plutôt que dans les îlots tumoraux (Salmon et al., 2012). Ceci est dû à l'orientation de composants du stroma et en particulier aux fibres de collagène qui influencent la mobilité des cellules T et les empêchent de migrer vers les régions tumorales épithéliales.

Avant de rencontrer leur cible, les TIL migrent de manière aléatoire, quel que soit le gradient de chimiokines. Les cellules effectrices entrent en contact transitoire avec les cellules cibles, puis arrêtent leur migration pour établir un contact stable lors de l'engagement spécifique du TCR. On observe alors la libération des granules cytotoxiques et de cytokines. La lyse de la cellule tumorale entraîne des modifications du microenvironnement tumoral, suite notamment à la sécrétion de chimiokines qui favorisent le recrutement de CTL non spécifiques (Boissonnas et al., 2007). Ainsi, l'injection de chimiokines appropriées directement dans la tumeur pourrait conduire à un meilleur recrutement lymphocytaire optimisant ainsi la réponse antitumorale.

Notre équipe a pu montrer l'implication de CCR5 dans la rétention des cellules T au site tumoral. En effet, CCR5 est recruté dans la synapse immunologique (SI) formée avec la cellule cible lors de l'engagement de l'intégrine $\alpha_E(\text{CD}103)\beta_7$, avec son ligand la E-cadhérine. De ce fait, la cellule T devient insensible au gradient de chimiokines se liant à CCR5 (CCL3, CCL4, CCL5) (Franciszkiewicz et al., 2009).

6. Activation des lymphocytes T par les chimiokines

Outre leur rôle de recrutement de cellules immunes au site tumoral, les chimiokines sont aussi capables de jouer un rôle clé dans les fonctions effectrices des lymphocytes T. L'engagement d'une chimiokine avec son récepteur induit un signal *go*. Ce signal ne favorise donc pas la formation d'une SI stable, contrairement au signal TCR de type *stop* (Dustin,

2004). Un gradient de chimiokines CXCL10, CLL19 ou CCL21 rend la cellule T insensible au complexe p-CMH, inhibant l'activation des lymphocytes T. A l'inverse, CCL19, sécrétée par les DC, induit la polarisation et la mobilité des lymphocytes T. Le *scanning* des CPA et la probabilité de rencontre d'un complexe p-CMH spécifique sont augmentés (Kaiser et al., 2005). De plus, il a été décrit que CXCL12 est capable d'augmenter l'adhésion des CTL aux cellules endothéliales en régulant l'affinité des intégrines, notamment de LFA-1 (Stein et al., 2000). Récemment, il a aussi été montré que l'inhibition ou la neutralisation de CXCR4 sur les cellules T induit un défaut de la structure de la SI lors de l'engagement avec une CPA. La polymérisation d'actine, le MTOC et la durée du contact sont impactées (Cascio et al., 2015). Il a aussi été suggéré que les chimiokines sécrétées par les CPA agissent comme molécules de costimulation grâce à l'engagement de leur récepteur dans la SI (Molon et al., 2005).

II. LES LYMPHOCYTES T, ACTEURS CLÉS DE LA RÉPONSE ANTITUMORALE

1. La synapse immunologique

La reconnaissance d'une CPA par un lymphocyte T entraîne la formation d'une structure organisée à l'interface des deux cellules appelée synapse immunologique. Ce concept, inspiré par la synapse neuronale entre les cellules du système nerveux central et des cellules musculaires, a été évoqué par Norcross suite à l'observation de déformations morphologiques des cellules immunitaires lorsqu'elles interagissent entre elles (Norcross, 1984). En 1998, Kupfer et ses collaborateurs démontrent l'existence d'une zone de contact organisée dans le temps et dans l'espace, entre lymphocytes T et B (Monks et al., 1998). C'est dans cet espace nanométrique que se déroulent les déterminants moléculaires permettant la régulation de notre système immunitaire. En effet, la formation de la SI permet à la fois l'activation des cellules du système immunitaire adaptatif, mais aussi la lyse des cellules anormales par les CTL. Les individus présentant des altérations génétiques ou cellulaires qui manifestent des défauts dans la formation de SI sont vulnérables aux infections et aux cancers. C'est pourquoi les thérapies ciblant des composants de la SI s'avèrent de bons candidats pour améliorer l'immunité antitumorale (Childs and Carlsten, 2015). Bien que le concept de SI ne soit pas récent, la fonction et la structure de ces jonctions spécialisées est encore aujourd'hui largement discutée.

1.1 Architecture des synapses immunologiques

La reconnaissance de l'antigène à la surface d'une DC par un lymphocyte T naïf passe par différentes phases. Lors de la première phase, on observe des déformations morphologiques et un *scanning* de la CPA, mettant en jeu des chimiokines et des molécules d'adhésion, telles que LFA-1. Grâce à la formation de lamellipodes, le lymphocyte T CD8⁺ peut se déplacer de l'ordre de plusieurs diamètres cellulaires par minute. La reconnaissance du complexe p-CMH entraîne l'immobilisation du lymphocyte afin d'établir des liaisons adhérentes plus fortes. Une modification du cytosquelette est alors observée, mettant en jeu le réseau d'actine et le remodelage des microtubules. La polymérisation de l'actine, induite par la signalisation du TCR, aboutit à la formation de contacts stables entre les deux cellules : la SI. Plusieurs types de SI ont été décrits selon leur structure et fonction, il s'agit de synapse sécrétrice, synapse cytotoxique et kinapse (Figure 6).

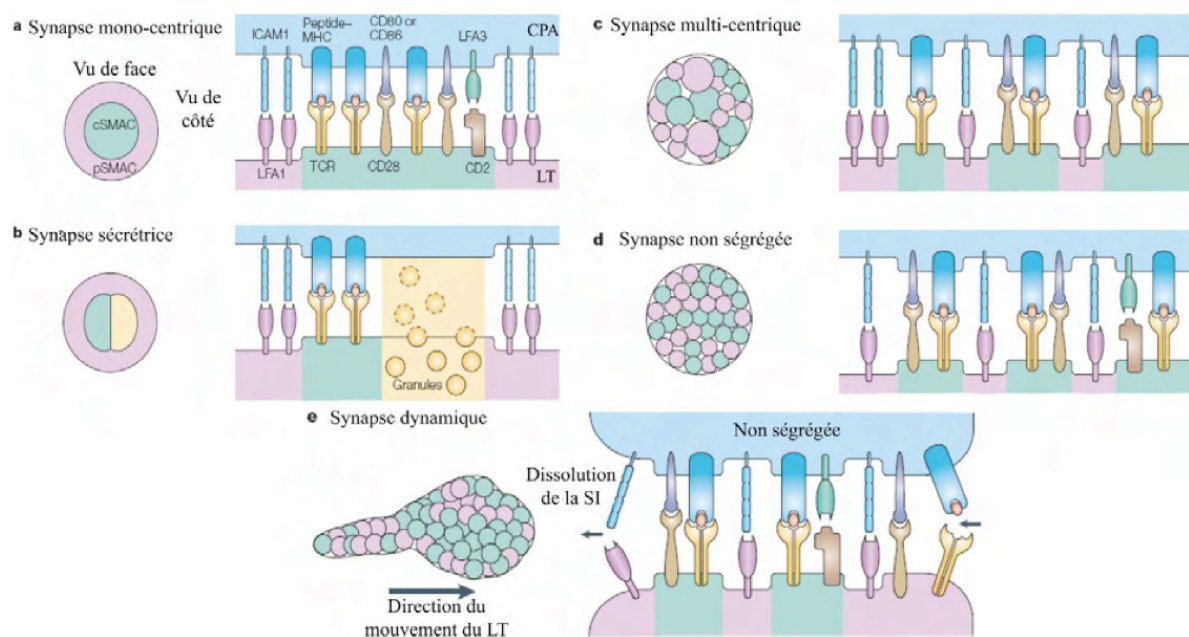


Figure 6 : Diversité des SI

a) La SI mature, ou monocentrique, présente une structure ségréguée des récepteurs au cSMAC et pSMAC. b) La SI sécrétoire, présente de la même manière une jonction cellulaire ségréguée incluant un domaine sécrétoire pour l'exocytose de cytokines ou de GC. c) L'assemblage de clusters partiellement ségrégués est observé dans la synapse multicentrique. d) La synapse non ségréguée est enrichie en TCR et molécules de costimulation en absence de cSMAC et pSMAC. e) La synapse dynamique, ou kinapse, est observée lors de la migration des cellules T vers une CPA (Friedl et al., 2005).

1.1.1 Synapse monocentrique ou mature : observations, modèle et controverse

i) Organisation spatiale

Un des modèles de structure de la synapse proposé est le modèle dit *Bull's eye*, qui divise la jonction intercellulaire en trois régions (Friedl et al., 2005; Grakoui et al., 1999) (Figure 7). La région centrale, le cSMAC (*central supramolecular activation cluster*) où a lieu la reconnaissance du complexe p-CMH-I par le TCR est entourée de l'anneau périphérique (pSMAC) contenant les molécules impliquées dans l'adhésion, comme l'intégrine LFA-1, et provoquant le recrutement de protéines de signalisation (Dustin and Shaw, 1999; Monks et al., 1998). D'autres molécules de costimulation, telles que CD2, CD28, CD4 et CD8, ainsi que des molécules interagissant avec le cytosquelette d'actine et des molécules de la signalisation, comme l'adaptateur LAT (*Linker for Activation of T cells*), les protéines tyrosine kinases Fyn, Lck, Zap70, et PKC θ sont retrouvées dans le pSMAC (Graf et al., 2007). Il existe un troisième anneau, le dSMAC (*distal SMAC*), exclu de la zone de contact, où l'on retrouve des molécules inhibitrices de grosse taille telles que les phosphatases CD43 et CD45. Il a été décrit que l'interaction LFA-1/ICAM-1 est de l'ordre de 42 nm, contre 15 nm pour l'interaction TCR/p-CMH. La ségrégation spatiale du TCR et des molécules de

costimulation permettrait d'obtenir une interaction plus cohésive entre les deux partenaires en s'affranchissant des molécules encombrantes non favorables à ce type d'interaction (Figure 8).

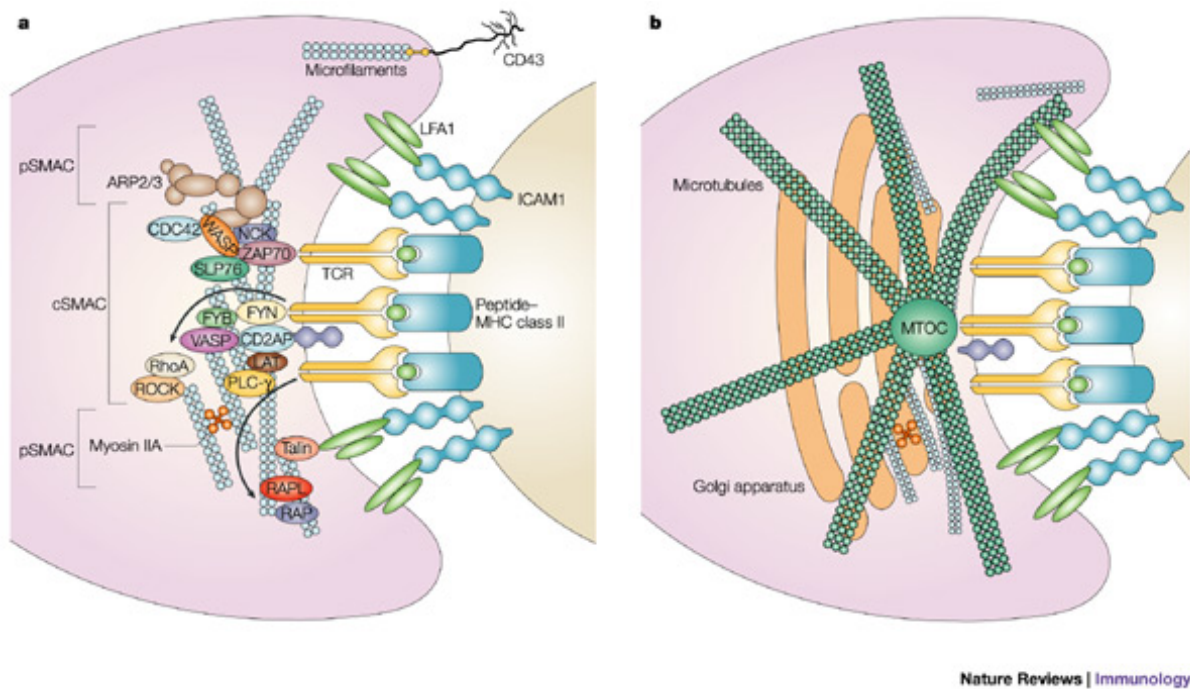


Figure 7 : Structure de la synapse immunologique entre un lymphocyte T et une CPA.

a) Formation du SMAC résultant de l'interaction du TCR avec le complexe p-CMH (cSMAC) et de l'engagement des signaux de costimulation tels que l'intégrine LFA-1 et ICAM-1 en périphérie (pSMAC). Les molécules CD43, ou la PSGL1 sont tenues à l'écart de la SI, dans le dSMAC, et interagissent avec les microfilaments d'actine et les protéines ERM (Ezrin Radixin Moesin).
 b) Distribution du cytosquelette lors d'une SI mature et réorientation du MTOC à la synapse. (Vicente-Manzanares and Sanchez-Madrid, 2004)

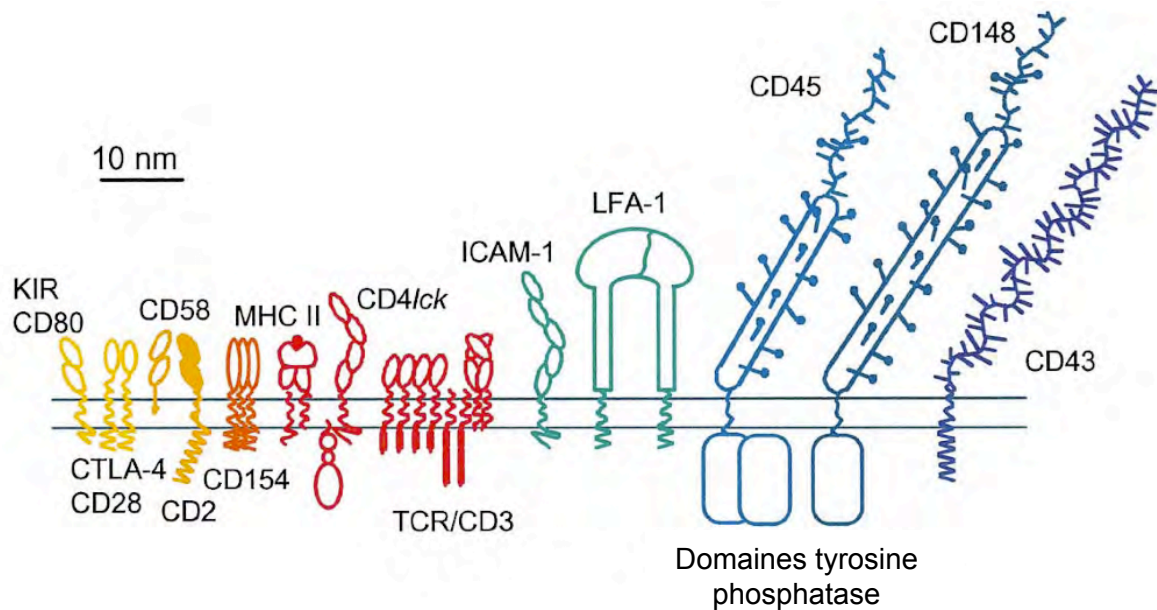


Figure 8 : Dimensions des molécules exprimées à la surface du lymphocyte T et impliquées dans la SI
(Anton van der Merwe et al., 2000)

Ces structures *bull's eye* ont été décrites lors de l'interaction de lymphocyte T CD4⁺ avec des cellules de lymphomes B (Monks et al., 1998), mais aussi lors de l'interaction des lymphocytes T CD8⁺ avec des CPA *ex vivo* (Potter et al., 2001) ou *in vivo* (Barcia et al., 2006). L'organisation SMAC a aussi été observée entre les cellules NK et les cellules cibles, avec une accumulation centrale de récepteurs activateurs ou inhibiteurs entourée de molécules d'adhésion.

Cependant, de nombreuses controverses, encore aujourd'hui d'actualité, remettent en cause ce modèle unique de synapse concentrique et figée. Les conditions expérimentales particulières, notamment l'utilisation des bicouches lipidiques dans lesquelles ont été insérés les ligands du TCR ou de LFA-1, ne satisfont pas l'ensemble de la communauté scientifique. Dans ces conditions peu physiologiques, l'antigène est présente en grande quantité et l'agencement synaptique stable est observé après des temps d'interactions relativement longs, allant de plusieurs minutes à quelques dizaines de minutes. Il a été démontré que l'activation des cellules T et les réponses précoces en aval du TCR interviennent rapidement après le contact T – CPA. En effet, la réponse calcique est observable en quelques secondes, bien avant l'organisation moléculaire structurée décrite précédemment (Lee et al., 2002). Par ailleurs, la présence de molécules solubles dans l'environnement, telles que des chimiokines ou des cytokines, est susceptible d'agir sur les cellules T et de modifier leur mobilité ou la fluidité de leur membrane. D'autres études combinant immunofluorescence dynamique et

analyse quantitative en microscopie électronique ont montré que la synapse entre un lymphocyte T et une DC présente une structure multifocale, avec une alternance de zones d'apposition étroites de quelques dizaines de nanomètres chacune et de zones lâches (Brossard et al., 2005). Il a aussi été montré qu'un lymphocyte T déjà engagé avec une CPA est capable de réorganiser les molécules impliquées dans la SI vers une autre CPA qui présente une concentration d'antigènes plus élevée, allant ainsi à l'encontre du modèle de la SI mature stable (Depoil et al., 2005).

Ainsi, avec l'avancée des recherches et des outils technologiques, la vision hautement dynamique de la SI ne cesse de se complexifier et celle-ci prend le dessus en effaçant peu à peu la structure stable et figée décrite précédemment. Les différents modèles de synapses seront détaillés dans les paragraphes suivants.

ii) Dynamique de formation de la SI

Grâce à l'utilisation de bicouches lipidiques, la démonstration de microclusters périphériques présents dès le début du contact, composés de 11 à 17 TCR, et contenant les kinases ZAP-70 et Lck a pu être réalisée (Schamel et al., 2005). Le nombre de microclusters détectables par cellule T se situe entre 100 et 300 et augmente, comme leur taille, en fonction de la concentration antigénique (Yokosuka and Saito, 2010). L'abondance de phosphotyrosines et le recrutement d'adaptateurs LAT et SLP-76 en font un lieu privilégié de phénomènes de signalisation (Campi et al., 2005). La migration de ces microclusters de la périphérie vers le cSMAC permettrait l'accumulation des TCR au centre de la synapse (Figure 9). De manière intéressante, des microclusters continuent de se former en périphérie, demeurant ainsi un lieu privilégié de la signalisation TCR (Varma et al., 2006). L'abondance et la taille des microclusters sont compatibles avec les observations de microscopie électronique montrant des zones plus ou moins cohésives (Brossard et al., 2005), bien que ce phénomène n'ait pas été observé dans des synapses T-CPA. Ce modèle expliquerait ainsi le peu de molécules TCR nécessaire et la rapidité de la réponse qui se déclenche avant la mise en place finale de la SI (Irvine et al., 2002). De plus, des images en microscopie électronique indiquent la présence de nanoclusters contenant des molécules de TCR et LAT avant une stimulation antigénique, qui sont ensuite assemblés après stimulation pour former des microclusters (Sherman et al., 2011).

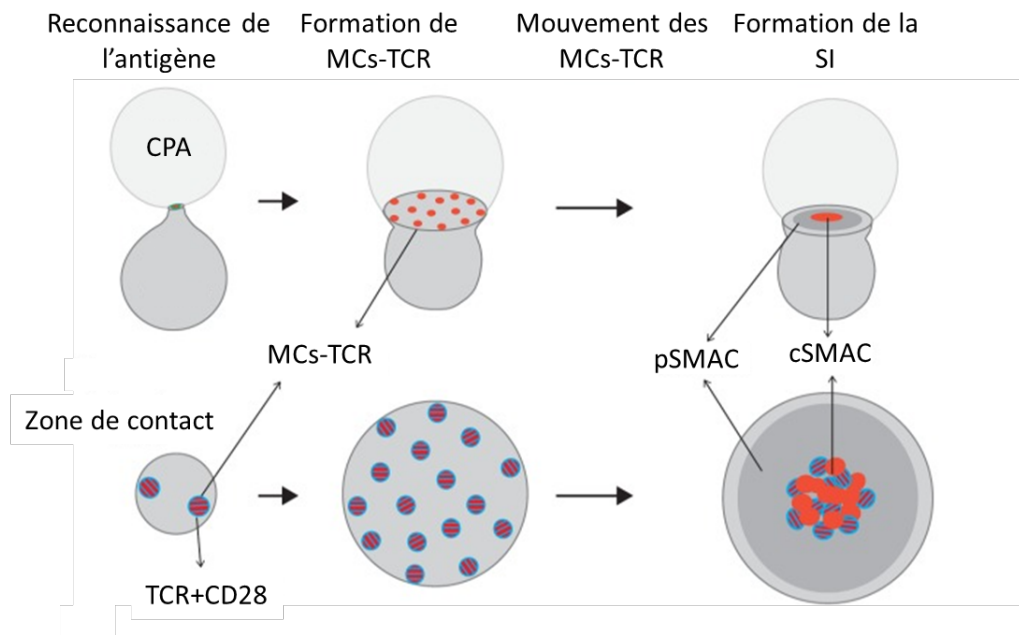


Figure 9 : Dynamique de la formation des microclusters et de la synapse immunologique

Suite à la reconnaissance du complexe p-CMH, les cellules T forment des conjugués avec les CPA générant des microclusters (MCs) de TCR à l'interface avec la CPA. Les MCs-TCR contiennent des TCR (rouge) et des molécules de costimulation telles que CD28 (bleu) et induisent le signal initial d'activation. Après étalement du lymphocyte T, les MCs-TCR entament un mouvement centripète en parallèle d'un processus de fusion, induisant leur accumulation dans la région centrale d'interaction. Au sein du cSMAC, il existe des régions CD3^{high} (rouge), où a lieu l'endocytose du TCR, ainsi que des régions CD3^{low} (bleu et rouge) dynamiquement régulée où colocalisent diverses molécules de costimulation. Après 10 minutes d'interaction, le cSMAC est formé. De manière continue, de nouveaux clusters se forment en périphérie et induisent une signalisation avant même d'être transférés dans le cSMAC (Hashimoto-Tane and Saito, 2016).

iii) Mécanismes impliqués dans la formation de la structure mono-centrique

Afin d'expliquer l'accumulation des molécules au centre de la synapse, divers mécanismes ont été évoqués. La première explication est l'arrangement spatial selon la taille des molécules par diffusion latérale dans la membrane cytoplasmique. Il a été rapporté que lorsque des molécules de CMH plus grandes que la normale sont insérées dans une bicouche lipidique, elles gêneraient l'accumulation du TCR dans le cSMAC (Choudhuri et al., 2005). L'observation d'un anneau riche en actine au niveau de la zone de contact entre un lymphocyte T et une CPA évoque l'implication du cytosquelette dans le mouvement des molécules. Le transport centripète des TCR grâce à un mécanisme dépendant de l'actine et de la myosine a pu être mis en évidence par l'inhibition de la polymérisation de l'actine. En effet, un traitement à la cytochalasine D bloque la translocation des microclusters au niveau du cSMAC (Varma et al., 2006). De plus, les RhoGTPases, protéines impliquées dans la dynamique de l'actine, sont nécessaires pour la formation du cSMAC (Billadeau et al., 2007).

Un mécanisme différent a été proposé, impliquant le recyclage polarisé des TCR (Das et al., 2004; Galgano et al., 2017). Ce mode de transport implique deux phénomènes différents :

- la propriété du TCR d'être internalisé et recyclé vers la membrane plasmique ;
- la capacité des lymphocytes T à polariser leur compartiment vésiculaire d'endocytose précoce et de recyclage vers la SI.

Ainsi, grâce à des expériences de microscopie en temps réel, il a pu être montré que les TCR qui transitent par des endosomes peuvent être acheminés à la SI. Ce mécanisme ne se limite pas au TCR mais peut s'étendre à des protéines de signalisation associées à la membrane, comme la tyrosine kinase Lck ou l'adaptateur LAT. Celles-ci transitent par un compartiment vésiculaire qui se polarise et semble fusionner avec la membrane au niveau de la SI (Ehrlich et al., 2002).

1.1.2 La SI sécrétoire

Initialement décrite comme variante de la SI mono-centrique, l'organisation de la SI sécrétoire est très semblable. La différence réside dans le cSMAC, qui est ici divisé en deux parties : l'une correspondant à l'accumulation du TCR et l'autre constituant un domaine sécrétoire colocalisant avec la machinerie de sécrétion du lymphocyte T. L'absence d'actine en fait une zone adaptée à la libération de granules cytoplasmiques grâce au fossé formé entre les deux membranes. La formation de la SI sécrétoire, ou cytotoxique, est associée à une réorientation du centre organisateur des microtubules (centrosome ou MTOC) du lymphocyte T qui se positionne au plus proche de la SI. Celle-ci permet donc le transport rétrograde des vésicules ou granules cytotoxiques grâce aux microtubules. Les lymphocytes T CD4⁺ sécrètent des vésicules contenant des cytokines vers la CPA, tandis que les CTL sécrètent leurs granules lytiques vers la cellule cible. Une fois acheminés vers l'espace intercellulaire, les granules sont libérés induisant la mort de la cellule cible. L'ensemble de ce processus peut se dérouler très rapidement, en quelques minutes après l'engagement du TCR (Stinchcombe et al., 2001). Plusieurs équipes ont démontré que la libération des granules cytotoxiques vers la cellule cible ne nécessitait pas de synapse mature, indiquant ainsi que la synapse sécrétrice n'était pas mature. En effet, en présence d'une faible concentration antigénique, un CTL peut induire la lyse de la cellule cible en ne polarisant que ses GC et son MTOC (Faroudi et al., 2003). La libération des GC, conduits au MTOC grâce aux microtubules, se fait de manière quasi instantanée (Kupfer et al., 1987). Cependant, tous les GC ne sont pas libérés, permettant au CTL de polariser vers une autre cellule cible. Il a été montré que le lymphocyte peut

polariser ses GC vers deux cellules cibles de manière simultanée, sans tenir compte de leur potentiel antigénique (Wiedemann et al., 2006).

1.1.3 La SI multicentrique

La SI multicentrique peut être considérée comme un échec de SI monocentrique ayant subi une interruption dans la mécanistique moléculaire lors de sa formation. On trouve des agrégats de complexes TCR/CD3 à côté de zones enrichies en LFA-1, pouvant fusionner ou se fractionner au cours de l'interaction, indiquant que la SI concentrique n'est pas la seule issue lors d'un contact cellulaire (Brossard et al., 2005). En effet, cette structure a été observée lors de la rencontre de thymocytes et de cellules épithéliales thymiques durant le processus de sélection thymique (Richie et al., 2002), mais aussi lors de l'interaction entre des lymphocytes T naïfs et des DC (Brossard et al., 2005).

1.1.4 La SI non-ségrégée

La SI non-ségrégée correspond à un enrichissement en TCR, molécules de costimulation et de signalisation, mais avec une absence de ségrégation cSMAC/pSMAC. Bien que ces molécules soient diffuses à la synapse, cette situation est retrouvée dans plusieurs situations. Tout d'abord, la SI non-ségrégée peut-être observée durant la phase initiale de contact avec la formation d'une SI concentrique (Lee et al., 2002). Au niveau des ganglions lymphatiques, on peut observer ce phénomène lors de l'interaction d'un lymphocyte T avec une CPA ne présentant pas d'Ag spécifique (Revy et al., 2001). Il a aussi été montré qu'un lymphocyte T naïf pouvait être activé et proliférer suite à la génération d'une synapse non-ségrégée (O'Keefe et al., 2004). Enfin, cette structure est aussi observée entre des cellules T naïves et des DC (Blanchard et al., 2004).

1.1.5 La kinapse

Les lymphocytes sont capables de former des synapses dynamiques, ou kinapses, et d'intégrer des signaux d'activation tout en migrant. Cette découverte des années 2000 remet en question la synapse en tant que structure stable (Dustin, 2008). Des observations *in vitro* (Gunzer et al., 2000; Underhill et al., 1999) puis *in vivo* (Bousso and Robey, 2004; Mempel et al., 2004) en microscopie biphotonique ont permis de mettre en évidence la structure de cette dynamique. En 2005, Dustin documente le concept d'hémisynapse, c'est à dire la structure asymétrique du lymphocyte T lorsqu'il migre le long de la CPA. On observe alors l'engagement des complexes p-CMH avec le TCR au *leading edge* et la formation de

microclusters. Ces complexes suivent le mouvement rétrograde dynamique le long de la zone de contact puis sont inactivés lorsqu'ils sortent de la jonction cellulaire au niveau de l'uropode (Friedl and Brocker, 2002).

1.2 Voies de transduction du signal du TCR

L'engagement du TCR avec le complexe p-CMH ainsi que des molécules de costimulation et d'adhésion avec leurs ligands respectifs mènent à la convergence des voies de signalisation vers le noyau afin de moduler l'expression de gènes impliqués dans les réponses cellulaires T : activation, prolifération et différenciation du lymphocyte T. Bien que le dogme atteste que la signalisation est initiée après la formation d'une synapse mature, il est désormais connu que la signalisation précède la formation de la SI (Lee et al., 2002). Celle-ci est initiée au niveau des microclusters en périphérie par l'engagement du TCR (Varma et al., 2006).

Les microclusters sont composés de 11 à 17 molécules de TCR (Varma et al., 2006). Ce dernier est constitué d'une chaîne α et d'une chaîne β associée à quatre sous-unités du complexe CD3 (ϵ , γ , δ et ξ) formant trois dimères ($\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$ et $\xi\xi$) (Birnbaum et al., 2014). Le co-récepteur CD3 contient 10 motifs ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) conservés dans sa partie cytoplasmique où se trouvent plusieurs tyrosines phosphorylables (Guy and Vignali, 2009). En premier lieu, l'activation des PTK (Protéine Tyrosine Kinase), comme les membres de la famille Src (Lck et Fyn), vont phosphoryler les domaines ITAM de CD3 et ZAP-70, et grâce à l'exclusion des phosphatases, la signalisation est suffisante pour induire l'activation des lymphocytes T (Figure 10). La phosphorylation en tandem des tyrosines crée des sites d'ancrages pour les protéines adaptatrices et de signalisation contenant un domaine SH2 (Src Homologie 2), telle que la protéine ZAP-70 (*ξ chain associated protein of 70kDa*), initiant la cascade de signalisation qui conduit à l'activation de facteurs de transcription régulant l'expression génique et la différenciation des cellules T (Dustin, 1998; Randriamampita and Lellouch, 2014). Il est intéressant de noter que la kinase Lck se situe dans une zone de la membrane plasmique enrichie en sphingolipides et en cholestérol appelée *raft* lipidique (Kabouridis, 2006). En effet, lorsque la localisation de Lck dans les rafts lipidiques est impossible, la signalisation TCR est altérée, démontrant l'importance de ces rafts dans le déploiement des cascades de signalisation.

L'activation de ZAP-70 permet le recrutement de la protéine adaptatrice transmembranaire LAT via des phosphorylations de multiples résidus tyrosines. LAT sert de point d'ancrage pour des complexes protéiques de signalisation incluant d'autres protéines

scaffold telles que SLP-76, Grb2 et GADS (*Grb2-related adaptor protein*), et d'enzymes PLC γ 1 et PI3K (Phosphoinositide-3 kinase).

Suite à l'engagement du TCR, différentes voies de signalisation se mettent en place : la voie calcique, la voie de la PKC- θ , la voie des MAPK (*Mitogen activated protein kinase*), l'activation des intégrines et la réorganisation du cytosquelette.

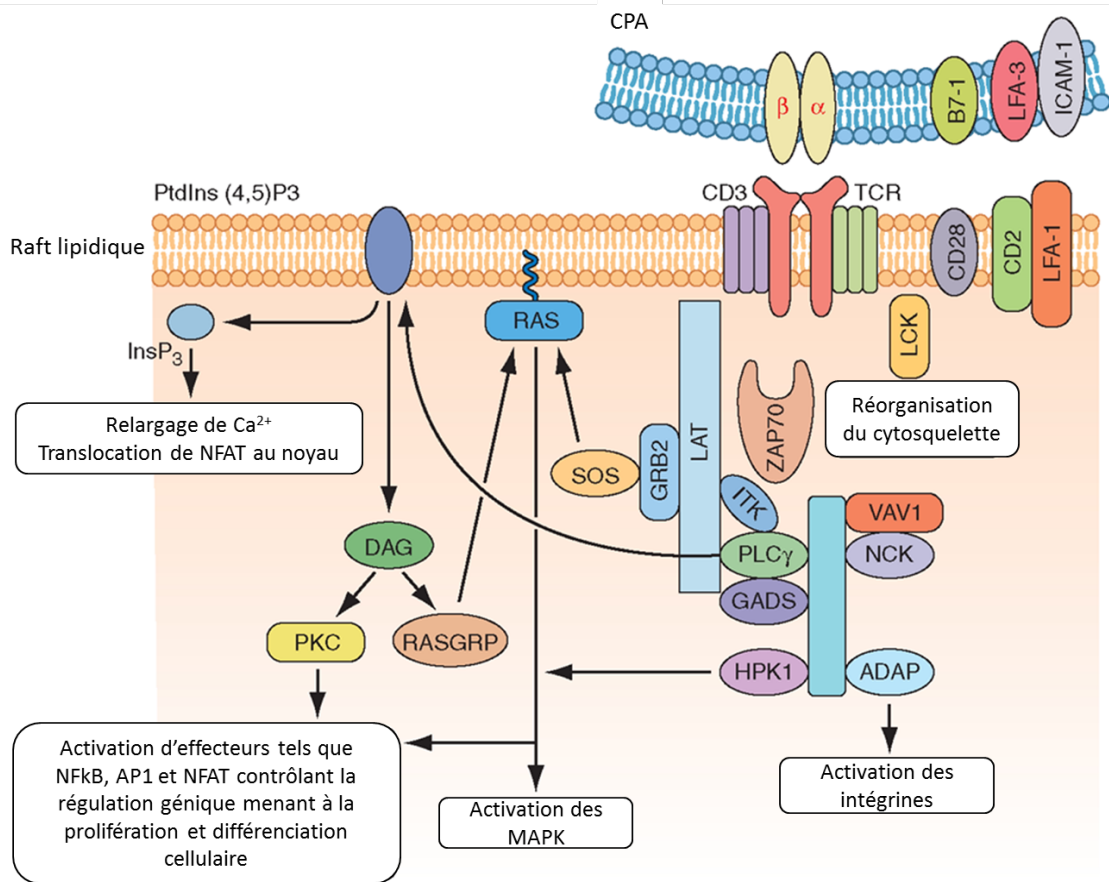


Figure 10 : Les voies de signalisation en aval du TCR

Les signaux activateurs sont transmis via les motifs ITAM présents dans le complexe CD3 et LAT qui fixent les enzymes et transduisent le signal au noyau via les différentes voies de signalisation indiquées. L'engagement du TCR conduit à l'activation de Lck et ZAP-70, pouvant phosphoryler des cibles telles que LAT et SLP76. SLP76 est recrutée à la protéine LAP via GADS. SLP76 et LAT ensemble peuvent induire un flux calcique, la voie des MAPK, l'activation des intégrines et le réarrangement du cytosquelette.

1.2.1 La voie calcique

Suite à l'interaction du TCR avec un complexe p-CMH spécifique, une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Ca^{2+}) a lieu. Cet influx calcique est très rapide et peut-être observé en quelques secondes (Donnadieu et al., 1992; Huse et al., 2007). Suite à la phosphorylation de LAT par la ZAP-70, la PLC γ 1 est recrutée et activée par phosphorylation sur des tyrosines régulatrices par des kinases telles que ZAP-70 et ITK (*Interleukin-2-inducible T-cell Kinase*) (Figure 11). La PLC γ 1 active hydrolyse son substrat primaire, le

PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate), en deux seconds messagers : la DAG et l'IP3 (Inositol 1.4.5 triphosphate) qui, respectivement, activent des PKC et induisent la libération du calcium intracellulaire (Lewis, 2001; Nohara et al., 2015). L'IP3 va se fixer sur des récepteurs à la surface du réticulum endoplasmique (RE) entraînant la libération des stocks calciques réticulaires dans le cytoplasme. Ceci va entraîner l'ouverture des canaux calciques CRAC (*Calcium Release Activated calcium Chanel*) au niveau de la membrane du lymphocyte T induisant l'entrée massive de Ca^{2+} depuis le milieu extracellulaire permettant ainsi d'assurer une concentration de Ca^{2+} élevée et continue. Le calcium se fixe alors sur la calmoduline permettant l'activation de la calcineurine. La calcineurine est une phosphatase capable de déphosphoryler les régions riches en sérines de la protéine NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*). Sous sa forme phosphorylée, NFAT a une localisation cytoplasmique, et sa déphosphorylation permet sa translocation nucléaire par le démasquage d'une séquence de localisation nucléaire. La rétention nucléaire de NFAT requiert une activation continue par la calcineurine car ce facteur de transcription peut sortir du noyau s'il est déphosphorylé par une sérine kinase, GSK3 (*Glycogene synthase kinase 3*) (Crabtree and Olson, 2002). En coopération avec d'autres facteurs de transcription, NFAT induit la transcription de gènes cibles dont certains codent pour des protéines impliquées dans le cycle cellulaire ou dans la communication intercellulaire (TNF- α , IL-2, IL-4 et CD40L). Par opposition, des gènes codants pour des molécules impliquées dans la signalisation précoce du TCR (PLC, LAT, Lck) sont réprimés, constituant un rétrocontrôle négatif des lymphocytes T (Feske et al., 2001).

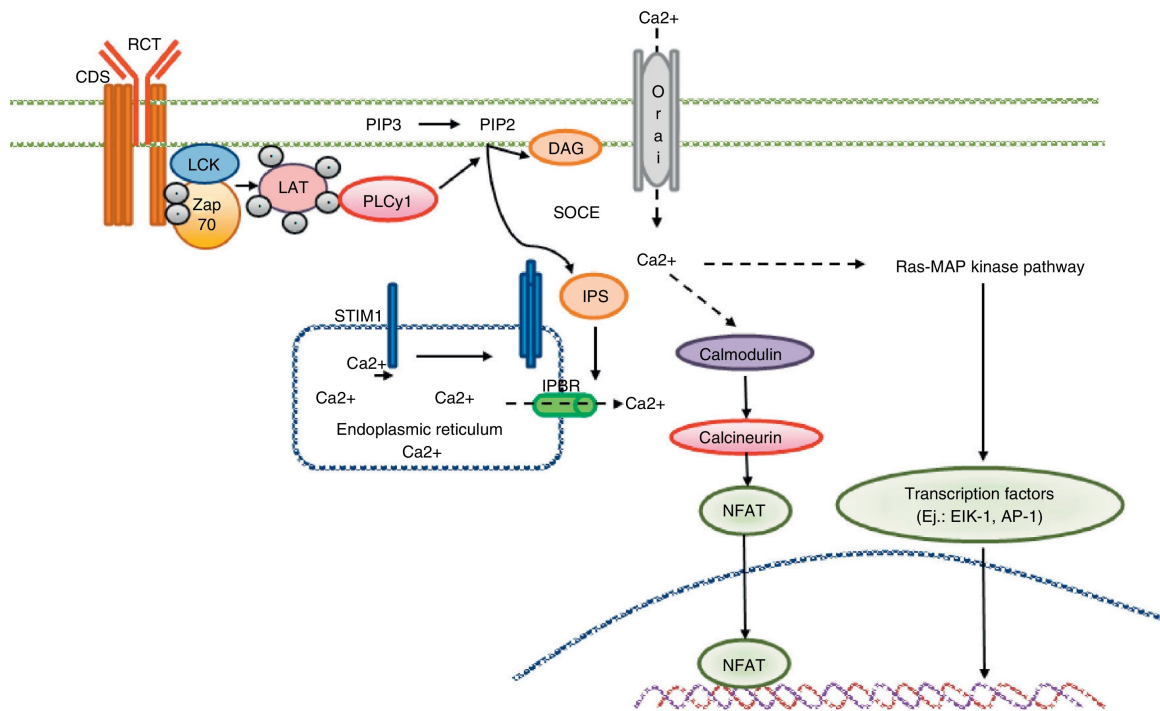


Figure 11 : Vue d'ensemble de la signalisation calcique dans les cellules T.

Suite à la stimulation du TCR, la PLC γ 1 est activée et génère de l'IP3 et du DAG. L'IP3 induit la libération de calcium, activant la voie NFAT, et le DAG phosphoryle la PKC- θ qui active la voie NF- κ B (Izquierdo et al., 2014).

Lorsqu'un lymphocyte T entre en interaction avec une CPA présentant le complexe p-CMH spécifique, le lymphocyte T s'immobilise et s'arrondit. Il a aussi été montré que l'augmentation intracellulaire de calcium précède l'immobilisation du lymphocyte T. Cette immobilisation implique l'activation de la calpaïne, une protéase dépendante du calcium. Elle permet de libérer LFA-1 de son ancrage cytosquelettique, conduisant à la mobilité de l'intégrine à la surface cellulaire. LFA-1 relocalise ainsi dans la SI afin de stabiliser le conjugué formé entre le lymphocyte T et sa cible (Donnadieu et al., 1992; Randriamampita and Trautmann, 2004).

1.2.2 La PKC- θ

La famille des protéines kinases C (PKC) est composée d'enzymes cytoplasmiques à activité sérine/thréonine kinase intervenant dans diverses fonctions cellulaires. Les douze isoformes existants chez les mammifères sont répartis en trois sous-groupes : les PKC dépendantes du Ca²⁺, les PKC indépendantes du Ca²⁺ et les atypiques. Suite à la reconnaissance antigénique, la PKC- θ , de la famille des PKC indépendantes du Ca²⁺, est rapidement recrutée à la SI (Monks et al., 1997). Son activation est induite par le DAG, qui permet un changement conformationnel, et par Lck qui phosphoryle une de ses tyrosines. La PKC est alors capable d'activer Ikk (*Inhibitor of κ B kinase*), qui à son tour phosphoryle I κ B

entraînant sa dégradation par le protéasome. Le facteur transcriptionnel NF- κ B est alors libéré d'I κ B, et transloqué dans le noyau (Karin and Delhase, 2000). Cette voie de signalisation est importante dans le processus de différenciation Th1/Th2. En effet, lorsque la PKC- θ est absente, le développement des lymphocytes Th2 est bloqué, tandis que la différenciation vers un phénotype Th1 n'est pas altérée (Marsland et al., 2004).

1.2.3 Les MAP Kinases

La voie de signalisation MAPK est très conservée et joue un rôle important dans tous les types cellulaires, notamment dans les lymphocytes T en initiant la prolifération et la différenciation. Chez les mammifères, il existe trois groupes de MAPK : ERK 1 et 2 (*Extracellular signal-Regulated protein Kinases*), les p38 MAPK et les JNK (c-Jun NH2-terminal Kinases). L'activation des différentes MAPK résulte de l'enchaînement d'une cascade de phosphorylations initiée par les MAPK kinases kinases (MAPKKK) qui phosphorylent les MAPK kinases (MAPKK), elles-mêmes phosphorylant les MAPK. Cette cascade aboutit à une translocation nucléaire menant à la transcription de gènes clés dans la prolifération, la différenciation et la production d'IL-2.

1.3 Intégrines et molécules de costimulation

L'interaction du TCR avec le complexe p-CMH ne suffit pas à déclencher la différenciation des lymphocytes T naïfs, ou l'activation du CTL dans le cas d'une synapse avec une cellule tumorale par exemple. Des signaux de costimulation sont nécessaires, quel que soit l'état d'activation du lymphocyte T afin de déclencher les voies de signalisation du TCR. Ces signaux peuvent être délivrés par divers récepteurs, tels que CD28, ICOS, ou l'intégrine LFA-1, dont les ligands sont exprimés par les CPA ou les cellules cibles. L'interaction costimulatrice entre CD28 et les molécules B7-1 (CD80) ou B7-2 (CD86) délivre un signal activateur et joue un rôle important dans la survie lymphocytaire *via* les voies PKC et AKT. À l'inverse, l'interaction avec le récepteur CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*) inhibe la réponse T. CD28 remplit plusieurs fonctions au sein de la SI. Il est capable de modifier la morphologie de la SI en coopération avec les intégrines, telles que LFA-1, ou par l'intermédiaire des RhoGTPases Rac1 ou Cdc42 (Salazar-Fontana et al., 2003). CD28 interagit également avec des protéines du cytosquelette qui conduisent à des réarrangements de structure du lymphocyte (Tavano et al., 2006).

Les intégrines, dont LFA-1, peuvent aussi jouer un rôle de costimulation. Elles seront détaillées dans la partie III. Initialement décrites comme molécules d'adhésion, celles-ci sont

impliquées dans la formation de la SI. L'intégrine LFA-1 a été largement étudiée (Shaw et al., 1986; Varga et al., 2010) et interagit avec son ligand ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule*) à la surface des CPA. L'affinité de LFA-1 pour son ligand augmente rapidement suite à l'engagement du TCR, permettant de générer une force d'adhérence importante nécessaire pour la formation d'un contact stable entre deux cellules (Scholer et al., 2008). Par ailleurs, l'expression de la PKC est augmentée suite à l'activation du TCR et améliore les forces d'interaction entre LFA-1 et son ligand ICAM-1 (Moingeon et al., 1991).

L'analyse dynamique de l'interaction lymphocyte T/CPA par microscopie à force atomique a permis d'établir l'intensité de l'interaction en présence d'antigènes au cours du temps. Sur des temps précoces, les forces varient entre 1 et 2 nN et peuvent atteindre 14 nN au bout de 30 min où la cohésion est maximale. Après une heure d'interaction, la force n'est pas maintenue et diminue (Hosseini et al., 2009). Cette étude a aussi pu montrer que l'inhibition de LFA-1 abolit les forces d'interactions entre le lymphocyte T et la CPA, démontrant le rôle essentiel de l'engagement de LFA-1 dans la formation d'une synapse cohésive.

1.4 Rôle du cytosquelette dans la formation des SI

Lors de l'interaction entre un lymphocyte T et une CPA, les cellules se déforment, rétractent leur uropode et étendent un large lamellipode vers la CPA par un remodelage du cytosquelette. La réorganisation du cytosquelette d'actine participe aux différentes étapes de la formation de la SI, sa maturation et sa destruction. Parallèlement, le MTOC se polarise vers la CPA emmenant l'appareil de Golgi et la machinerie sécrétoire. Il est aujourd'hui clair, que la réorientation du cytosquelette est un marqueur de la formation de la SI.

1.4.1 Réorganisation du cytosquelette d'actine à la SI

Différents signaux, incluant ceux induits par le TCR, CD28 ou LFA-1, mènent à l'activation des protéines associées à l'actine. L'engagement du TCR va permettre l'activation de nombreux substrats cellulaires comme LAT et SLP-76 qui recrutent Vav1, qui lui-même permet l'activation de Cdc42 et Rac1 (Janssen et al., 2016; Wilkinson et al., 2005). L'interaction de ces derniers avec WASP (*Wiskott-Aldrich Syndrom Protein*) et WAVE2 (*WASp-family verprolin-homologous protein-2*) permet le recrutement et l'activation du complexe Arp2/3 conduisant à la nucléation d'actine et ainsi au réarrangement du cytosquelette. Il a été décrit que Rac1 entraîne l'inactivation des protéines de la famille ERM (Ezrine, Radixine et Moesine) déclenchant le détachement des récepteurs membranaires du

cytosquelette d'actine et la diminution de la rigidité corticale (Faure et al., 2004). Ceci permet l'étalement du lymphocyte T sur la CPA et l'augmentation de la surface de contact entre les deux cellules. Suite à l'engagement du TCR et l'étalement du lymphocyte T, une polymérisation active d'actine a lieu dans la zone de contact puis s'exclut du centre de la SI et se concentre au pSMAC (Comrie and Burkhardt, 2016).

Il a été montré que l'utilisation de la latrunculine-A, une molécule qui perturbe l'organisation du cytosquelette d'actine, désorganise le pSMAC, bloque le mouvement et la signalisation des microclusters et inhibe la formation de nouveaux microclusters. Cependant, la stabilité du cSMAC reste intacte après le traitement à la latrunculine-A (Varma et al., 2006). Les microclusters de TCR préformés persistent quelques minutes après le traitement et conservent ainsi une certaine stabilité indépendamment de l'actine. À l'inverse, les clusters d'intégrines se désintègrent dès l'ajout de la drogue. Le flux d'actine en périphérie de la SI permettrait donc de maintenir les intégrines au niveau du pSMAC et d'entraîner les clusters de TCR vers le centre (Kaizuka et al., 2007). Une explication possible serait que les microclusters d'intégrines dépendent de la polymérisation d'actine, tandis que les microclusters de TCR en sont indépendants.

Récemment, il a été montré qu'il existe deux zones de filaments d'actine dynamique à la SI. En plus de la zone d'actine majoritaire située au lamellipode, la polymérisation d'actine est aussi observée dans des structures plus petites associées aux microclusters de TCR. Ces « foyers » d'actine sont polymérisés suite à la cascade de signalisation du TCR et à l'activation de tyrosines kinases et sont dépendants de la protéine WASp (Kumari et al., 2015).

L'engagement du TCR joue aussi un rôle dans la signalisation *inside-out* des intégrines. Il a été décrit que l'engagement de l'intégrine LFA-1 avec son ligand ICAM-1 active les molécules FAK (*Focal Adhesion Kinase*), ERK1/2, JNK et PLC γ 1 (Li et al., 2009). LFA-1 régule les filaments d'actine par les protéines ADAP et SLP76 (Baker et al., 2009; Mace et al., 2010). La voie de signalisation croise la cascade de signalisation induite par le TCR et incluant l'activation de VAV, Rac1, CDC42, Wasp et WAVE, suivi de l'activation du complexe Arp2/3. Il est intéressant de noter que l'activation de l'intégrine et la fixation de la vinculine à la taline sont dépendantes de l'interaction de la taline avec le réseau d'actine. Ceci suggère une boucle de régulation où l'activation de l'intégrine est dépendante des forces du cytosquelette d'actine et résulte en l'augmentation de la polymérisation à la SI (Nordenfelt et al., 2016).

1.4.2 Réorganisation du cytosquelette de microtubules à la SI

L'engagement du TCR n'implique pas uniquement la réorganisation du cytosquelette d'actine, mais aussi des microtubules caractérisées par la polarisation du MTOC au centre de la SI (Geiger et al., 1982). Les microtubules sont alors ancrés à la membrane au niveau du pSMAC. La première observation de la polarisation du MTOC a eu lieu dans les années 1980. Suite à l'observation de l'induction de la mort des cellules cibles par les CTL de manière spécifique et unidirectionnelle, l'équipe de Berke suggère que l'exocytose des GC est effectuée de manière polarisée. Grâce à des modèles de lymphocytes T murins, l'étude propose que les CTL interagissent avec leurs cibles *via* la région membranaire proche du MTOC, sans pour autant suggérer une réorientation du MTOC suite au contact cellulaire (Geiger et al., 1982). C'est deux ans plus tard que l'équipe de Kupfer démontre que la polarisation du MTOC et de l'appareil de Golgi vers la cellule cible est issue d'un mécanisme actif suite à un contact cellulaire (Kupfer and Dennert, 1984; Kupfer et al., 1983). La même équipe montrera ensuite que les lymphocytes T CD4⁺ sont eux aussi capables de polariser leur machinerie sécrétoire vers les CPA de manière spécifique de l'antigène (Kupfer et al., 1987).

La signalisation en aval du TCR qui contrôle la polarisation du MTOC fait intervenir un large éventail de protéines, notamment ZAP-70, LAT et SLP-76 (Kuhne et al., 2003), Fyn (Martin-Cofreces et al., 2006), Vav, et PKC (Quann et al., 2011). La réorientation de l'appareil de Golgi et des vésicules associées dépendent de la localisation correcte du MTOC dans la SI, favorisant ainsi la sécrétion de cytokines et de vésicules par les effecteurs CD4⁺ (Huse, 2012).

1.5 Mécano-sensibilité de la SI

Au cours de ces dernières années, diverses expériences ont montré que les cellules sont sensibles aux forces mécaniques de leur environnement. La rigidité du microenvironnement peut notamment influencer la migration ou la différenciation des lymphocytes T. En 2011, Husson et ses collaborateurs ont montré que la cellule T est capable de générer des forces de poussée et de traction lors de la réponse précoce à une activation (Husson et al., 2011). De plus, dans la SI formée entre un CTL et sa cellule cible, les forces mécaniques jouent aussi un rôle important. Récemment, grâce à des expériences de biophysique, le groupe de Huse a pu établir une corrélation entre la force exercée dans la synapse et la rapidité de la formation des pores sur la cellule cible par la perforine. L'augmentation de la tension à la synapse augmente ainsi la cytotoxicité des CTL. Ces observations révèlent une dimension jusqu'alors méconnue

et démontrent que les cellules utilisent les forces mécaniques dans le but de contrôler les signaux envoyés à l'extérieur (Basu et al., 2016).

1.6 Dissolution de la SI

Bien que peu étudiée, la fin de l'interaction cellulaire est pourtant nécessaire pour le détachement du lymphocyte T et le retour à un phénotype migratoire. Il n'est pas encore clairement établi si la dissociation de la SI est une cause ou une conséquence du détachement cellulaire (Friedl et al., 2005). Plusieurs mécanismes semblent impliqués dans ce phénomène parmi lesquels l'internalisation et la dégradation du TCR (Lee et al., 2003) et des intégrines, comme LFA-1 (Mazerolles et al., 1996), l'augmentation d'expression et le recrutement à la synapse de récepteurs inhibiteurs tels que CTLA-4 (Hara et al., 2009) ou l'induction d'expression de chimiokines et de leurs récepteurs favorisant un phénotype migratoire.

Dans un contexte tumoral, notre équipe a pu montrer que suite à l'engagement d'un lymphocyte T avec sa cible, les vésicules contenant la chimiokine CCL5 sont libérées au niveau de la SI. Grâce un mécanisme dépendant de CCR5, l'induction autocrine de CXCR4 à la surface du lymphocyte T est observée favorisant ainsi la migration lymphocytaire vers CXCL12 présent dans le microenvironnement tumoral. Ainsi, le relargage polarisé de CCL5 joue un rôle primordial dans le contrôle de la durée de la SI (Franciszkiwicz et al., 2014).

2. Fonctions effectrices des lymphocytes T

2.1 Synapses cytotoxiques

La reconnaissance d'une cellule tumorale par un CTL aboutit à la mort par apoptose de la cellule cible. Différents mécanismes induisant l'apoptose existent, dont le principal correspond à la voie perforine/granzyme qui repose sur l'exocytose polarisée des GC dans la fente synaptique. Le second mécanisme utilisé par les CTL correspond à la voie des récepteurs à domaines de mort de la famille du récepteur au TNF (*Tumor Necrosis Factor*). L'engagement de ces récepteurs pro-apoptotiques à la surface des cellules cibles a lieu lorsque les CTL sont activés et expriment les ligands (FasL, TNF et TRAIL), et sont ainsi impliqués dans l'activité cytotoxique des CTL (Wohlleber et al., 2012).

La relocalisation des différentes molécules et des organites intracellulaires est un mécanisme précédant l'exocytose polarisée des GC vers la cellule cible, aussi bien dans les lymphocytes T que dans les cellules NK. Les GC se lient au cytosquelette de microtubules et polarisent au niveau du cSMAC. La formation de la SI cytotoxique est associée à la réorientation des centrosomes du lymphocyte T, appelé également MTOC, dans l'interface

cellule T/cellule cible (Kuhn and Poenie, 2002). La relocalisation du MTOC permet la migration des organites sécrétoires du CTL vers la SI, tels que l'appareil de Golgi et d'autres compartiments vésiculaires, afin d'initier la libération du contenu des GC (Figure 12).

Des résultats récents semblent indiquer que la lyse de la cellule cible par le CTL ne nécessite pas la formation d'une SI mature. Seulement trois complexes p-CMH sont requis pour l'induction de la cytotoxicité, tandis qu'une dizaine de complexes p-CMH sont nécessaires pour visualiser une augmentation calcique. Ces résultats indiquant que la formation d'une SI mature et que le déclenchement d'une signalisation complète n'est pas nécessaire à la lyse de la cellule cible (Purbhoo et al., 2004).

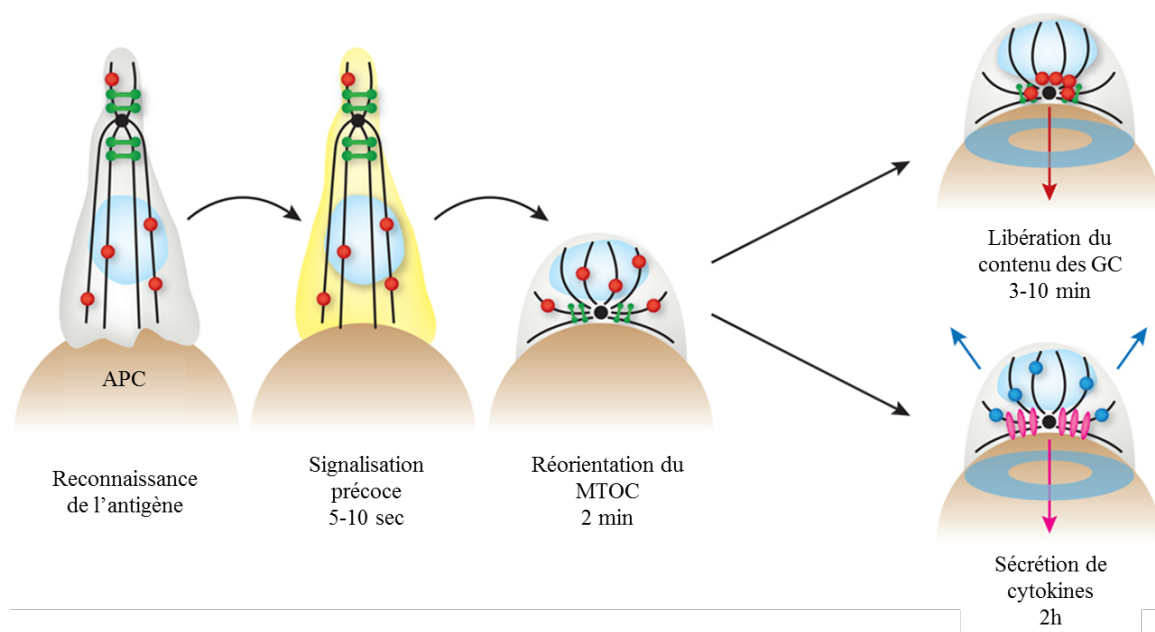


Figure 12 : Cinétique des réponses sécrétrices des lymphocytes T

La reconnaissance antigénique induit des réponses précoces (10 sec), suivies de la polarisation du MTOC, de la formation de la synapse et du relargage des granules lytiques (10 min).

Ligne noire : microtubules ; points noirs : MTOC ; vert : appareil de golgi ; rouge : GC ; rose et bleu : respectivement sécrétion synaptique et multidirectionnelle de cytokines ; anneau turquoise : formation de la SI. (Huse et al., 2008)

2.2 Voies de lyse

2.2.1 Les granules cytotoxiques

La libération du contenu des GC des CTL dans la synapse est le principal mécanisme utilisé par les cellules cytotoxiques pour lyser les cellules cibles. Les protéines cytolytiques libérées sont principalement la perforine et le granzyme B, qui est internalisé par endocytose dans la cellule cible de manière dépendante du récepteur. La libération de la perforine dans le cytoplasme déclenche les voies de signalisation menant à l'apoptose (Martinez-Lostao et al., 2015).

Les granzymes appartiennent à une famille de sérine-protéases (granzymes A, B, H, M et K chez l'homme). Dans les granules, les granzymes sont liés à la serglycine afin de les maintenir sous forme inactive. La perforine est inactive à cause du pH acide et elle est, comme le granzyme, complexée à la serglycine (Metkar et al., 2002). La perforine devient active à pH neutre et lorsqu'elle est clivée par une protéase qui élimine un peptide glycosylé du côté C-terminal. Initialement, il a été décrit que la perforine était capable de se polymériser rapidement en présence de calcium et pouvait s'insérer dans la membrane plasmique de la cellule cible pour former des pores et permettre le passage des granzymes. Cependant, de nombreux travaux montrent aujourd'hui que l'internalisation du granzyme B est indépendante de la présence de perforine, et que son entrée s'effectue par endocytose de manière dépendante d'un récepteur. Le granzyme B endocyté dans la cellule cible est libéré dans le cytoplasme grâce à l'action de la perforine, permettant l'induction de l'apoptose (Browne et al., 1999). Le granzyme B libéré sous forme de complexes macromoléculaires est associé avec la serglycine et se lie au récepteur CI-MPR, aussi appelé IGF-IIR (*Insulin-like Growth Factor II Receptor*) à la surface de la cellule cible. Une fois endocyté dans le cytoplasme, la perforine va permettre la libération du granzyme B, qui va ensuite cliver divers substrats activant des voies de mort dépendantes et indépendantes des caspases.

2.2.2 Délivrance des granules cytotoxiques et rôle du MTOC

Comme décrit précédemment, la zone centrale de la synapse sécrétoire est divisée en deux domaines distincts : un domaine de signalisation et un domaine sécrétoire où a lieu l'exocytose des GC. Dès lors que le MTOC polarise vers la SI, les granules lytiques se déplacent vers la membrane plasmique pour libérer leur contenu dans la fente synaptique. De manière similaire, les lymphocytes T CD4⁺ sont capables d'orienter des vésicules contenant des cytokines (IL-2, IL-4, IL-5 et IFN- γ), ainsi que les lysosomes vers la CPA (Shen et al., 2006). La sécrétion polarisée des granules se déroule en plusieurs étapes : la polarisation à la SI, l'ancrage à la membrane plasmique puis la fusion aboutissant à la libération des contenus des GC.

2.2.2.1 Polarisation des granules cytotoxiques et du MTOC

La polarisation du MTOC gouverne la sécrétion des GC de la cellule tueuse. Des études ont montré que le traitement des CTL au nocodazole, un inducteur de la dépolymérisation des microtubules, inhibe la polarisation et la sécrétion des granules (Kupfer and Dennert, 1984). Les granules transitent le long des microtubules en direction du MTOC pour être libérés vers

la cellule cible. Les protéines motrices telles que la dynéine et les Rho GTPases participent au mouvement du centrosome et des GC à la SI.

Il existe une voie rapide et une voie lente pour la sécrétion des granules lytiques. Une signalisation calcique conduit à la concentration des GC au MTOC et à leur sécrétion rapide. Des signaux faibles induisent un recrutement des GC plus lent qui migrent le long des microtubules vers la SI (Beal et al., 2009). D'après les travaux de G. Griffiths, la polarisation du MTOC et des GC sont deux évènements qui peuvent être dissociés. *Via* l'utilisation de souris OT-1 et de peptides d'avidités variables, il a été montré que seules les interactions de haute avidité permettent la polarisation des GC, bien que le centrosome polarise dans les deux cas. Ces travaux sont contradictoires avec des études montrant que les CTL sont capables de tuer simultanément plusieurs cibles (McGavern et al., 2002; Wiedemann et al., 2006). Grâce à la vidéo microscopie, l'équipe de Kuhn a pu montrer que le MTOC d'un lymphocyte T CD8⁺ oscille entre les cellules cibles avec lesquelles il est en contact (Kuhn and Poenie, 2002).

Par ailleurs, la nature des récepteurs engagés dans la SI peut influencer sur l'exocytose des GC. Notre équipe a montré que l'engagement de l'intégrine $\alpha_E(\text{CD}103)\beta_7$ avec son ligand la E-cadhérine, suffit pour induire la polarisation des GC (Le Floc'h et al., 2011).

2.2.2.2 Ancrage et fusion des granules cytotoxiques

Les protéines SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor accessory protein receptors*) sont impliquées dans le trafic vésiculaire. Cette famille de protéines transmembranaires est exprimée à la surface des vésicules (vSNARE) et des cellules cibles (tSNARE). De nombreuses études démontrent l'implication des protéines SNARE dans le mécanisme de fusion des GC avec la membrane plasmique dans la SI (Han et al., 2017).

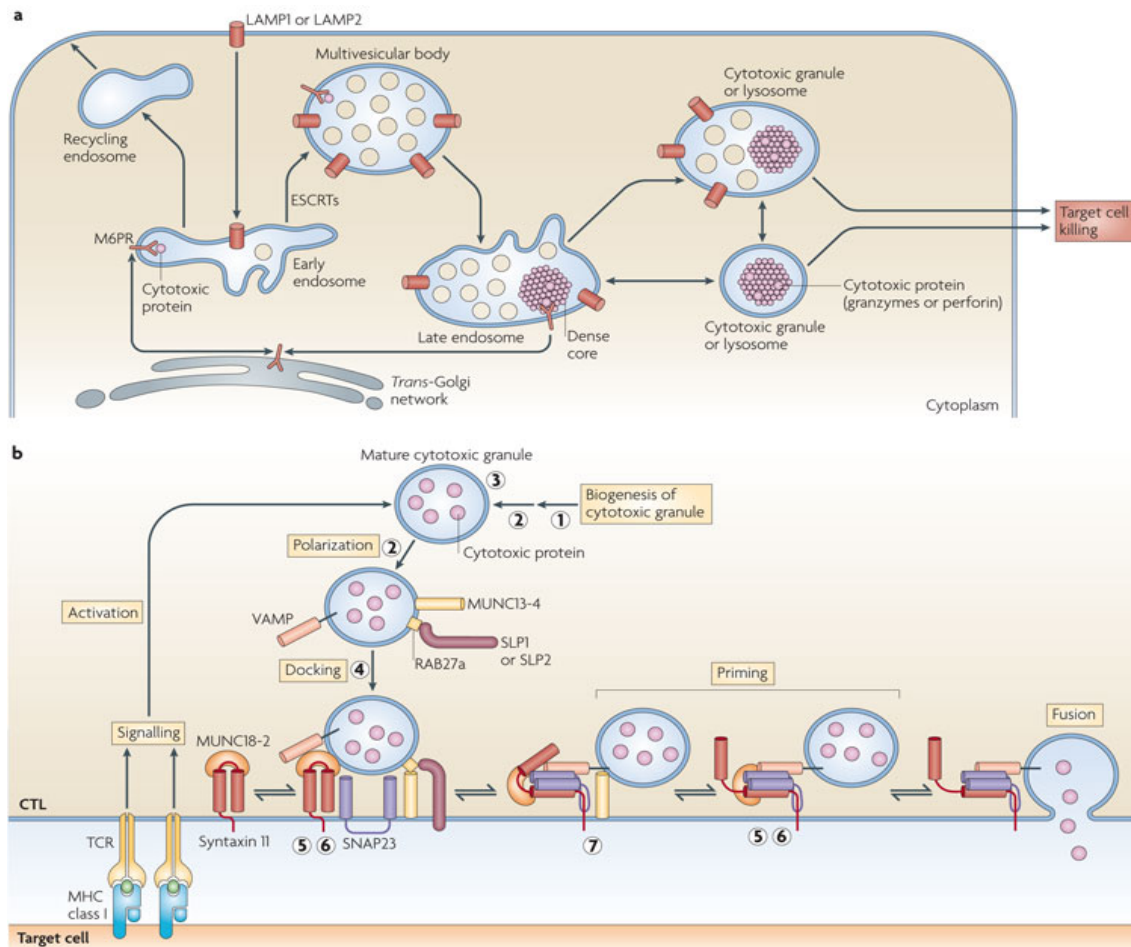
Deux études démontrent l'implication de la PKC δ dans la polarisation et l'exocytose des GC. Des CTL murins déficients pour cette protéine ont un défaut dans ces deux phénomènes, bien que le MTOC soit correctement polarisé, et sont donc incapables d'induire la lyse de la cellule cible (Ma et al., 2007). La PKC δ semble donc être impliquée dans les étapes précoces de la libération des granules lytiques.

La protéine Rab27a semble, quant à elle, être impliquée dans la dissociation des GC sur les microtubules. Le taux de Rab27a augmente au fur et à mesure que les granules se dirigent vers la SI. De plus, les protéines Slp1 et Slp2, des synaptotagmines, sont recrutées par Rab27a afin de permettre l'ancrage à la membrane (Holt et al., 2008; Menasche et al., 2008). L'interaction de Rab27a avec Munc13-4 permet l'étape « d'amorçage » de la fusion des GC avec la membrane plasmique. Un défaut d'expression de Munc13-4 se caractérise par une

anomalie de la sécrétion dans les CTL (Feldmann et al., 2003). Munc13-4 permet la stabilisation de la syntaxine-11 en conformation ouverte, nécessaire à la fusion des GC (Figure 13).

Très récemment, il a été montré que la protéine Syntaxin-8, de la famille tSNARE, régule l'acheminement des GC et leur exocytose dans le temps. L'inhibition par siRNA de la syntaxine-8 dans des CTL altère la cytotoxicité (Bhat et al., 2016).

Le recyclage des endosomes dépendant de VAMP8 stabilise la syntaxin-11 à la SI, facilitant l'assemblage des complexes SNARE pour la fusion des GC. L'exocytose des GC est donc un procédé séquentiel : la fusion des vésicules requiert le recyclage des endosomes dépendant de VAMP8 avant la fusion des GC (Marshall et al., 2015).



Nature Reviews | Immunology

Figure 13 : Modèle de biogénèse et exocytose des GC

Suite à la reconnaissance du complexe CMH/peptide à la surface d'une CPA, le CTL polarise ses granules à la SI. Les granules s'ancrent dans la membrane via l'interaction de Rab27a et des synaptotagmines Slp1 et Slp2. De plus, les granules interagissent avec le complexe Munc18-2/syntaxine-11 dans leur conformation fermée. Les vésicules ancrées sont ensuite activées par Munc13-4 probablement via le changement de conformation de la syntaxine-11 qui passe d'une conformation fermée à une conformation ouverte. Un complexe SNARE se forme alors entre les deux tSNARE (syntaxine-11 et SNAP23) et la vSNARE (VAMP7 ou VAMP8). Les numéros indiquent les étapes affectées par un défaut d'expression de LYST (1), AP3 (2), le perforine (3), Rab27a (4), la syntaxine-11 (5), MUNC18-2 (6) et MUNC13-4 (7). Adaptée de (de Saint Basile et al., 2010).

2.2.3 Mécanismes d'action de la voie perforine/granzyme

Une fois le contenu des granules lytiques libéré dans l'espace synaptique, le granzyme, libéré des endosomes grâce à l'action de la perforine, va pouvoir cliver un grand nombre de substrat dans la cellule cible (Figure 14). Les caspases sont les premiers substrats activés par le granzyme, en particulier les caspases 3, 6, 7, 8 et 10 qui semblent être activées par le granzyme B *in vitro*. *In vivo*, il apparaît que ce soit la caspase 3 qui est majoritairement activée (Darmon et al., 1995). Cependant, il semble que l'activation directe de la caspase 3 par le granzyme B est incomplète du fait de l'inhibition exercée par les IAP (*inhibitor of apoptosis*

proteins). L'implication des facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux Smac/DIABLO et HtRA2/OMI est cruciale pour induire la mort cellulaire. En effet, ces complexes interviennent dans l'inhibition des IAP, permettant à la caspase 3 d'être entièrement sous forme active. Le granzyme B peut activer la voie apoptotique mitochondriale de différentes manières, notamment par le clivage de Bid. La forme tronquée de Bid (tBid) transloque à la mitochondrie où elle induit l'activation et la translocation à la membrane mitochondriale de Bax et Bak (Heibein et al., 2000; Wang et al., 2001). Ceci induit la libération de facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux, tels que le cytochrome c, permettant la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase 9 qui va pouvoir, à son tour, cliver la caspase 3. La caspase 3 effectrice va cliver des substrats de mort dans la cellule cible menant à la fragmentation de l'ADN. Il a aussi été montré que le granzyme B peut, indépendamment des caspases, cliver des substrats de mort tel que DFF45/ICAD, un inhibiteur de la fragmentation d'ADN. Le granzyme A, présent aussi en grande quantité dans les granules lytiques, active une autre forme de mort apoptotique, distincte de celle induite par le granzyme B et des caspases, en induisant des dommages aux ADN simples brins ainsi que la perte de l'intégrité membranaire des cellules (Lieberman and Fan, 2003).

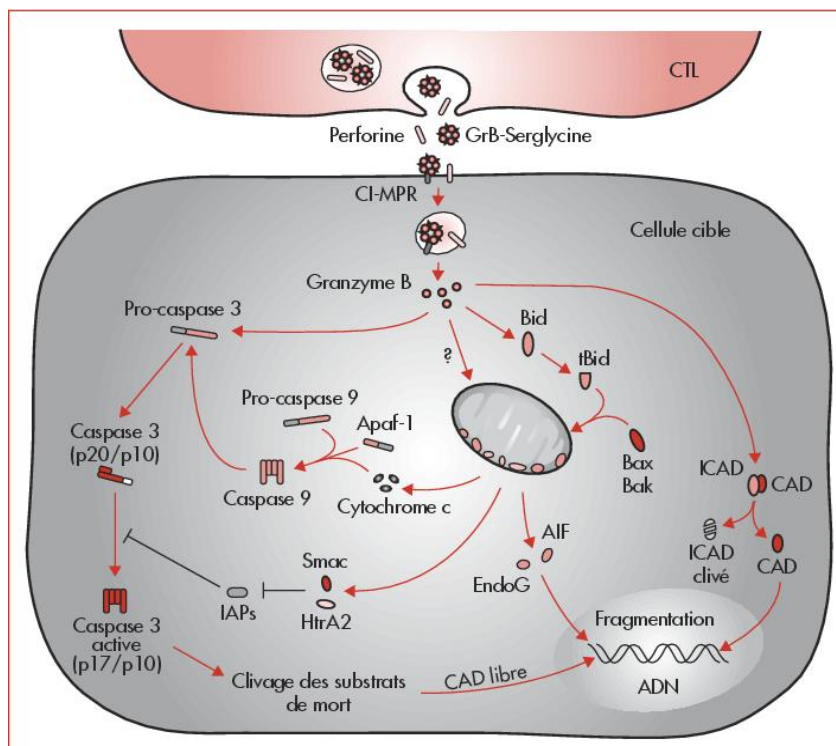


Figure 14 : Voies apoptotiques activées par le granzyme B

L'exocytose polarisée des granules cytotoxiques entraîne la libération de la perforine et des complexes macromoléculaires granzyme B-serglycine. Après liaison à son récepteur (CI-MPR), le granzyme B est internalisé par endocytose, conjointement avec la perforine. L'activité endosomolytique de cette dernière entraîne la libération de granzyme B dans le cytoplasme, où il va activer des voies apoptotiques dépendantes et indépendantes des caspases. Le granzyme B induit une activation incomplète de la caspase 3 (forme p20/10) du fait de l'inhibition exercée par les IAP. Le clivage de Bid génère une forme tronquée tBid qui, avec Bax et Bak, induit le relargage des facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux. Le cytochrome c va permettre la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase 9 qui va à son tour activer la pro-caspase 3. Les facteurs Smac/DIABLO et HtrA2/OMI inhibent l'action des IAP, permettant à la caspase 3 de finaliser son activation complète par autoprotéolyse. Enfin, les nucléases EndoG et AIF transloquent dans le noyau et fragmentent l'ADN. Le granzyme B peut également induire des dommages mitochondriaux indépendamment de Bid, par un mécanisme encore non identifié. Il clive directement un certain nombre de substrats des caspases dont ICAD, induisant la libération de CAD qui participe à la fragmentation de l'ADN.

Après la délivrance des GC dans la fente synaptique, le CTL doit se protéger de son autodestruction. Pour cela, différents mécanismes sont mis en place. La PI9 (*Proteinase Inhibitor 9*) est une protéine humaine capable de supprimer l'activité du granzyme B, notamment dans les CTL (Bladergroen et al., 2001). Par ailleurs, la cathepsine B, une cystéine protéase, semble aussi jouer un rôle important dans la protection du CTL. Présente dans les GC, elle est transférée à la surface des CTL après la libération du contenu des granules. La cathepsine peut cliver la perforine et ainsi former une barrière de protection pour le CTL. La calreticuline est une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique et fixant le Ca^{2+} , aussi présente dans les granules et colocalisant avec la perforine. Après exocytose des granules et exposition à des concentrations élevées de Ca^{2+} , la perforine et la calreticuline se dissocient.

La calreticuline peut supprimer l'activité lytique de la perforine en stabilisant la membrane (Fraser et al., 2000).

3. Échappement au système immunitaire

Comme décrit précédemment, les cellules immunitaires peuvent détruire les cellules tumorales grâce à de nombreux mécanismes. Ainsi, le système immunitaire est capable d'exercer une pression de sélection (*immunoediting*) aboutissant à des variants tumoraux résistants à la lyse par les cellules effectrices. Divers mécanismes d'échappement sont décrits. Il peut s'agir de la modulation d'expression de protéines à la surface de cellules immunitaires ou des cellules tumorales, de production de molécules immunosuppressives ou encore de cellules inhibitrices présentes dans le microenvironnement tumoral.

3.1 Modulation de l'expression de protéines

3.1.1 *Altération de la présentation antigénique*

Les tumeurs ne présentent pas de signaux de danger permettant l'induction de réactions immunitaires fortes. Les DC sont donc immatures et on observe ainsi une tolérance périphérique, ou ignorance (Steinman, 2003). Les cellules immunitaires produisent alors un faible taux de cytokines pro-inflammatoires et expriment faiblement les molécules du CMH-II et la molécule CD86. Une diminution de l'expression du CMH-II par les CPA a été retrouvée dans 78% des tumeurs de CBNPC, probablement due à la présence du TGF- β et de l'IL-10, sécrétés par les cellules tumorales pulmonaires (Foukas et al., 2001). Ces cytokines inhibent la maturation des DC et ainsi bloquent l'activation des lymphocytes T CD8⁺.

Il a aussi été montré que les cellules tumorales altèrent souvent l'expression des molécules de CMH-I (Derniame et al., 2008) ou de protéines impliquées dans l'apprêtement des antigènes telles que la β -microglobuline, TAP1 et TAP2 (*transporter associated with antigen processing*) (Lou et al., 2005). La modulation du CMH-I conduit à une diminution de la sensibilité à la lyse par les CTL.

3.1.2 *Perte d'expression des molécules d'adhérence*

Les intégrines et leurs ligands jouent un rôle primordial dans la formation de la SI, la polarisation et l'exocytose des GC. Ainsi, la diminution de l'expression de ICAM-1, ligand de LFA-1, ou de la E-cadhérine, ligand de CD103, correspond à un mécanisme d'échappement à l'immunosurveillance (Braakman et al., 1990; Passlick et al., 1996). Des études *in vivo* ont montré que la surexpression d'ICAM-1 inhibe la croissance tumorale et l'apparition de métastases, associée à une augmentation de la lyse induite par les cellules T (Tachimori et al.,

2005). À l'inverse, des études ont montré qu'ICAM-1 peut jouer un rôle dans l'invasion des cellules tumorales épithéliales (Rosette et al., 2005).

La E-cadhérine, marqueur des cellules épithéliales, est souvent modulée négativement au cours de la progression tumorale. Ceci conduit à une diminution de l'adhérence intercellulaire qui aboutit à l'invasion et la formation de métastases, et participant à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Perl et al., 1998). Le TGF- β peut conduire à l'EMT en réprimant l'expression de la E-cadhérine et en induisant l'expression de différents facteurs de transcription tels que Snail, Twist et Slug (Kurioka et al., 2016). Ces facteurs ciblent également de nombreux gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation, le métabolisme et l'apoptose.

3.1.3 Molécules favorisant l'apoptose des lymphocytes

La délétion de lymphocytes spécifiques de la tumeur peut avoir lieu grâce à différents mécanismes. Un modèle proposé est l'induction de l'apoptose par la voie Fas, molécule exprimée à la surface des CTL activés, lors de l'engagement avec son ligand FasL, exprimé à la surface des cellules tumorales ou de microvésicules sécrétées (Andreola et al., 2002). Cependant, cette contre-attaque de la tumeur est sujette à controverse du fait du rejet rapide de tumeurs exprimant FasL chez la souris (Igney and Krammer, 2005).

Par ailleurs, l'activation des lymphocytes T CD8⁺ suite à l'engagement du TCR conduit à l'expression de molécules de costimulation ou inhibitrices. Une des interactions la mieux caractérisée est celle entre les membres de la famille B7 (B7.1 et B7.2, appelé aussi CD80 et CD86) exprimés à la surface des CPA et la molécule activatrice CD28 à la surface des lymphocytes T (Nirschl and Drake, 2013). CD80 et CD86 interagissent aussi avec CTLA-4, dont l'expression est induite après activation du lymphocyte T. Ce checkpoint est essentiel pour assurer la tolérance du soi et prévenir l'autoimmunité en régulant l'activation du CTL. En effet, CTLA-4 recrute deux phosphatases, SHP2 et PP2A pour inhiber le signal TCR (Qin et al., 2016). Un autre checkpoint très étudié aujourd'hui est la molécule PD-1 (*Programmed Death-1*, CD279) exprimée sur les cellules immunes activées et pouvant se lier à PD-L1 (*Program Death-ligand 1*) et PD-L2 à la surface des cellules tumorales. L'engagement de PD-1 inhibe la PI3K kinase et la voie Akt essentielle pour la prolifération et la survie (Francisco et al., 2010), la sécrétion d'IL-2 nécessaire à la différenciation des cellules T effectrices (Sui et al., 2015) et conduit à la déphosphorylation de la chaîne ζ du complexe CD3 menant à l'inhibition du signal TCR (Sheppard et al., 2004).

3.2 Cellules immuno-suppressives

Différents types de cellules immunitaires peuvent contribuer à la progression tumorale en participant au développement d'un microenvironnement immunosuppresseur. Parmi elles, on trouve principalement les cellules Treg $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, les TAM (*Tumor Associated Macrophages*) et les MDSC (*Myeloid-Derived Suppressor Cells*).

3.2.1 Les cellules Treg

Les Treg sont retrouvées dans de nombreux types de tumeurs et sont souvent associées à un mauvais pronostic. Ces cellules inhibent la réponse immunitaire antitumorale et jouent un rôle favorable à l'angiogenèse. On distingue deux types de cellules Treg : les cellules Treg naturelles, qui se développent dans le thymus, et les cellules Treg adaptatives qui dérivent de cellules T $CD4^+$ naïves dans les tissus périphériques, en présence de TGF- β ou d'IL-10 (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009). Le mécanisme d'immunosuppression le plus connu est la sécrétion d'IL-10, de TGF- β et d'IL-35 qui inhibe la prolifération, la sécrétion de cytokine et la lyse des cellules T effectrices (Vignali et al., 2008). Il a été démontré que les Treg sont aussi capables d'exercer des activités lytiques grâce au granzyme B (Gondek et al., 2005), la voie TRAIL (Ren et al., 2007) et Galectin-1 (Garin et al., 2007). L'inhibition métabolique des CTL par les Treg, bien que controversée, a été suggérée par différentes voies : la privation locale d'IL-2 et d'IL-7 menant à l'apoptose des effecteurs (Pandiyani et al., 2007) et la catalyse de l'ATP en adénosine qui inhibe les fonctions effectrices des lymphocytes T (Deaglio et al., 2007). Les cellules Treg naturelles sont capables d'inhiber la maturation des DC par un mécanisme dépendant de CTLA-4 faisant intervenir IDO (indoleamine-2,3-dioxygénase), une molécule capable de cataboliser le tryptophane, permettant à la fois de générer des métabolites immunosuppresseurs et de priver les lymphocytes T du tryptophane essentiel (Fallarino et al., 2003). Les Treg sont aussi capables de diminuer la capacité des DC à activer les CTL par l'inhibition de molécules de costimulation ou par l'inhibition de la maturation des DC *via* l'IL-10 et le TGF- β (Cederbom et al., 2000).

3.2.2 Les cellules suppressives dérivées des myéloïdes

Chez les individus sains, les MDSC sont présentes en faible quantité dans la circulation et permettent la régulation des réponses immunitaires et la réparation tissulaire. Cette population augmente rapidement lors d'une inflammation ou d'une tumeur. Les MDSC correspondent à une population hétérogène de cellules myéloïdes immatures capables d'inhiber les réponses lymphocytaires T. Une forte infiltration des tumeurs par des MDSC est

associée à un mauvais pronostic et à une résistance à diverses thérapies (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). En sécrétant des cytokines immunosuppressives et des dérivés de l'oxygène tels que les peroxy-nitrites, les MDSC altèrent les fonctions cytotoxiques des CTL. La sécrétion de la métalloprotéinase MMP9 contribue à l'angiogenèse tumorale. Les MDSC peuvent aussi, au sein de la tumeur, se différencier en macrophages associés aux tumeurs (TAM) (Gabrilovich and Nagaraj, 2009).

3.2.3 *Les TAM*

Les TAM peuvent se polariser selon l'environnement dans lequel ils sont présents : M1 ou M2. Le phénotype M2 est immunosuppresseur et se caractérise par la production d'IL-10, d'IL-1b, de TGF- β et de G-CSF (Tiemessen et al., 2007). Ces derniers contribuent alors à la progression tumorale, l'angiogenèse en produisant du VEGF, et la formation de métastases (Takeya and Komohara, 2016). Ils sécrètent de l'IL-10 et de l'IL-1b, induisent l'angiogenèse via la production de VEGF.

III. LES INTÉGRINES

1. Généralités

Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires formées de deux sous-unités α et β qui agissent comme molécules d'adhésion et permettent l'attachement entre cellules ou à la matrice extracellulaire (Pan et al., 2016). Elles recouvrent la membrane plasmique et, grâce à l'interaction avec des protéines de la matrice extracellulaire, des sélectines ou cadhérines, permettent la communication intercellulaire. Leur nom provient de leur capacité à lier les environnements extra- et intracellulaires en se fixant à leur ligand à l'extérieur de la cellule et aux composants du cytosquelette et aux molécules de signalisation à l'intérieur de la cellule (Tamkun et al., 1986). Elles possèdent un large domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique. Chez les mammifères, l'assemblage de façon non covalente de 18 sous-unités α et 8 sous-unités β offre ainsi 24 possibilités de récepteurs différents, possédant chacun ses propriétés et sa localisation tissulaire (Figure 15). De plus, il existe différents variants d'épissage, par exemple, on trouve la sous-unité $\beta 1$ sous quatre formes. Les sous-unités α et β ne présentent aucune homologie de séquence. Cependant, on retrouve 30% d'homologie entre les chaînes α et 45% entre les sous-unités β . L'hétérodimérisation des intégrines se produit dans le compartiment intracellulaire avant que l'intégrine ne soit présentée à la surface des cellules. Généralement, la sous-unité β est en excès dans la cellule, c'est donc la quantité de la sous-unité α qui détermine la quantité de récepteur exprimée à la surface cellulaire (Kilshaw, 1999). La diversité des intégrines contribue à la diversité des ligands et des voies de signalisation induites qui permettent de contrôler divers processus tels que la prolifération, l'apoptose, la différenciation, la migration cellulaire et les réponses immunes (Schwartz et al., 1995). Certaines intégrines sont spécifiquement exprimées à la surface des cellules du système immunitaire, par exemple les intégrines $\beta 2$ et $\beta 7$ sont exprimées à la surface des leucocytes tandis que les intégrines $\beta 1$ sont exprimées par de nombreux types cellulaires (Luo et al., 2007). LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$), Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) et VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) sont des intégrines leucocytaires impliquées dans le processus d'extravasation. LFA-1 a pour ligand principal ICAM-1, exprimé essentiellement par les cellules endothéliales vasculaires, tandis que VLA-4 reconnaît exclusivement VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*). Les intégrines ont la capacité de se lier via leur domaine extracellulaire à leurs ligands en des temps très courts, inférieurs à une seconde, contrairement à d'autres molécules d'adhésion. De cette manière, les intégrines permettent aux leucocytes de

se lier aux vaisseaux sanguins et de migrer à travers la barrière endothéliale par diapédèse, menant à une réponse immunitaire ou inflammatoire.

Les intégrines ne sont donc pas uniquement des molécules d'adhésion, elles sont nécessaires au bon fonctionnement du système immunitaire pour l'adhésion des leucocytes circulant mais aussi leur migration au sein des tissus, la formation de synapses immunologiques et la signalisation lors de la costimulation du signal TCR.

Ces molécules d'adhésion sont présentes à la surface cellulaire dans une conformation inactive, et des signaux provenant de l'engagement du TCR ou de récepteurs aux chimiokines permettent leur activation *via* la voie dite *inside-out*. Les intégrines peuvent donc transmettre des signaux bidirectionnels, de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (signalisation de type *outside-in*) comme toute signalisation classique, et de l'intérieur vers l'extérieur (signalisation de type *inside-out*) dans le but de réguler l'état d'activation de l'intégrine et ainsi la fixation à ses ligands.

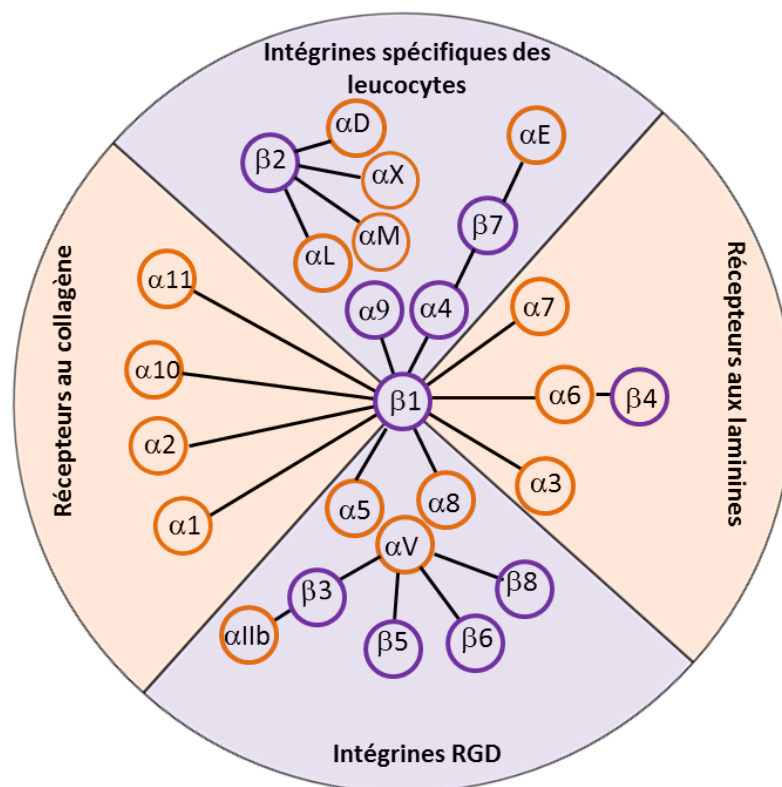


Figure 15 : Les différentes familles d'intégrines.

Les intégrines sont classées en 4 sous-groupes selon leurs propriétés de liaison à leurs ligands ou leur distribution tissulaire. On distingue les intégrines liant la laminine ou le collagène, celles qui reconnaissent la séquence RGD et celles qui sont spécifiques des leucocytes. Adaptée de (Barczyk et al., 2010).

2. Structure des intégrines

2.1 Sous-unité α des intégrines

Les sous-unités α des intégrines sont composées d'un large domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire, d'une séquence conservée de 5 acides aminés et d'un court domaine cytoplasmique. Le domaine extracellulaire contient 7 segments d'environ 30-40 acides aminés, espacés de 20 à 30 acides aminés. Ces segments forment les 7 feuillets du domaine β -propeller (propulseurs), lui-même lié aux autres domaines appelés *thigh* (« cuisses »), *genu* (« genou »), *calfl* et *calf2* (« mollets ») (Figure 16). Le « genou » est un domaine flexible qui permet au récepteur d'adopter une forme repliée ou étendue. Ces structures réunies forment un long domaine cytoplasmique qui supporte la partie supérieure de l'intégrine. La moitié des dix-huit sous-unités α contient un domaine d'environ 200 acides aminés, appelé domaine I ou domaine A, analogue au facteur von Willebrand de type A (Larson et al., 1989). Ce domaine, lorsqu'il est présent, est inséré entre les domaines propulseurs 2 et 3. Il correspond au site de liaison extracellulaire exclusif pour les ligands des intégrines. C'est donc la sous-unité α qui détermine la spécificité du ligand de l'intégrine. Ce domaine contient un site conservé appelé MIDAS (*Metal Ion Dependent Adhesion Site*) qui permet la fixation d'un cation divalent, Ca^{2+} ou Mg^{2+} , et la fixation du ligand. Le domaine MIDAS et les ions qui s'y attachent sont importants dans l'étape d'adhérence. Une mutation du site MIDAS bloque en effet le mécanisme d'adhérence de l'intégrine au ligand (Fuortes et al., 1994). La fixation du ligand au domaine I de la sous-unité α altère la coordination de l'ion métallique et entraîne un changement de conformation spatiale de l'intégrine. Celle-ci passe alors d'un état fermé (de repos) à un état ouvert (actif) qui aura pour conséquence une augmentation de l'affinité du ligand et l'activation de l'intégrine (Liddington and Ginsberg, 2002). Les deux formes se distinguent l'une de l'autre suite à des rotations de l'hélice α qui engendrent des modifications structurales de l'intégrine. La cristallographie a montré qu'une rotation de 10 Angstrom de la partie C-terminale de l'hélice α entraîne un réarrangement du site de fixation des ions au niveau du domaine MIDAS et par conséquent induit une augmentation importante de l'affinité de l'intégrine pour son ligand (Takagi et al., 2002).

Le domaine transmembranaire des intégrines correspond à une structure en hélice, qui s'homodimérise ou s'hétérodimérise, d'une longueur d'environ 25 à 29 acides aminés. Les domaines cytoplasmiques sont généralement courts, entre 10 et 70 acides aminés. Il y a peu d'homologie de séquences entre les domaines cytoplasmiques, excepté la séquence GFFKR situé après la partie transmembranaire. La diversité des queues cytoplasmiques permet ainsi

une spécificité pour chaque intégrine. Les mécanismes d'activation et les voies de signalisation induites peuvent donc différer pour chaque intégrine. Cette courte séquence GFFKR hautement conservée joue un rôle important dans le passage de l'état inactif à l'état actif et est nécessaire à l'interaction avec la queue cytoplasmique de la sous-unité β . Les domaines proximaux conservés GFFKR, situés dans le domaine cytoplasmique de la sous-unité α , et HDR(R/K)E, situé dans le domaine cytoplasmique de la sous-unité β forment un pont salin entre l'arginine de la sous-unité α et l'acide aspartique de la sous-unité β (Vinogradova et al., 2000). Cette liaison ionique jouerait un rôle majeur dans le maintien de l'intégrine dans un état inactif, donc de faible affinité pour son ligand. La délétion de la queue cytoplasmique α ou uniquement de la séquence conservée GFFKR conduit à une activation constitutive des intégrines, à l'inverse des délétions conservant le domaine GFFKR, démontrant le rôle primordial de cette séquence dans l'activation de l'intégrine (Liu et al., 2015; O'Toole et al., 1994; O'Toole et al., 1991). Les domaines cytoplasmiques courts des deux sous-unités n'ont aucune fonction enzymatique intrinsèque mais participent directement à la régulation de l'activation et de la signalisation des intégrines en interagissant avec différentes molécules cytoplasmiques.

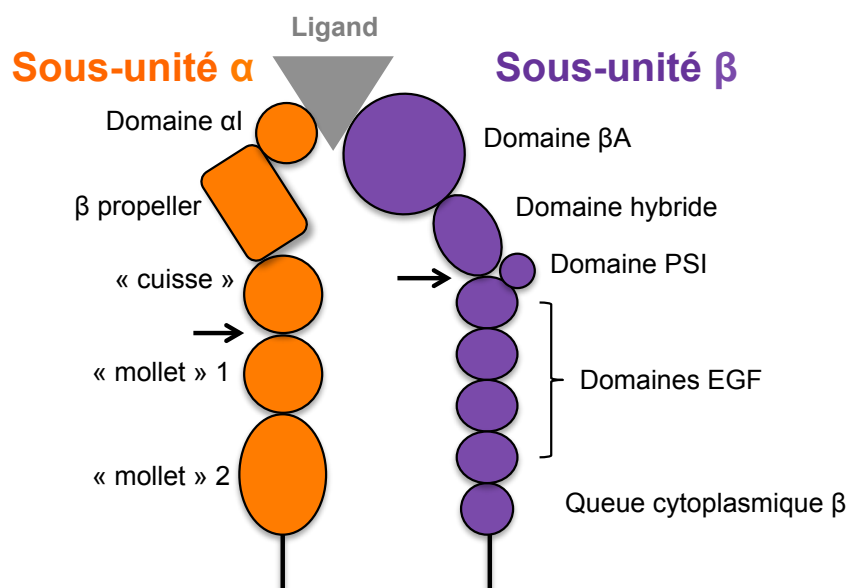


Figure 16 : Organisation structurale des intégrines.

Les flèches noires indiquent les sites de dépliage de l'intégrine. La fixation du ligand (gris) est dépendante de la présence d'un ion dans le site MIDAS.

2.2 Sous-unité β des intégrines

La sous-unité β contient un domaine globulaire $\beta 1$ analogue au domaine αI . Ce domaine est inséré entre deux domaines hybrides, eux-mêmes insérés entre deux domaines PSI (*plexin-*

semaphorin-integrin). On trouve ensuite quatre domaines EGF (Epidermal Growth Factor) riches en cystéines précédant le domaine β -tail (Figure 16). Le domaine $\beta 1$ est constant et porte un domaine MIDAS, impliqué dans la fixation du ligand, ainsi qu'un site adjacent, le site ADMIDAS (*Adjacent to MIDAS*) inhibé par le Ca^{2+} et activé par le Mn^{2+} . La fixation de Mn^{2+} a pour conséquence l'induction d'un changement conformationnel de l'intégrine menant à son activation (Humphries et al., 2003). Une étude de la structure de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ indique que les cations peuvent se fixer à trois sites : le Mg^{2+} au site MIDAS et le Ca^{2+} à deux sites adjacents (Zhu et al., 2008a).

Dans le cas où le domaine αI est absent (comme pour les chaînes $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$, αV et αIIb), la sous-unité β joue un rôle important dans l'interaction avec le ligand (Pan et al., 2016). Celui-ci se lie à l'intégrine par une poche dans le domaine globulaire à l'interface entre les deux sous-unités. Le ligand peut ainsi interagir avec l'ion métallique situé dans le domaine MIDAS de la sous-unité β et avec le domaine propulseur de la sous-unité α . L'interaction entre les sous-unités α et β repose sur des interactions engageant des résidus glycines dans le domaine transmembranaire. Les queues cytoplasmiques des chaînes β des intégrines présentent de fortes homologies de séquences avec le motif NPX/Y capables de lier les protéines contenant les domaines PTB (*Phosphotyrosine-binding domain*) (Bouaouina et al., 2008) et participent à la transduction du signal en liant les protéines cytoplasmiques.

Plusieurs protéines interagissant avec les queues cytoplasmiques β de manière positive ou négative ont été décrites. On trouve par exemple la taline et la kindline qui agissent de manière synergique pour activer les intégrines (Theodosiou et al., 2016), alors que la filamine A régule négativement cette activation (Kiema et al., 2006). De plus, la protéine Migfiline inhibe la liaison entre l'intégrine et les filamines (Ithychanda et al., 2009). Les protéines ILK (*Integrin Linked Kinase*) et FAK, participant à la signalisation de type *outside-in*, peuvent aussi avoir un impact sur l'activation de l'intégrine *via* une signalisation de type *inside-out* (Michael et al., 2009).

3. Activation et recyclage des intégrines

3.1 Changement de conformation

Afin d'exercer son rôle, une intégrine doit être activée pour reconnaître son ligand. Ceci correspond au passage d'une conformation fermée à une conformation ouverte. Les différentes conformations sont associées à des affinités différentes pour le ligand et à une mobilité latérale menant au *clustering*, c'est à dire à leur regroupement à la membrane, dans l'état activé de l'intégrine (Luo and Springer, 2006). Généralement, les intégrines présentes à

la surface de la cellule sont inactives et ne peuvent donc pas fixer leur ligand ou répondre aux signaux cellulaires. Cet état est caractérisé par un repliement de l'intégrine qui masque le site de fixation du ligand. La conformation inactive est stabilisée par des interactions entre les domaines transmembranaires et les domaines extracellulaires ainsi que par un pont salin entre les domaines cytoplasmiques. L'extrémité de l'intégrine peut alors se trouver à environ 5 nm de la membrane cellulaire. Lorsque l'intégrine est en conformation dite « dépliée », celle-ci présente une affinité intermédiaire pour son ligand. L'extrémité de l'intégrine se trouve généralement alors à 20 nm de la surface cellulaire. Seules les intégrines en conformation de haute affinité permet une interaction stable avec son ligand. Dans cette conformation et lorsqu'elles fixent leurs ligands, la force d'adhésion est augmentée grâce au *clustering* des intégrines, c'est-à-dire à leur regroupement à la membrane. Le *clustering* peut se produire à la suite de la fixation du ligand (signal *outside-in*) ou de signaux *inside-out* provenant par exemple de l'activation du TCR (Stewart et al., 1998).

Les domaines transmembranaires sont impliqués dans les changements de conformation. En effet, le résidu arginine dans le motif conservé GFFKR du domaine cytoplasmique de la chaîne α et l'acide aspartique de la chaîne β forment un pont salin qui permet de rapprocher les deux domaines cytoplasmiques, gardant l'intégrine dans un état inactivé. Des mutations ou délétions des résidus du domaine transmembranaire entraînent la séparation des deux sous-unités, permettant à l'intégrine d'être sous forme active. Des études par FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) ont permis de démontrer *in vivo* des changements de conformation entre les domaines cytoplasmiques des chaînes α L et β 2 de l'intégrine LFA-1. À l'état inactif, les queues cytoplasmiques α et β sont proches. Cependant, la stimulation avec un agoniste menant à l'activation de l'intégrine, ou l'introduction de mutations dans le domaine proximal de la chaîne α , conduisent à une diminution du signal FRET et donc à des changements de conformations des domaines cytoplasmiques α et β qui s'éloignent (Kim et al., 2003).

Par ailleurs, comme décrit précédemment, les cations divalents tels que Ca^{2+} ou Mg^{2+} jouent aussi un rôle dans la stabilisation des intégrines par le domaine MIDAS. Une forte concentration en Ca^{2+} ou Mg^{2+} (1 nM) maintient l'intégrine sous forme inactive. À l'inverse, l'absence de ces ions augmente l'affinité des intégrines et ainsi l'adhésion cellulaire.

3.2 Recyclage des intégrines

La régulation des intégrines peut s'effectuer à différents niveaux. Bien que le rôle de la dégradation des intégrines fût longtemps négligé, il est désormais clair que le trafic *via* la voie

endosomale influence la fonction des intégrines, contrôlant ainsi leur disponibilité à la surface cellulaire et leur signalisation. Il a été estimé que le cycle d'endocytose-exocytose a lieu toutes les 30 min (Caswell and Norman, 2006). Par ailleurs, des progrès récents ont permis d'identifier des mutations et oncogènes cruciaux régulant le trafic des intégrines, et ainsi l'invasion cellulaire et les métastases (Caswell and Norman, 2006).

La majorité des intégrines semble ne pas être dégradée mais recyclée par endocytose. La régulation spatio-temporelle permet d'externaliser des molécules à la membrane cellulaire afin de générer de nouvelles adhérences. Différents mécanismes d'internalisation des intégrines ont été mis en évidence, notamment par macropinocytose, ou par des mécanismes dépendants de la cavéoline ou de la clathrine (De Franceschi et al., 2015). Selon les types d'adhérences, le taux de recyclage varie, suggérant l'existence de voies différentes. Certaines intégrines, telles que $\alpha_v\beta_3$ retournent à la membrane à partir d'endosomes précoces, sous le contrôle de la GTPase Rab4. D'autres transitent des endosomes précoces au PNRC (*perinuclear recycling compartment*) régulé par Rab11 avec la contribution d'Arf1 et Arf6 (Figure 17) (De Franceschi et al., 2015). Il a été montré que le désassemblage des points d'adhésion focaux était lié, dans des conditions particulières, à l'endocytose d'intégrines actives engagées avec leurs ligands. La dynamine-2, FAK, la clathrine et les microtubules semblent réguler le renouvellement des points d'adhésion focaux. La décision entre la dégradation et le recyclage est influencée par la protéine nexine17, qui empêche la dégradation lysosomale des intégrines β_1 en se fixant à leur queue cytoplasmique dans les endosomes précoces (Bottcher et al., 2012).

Par ailleurs, des études ont été menées afin de déterminer l'état d'activation de l'intégrine recyclée. Il a ainsi été montré que l'intégrine β_1 sous forme active ou inactive est internalisée par la même voie, dépendante de la clathrine et de la dynamine. Cependant, la forme active de l'intégrine β_1 est ensuite recyclée par la voie « longue » dépendante de Rab11 alors que la forme inactive est recyclée rapidement de manière dépendante de l'actine, Rab4 et Arf6 (Arjonen et al., 2012). Le taux d'endocytose de la forme active de β_1 est plus élevé que celui de la forme inactive. Ainsi, la forme inactive est principalement localisée à la membrane plasmique, alors que la forme active semble cytoplasmique. Ceci est principalement dû au fait que l'intégrine liée à son ligand est recyclée par les endosomes tardifs et par les lysosomes, soit pour sa dégradation soit pour le détachement du ligand, et que l'acidité de l'environnement est essentielle pour le recyclage à la membrane de l'intégrine sans son ligand (Lobert and Stenmark, 2012).

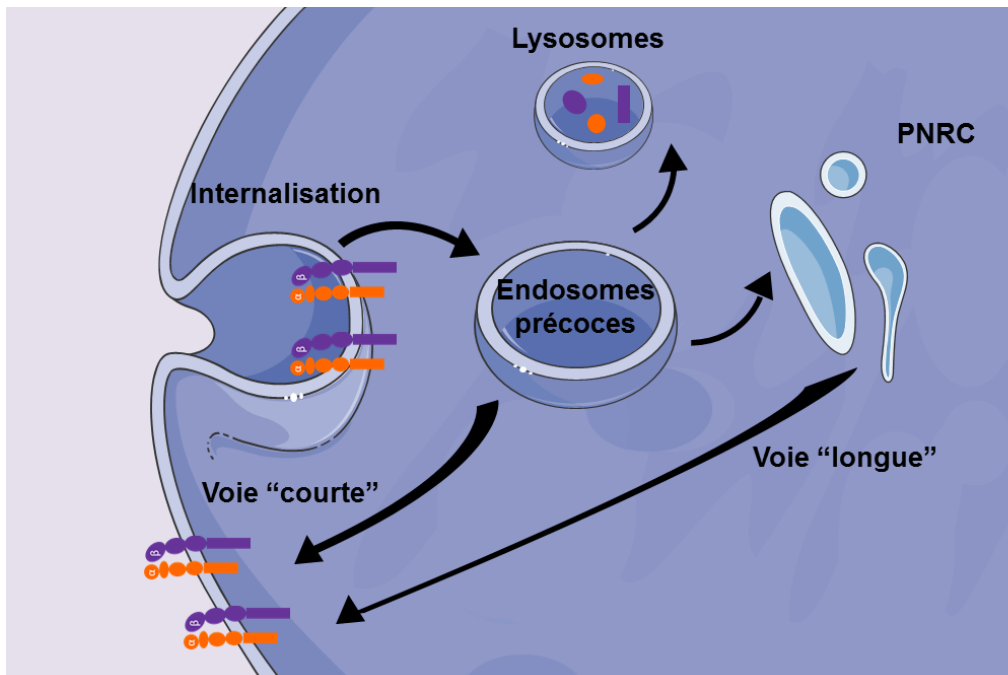


Figure 17 : Mécanismes de recyclage des intégrines

À la membrane plasmique, les intégrines actives ou inactives sont endocytées dans des endosomes précoces. Certaines intégrines sont rapidement recyclées tandis que d'autres, telle que la β_1 active, transitent par la voie « longue ». Adaptée de (De Franceschi et al., 2015).

4. Signalisation *inside-out*

L'affinité des intégrines pour leurs ligands est étroitement régulée par leurs structures hétérodimériques et par les signaux cytoplasmiques de la cellule, c'est la voie *inside-out*. Il s'agit de l'ensemble des événements intracellulaires qui permettent des modifications conformationnelles de l'intégrine. Elles peuvent être activées par des signaux provenant de récepteurs couplés aux protéines G, tels que les récepteurs aux chimiokines, qui conduisent à la phosphorylation du domaine intracellulaire de la chaîne β . L'association des chaînes α et β , qui permet aux intégrines de rester inactives, est rompue lors de la stimulation par des chimiokines ou par le déclenchement du signal TCR dans le cas des lymphocytes T. Les principaux partenaires protéiques de l'activation des intégrines décrits sont les talines et les kindlines, bien que de nouvelles protéines partenaires aient été identifiées ces dernières années (Figure 18).

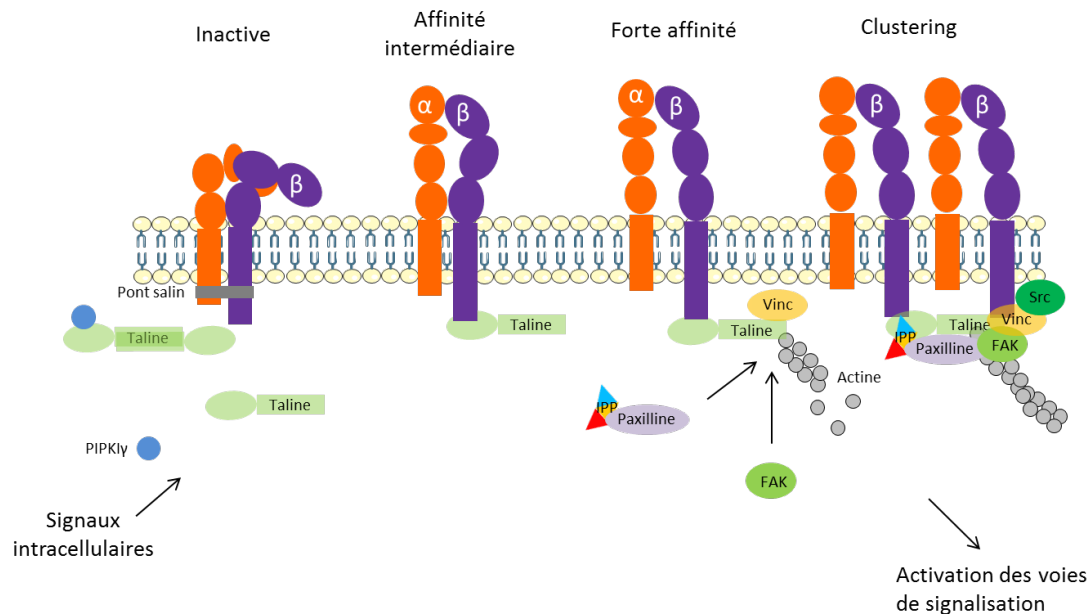


Figure 18 : Biogénèse des adhésions focales

Les intégrines sont présentes à la surface cellulaire majoritairement dans un état inactif, dit « replié ». Cette conformation est stabilisée par des interactions entre les domaines transmembranaires, les domaines extracellulaires proches de la membrane et un pont salin entre les domaines cytoplasmiques. Le recrutement et l'activation de la taline à la membrane plasmique, en association avec la PIPK γ , à la chaîne β des intégrines, permettent la séparation des domaines cytoplasmiques. Les intégrines adoptent alors une conformation dite intermédiaire. Le dépliement des intégrines permet de démasquer le site de fixation du ligand. La taline sert de plateforme de recrutement pour d'autres protéines. Le complexe ILK/PINCH/parvine est recruté aux adhésions focales par l'intermédiaire d'autres protéines, telle que la paxilline. La maturation des adhésions focales implique le *clustering* des intégrines activées et engagées avec leurs ligands, ainsi que l'assemblage de complexes multiprotéiques capables de lier les intégrines au cytosquelette d'actine et d'initier diverses voies de signalisation. Adaptée de (Legate et al., 2009).

4.1 Initiation de l'activation des intégrines

Des stimuli perçus à la surface cellulaire, tels que l'engagement du TCR ou d'un récepteur aux chimiokines, permettent de générer des signaux intracellulaires déclenchant l'activation des intégrines. L'activation des intégrines par les chimiokines est très rapide et est impliquée à la fois dans l'induction d'une conformation de haute affinité et dans l'augmentation de la mobilité latérale des intégrines à la membrane plasmique (Laudanna et al., 2002).

L'engagement du TCR avec le complexe p-CMH permet la phosphorylation et l'activation de LCK (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) et ainsi la phosphorylation des motifs ITAM du complexe TCR/CD3. La kinase ZAP-70, recrutée et phosphorylée par LCK, phosphoryle à son tour des adaptateurs tels que LAT et SLP-76. Cette protéine *scaffold* joue un rôle central en s'associant avec diverses protéines telles que Vav1 ou ADAP (*adhesion and degranulation promoting adapter protein*) permettant la régulation du

cytosquelette d'actine et l'activation des intégrines (Zhang and Wang, 2012). ADAP peut se lier à SKAP-55 (*Src Kinase-associated protein*), qui elle-même se lie et recrute RapL à la membrane, permettant l'interaction directe avec l'intégrine LFA-1 et par conséquent l'adhésion cellulaire. SKAP-55 interagit aussi de manière constitutive avec RIAM (*Rap1-GTP-interacting adapter molecule*), et grâce à son interaction avec VASP et la Taline, RIAM induit l'activation de l'intégrine *via* le cytosquelette d'actine (Figure 19).

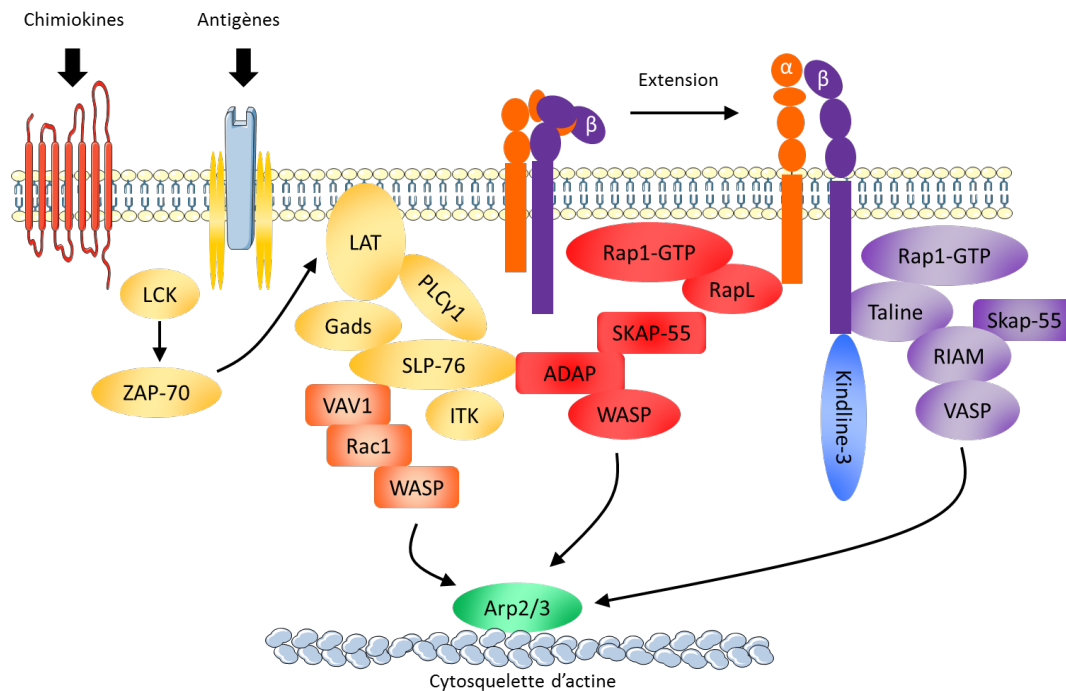


Figure 19 : Effecteurs clés de la signalisation *inside-out* des intégrines dans les lymphocytes T. Après une stimulation du TCR ou de récepteurs aux chimiokines, LCK, phosphorylée et activée, phosphoryle le complexe TCR/CD3. ZAP-70, recrutée et phosphorylée par LCK, phosphoryle différents adaptateurs tels que LAT et SLP-76. SLP-76, associée à Vav1, interagit avec WASP et active le complexe ARP2/3 (orange). SLP-76 interagit aussi avec ADAP, qui se lie à SKAP-55 et VASP, permettant le recrutement de RapL sur LFA-1, augmentant ainsi l'adhésion (rouge). SKAP-55 interagit constitutivement avec RIAM. La fixation de RIAM à VASP et à la taline suggère que RIAM induit l'activation de l'intégrine *via* le cytosquelette d'actine (violet). D'autres protéines, telles que les kindlines ou paxilline peuvent aussi réguler l'activation des intégrines. Adaptée de (Zhang and Wang, 2012).

4.2 Protéines associées à la signalisation *inside-out*

4.2.1 La taline

La taline, une protéine du cytosquelette, est capable de se fixer à la fois sur la queue cytoplasmique de la chaîne β et d'interagir avec l'actine, permettant aux intégrines de faire le lien avec le cytosquelette d'actine. Elle entraîne la dissociation des chaînes α et β permettant d'augmenter l'affinité des intégrines pour leurs ligands (Ginsberg et al., 2005). La taline est composée d'une tête globulaire en N-terminale et d'un domaine élongé en C-terminale séparé

par un site de clivage pour la calpaïne II, une protéase calcium-dépendante (Rees et al., 1990). La tête globulaire contient un domaine FERM (4.1 protéine, ezrine, radixine, moesine), composé de trois sous-domaines (F1, F2 et F3), très conservés dans de nombreuses protéines du cytosquelette. Le sous-domaine F3, contenant une séquence PTB (*phosphotyrosine binding*), interagit avec le motif NPxY de la queue cytoplasmique de la chaîne β des intégrines mais contient aussi des sites de fixation pour des molécules de signalisation telles que FAK ou PIP2 afin d'assurer la régulation de la fonction de la taline et ainsi l'activation de l'intégrine. Le domaine élongé contient un site supplémentaire de liaison à l'intégrine, deux sites de liaison à l'actine et trois sites de liaison à la vinculine et permet aussi la dimérisation antiparallèle entre deux monomères de taline (Haining et al., 2016).

La taline est présente sous forme inactive dans le cytoplasme. Il existe au moins deux voies permettant son activation. L'une s'effectuerait par l'intermédiaire de RIAM grâce à une voie de signalisation dépendante de PKC α et Rap1. L'autre voie d'activation passerait par le recrutement et l'activation de la tyrosine kinase Src par les intégrines permettant la liaison de PIP γ -90 sur la taline, la translocation du complexe à la membrane et l'activation de la taline par la synthèse locale du PIP2. Ceci induirait un changement de conformation de la taline et son interaction avec l'intégrine. Il semble que plusieurs modes d'activation des intégrines par la taline coexistent en fonction de l'intégrine puisque le domaine PTB F3 de la taline est suffisant pour activer l'intégrine β_3 mais pas l'intégrine β_1 . L'activation de l'intégrine par la taline pourrait être renforcée par la kindline, un coactivateur, qui interagit avec un site distinct de la chaîne β (Ma et al., 2008).

Il existe aussi des régulateurs négatifs qui peuvent agir lors de la signalisation *inside-out*. Par exemple, la protéine PIP γ -90 (*Phosphatidylinositol phosphate kinase type I*) entre en compétition avec la taline pour la fixation sur la chaîne β (Calderwood, 2004). La fixation de la taline est ainsi bloquée empêchant l'activation de l'intégrine. La phosphorylation de la tyrosine sur le motif NPxY constitue un autre mode de régulation associé à la liaison de l'intégrine avec son ligand par des kinases de la famille Src. En effet, il a été montré que la phosphorylation de la tyrosine 747 de β_3 conduit à une modification de l'affinité de la taline, au profit de DOK1, une protéine qui régule négativement l'activation de l'intégrine (Oxley et al., 2008).

4.2.2 Les kindlines

La famille des kindlines comporte trois isoformes. Des études d'inhibition ou de surexpression indiquent que les kindlines sont capables de réguler l'activation de certaines

intégrines, mais uniquement lorsque la taline interagit avec les chaînes β . Chez l'Homme, la perte de la kindline-3 entraîne une déficience d'adhérence leucocytaire de type III (LADIII) (Mory et al., 2008). Tout comme la taline, la kindline possède trois domaines FERM en région C-terminale lui permettant de se fixer au motif NPxY de la chaîne β des intégrines. Les kindlines ne possèdent pas d'activités enzymatiques intrinsèques, mais ont la capacité de fixer de nombreux effecteurs et peuvent ainsi être au cœur de complexes multimoléculaires actifs. Il a d'ores et déjà été montré que la kindline peut se fixer à de nombreux partenaires protéiques tels que la paxilline, l' α -actinine, Src, ADAP ou l'ILK (Theodosiou et al., 2016). Bien que les mécanismes sous-jacents restent indéterminés, des études récentes suggèrent que la fixation de l'ILK à la kindline entraîne sa localisation aux points d'adhésion focaux et l'activation de l'intégrine. Une étude réalisée dans *C. elegans* suggère que la fixation de l'ILK à la kindline induit un changement de conformation de la kindline lui permettant de se fixer aux queues cytoplasmiques des intégrines (Qadota et al., 2012). Cependant, ce mécanisme n'a pas été observé dans les orthologues mammaliens (Fukuda et al., 2014).

4.2.3 Les GTPases

Les Rap GTPases sont des petites protéines G capables d'hydrolyser le GTP en GDP. Elles s'activent en réponse à divers signaux extracellulaires et régulent la réorganisation du cytosquelette d'actine et l'adhérence cellulaire induite par les intégrines. L'activité des Rho GTPases est régulée positivement par des GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*) et négativement par des GAP (*GTPases Activating protein*).

Rap1 est une GTPase impliquée dans la signalisation *inside-out* de nombreuses intégrines telles que $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_L\beta_2$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_M\beta_2$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Lagarrigue et al., 2016). La forme constitutivement active de Rap1 est suffisante pour conduire à l'activation des intégrines dans les lymphocytes T et les macrophages, en l'absence d'agonistes extracellulaires. À l'inverse, l'expression d'un dominant négatif de Rap1 dans des cellules Jurkat inhibe l'activation de l'intégrine LFA-1 déclenchée par un signal TCR (Katagiri et al., 2004).

Rap1 est régulée par la PKC et est capable de former un complexe avec la taline par l'intermédiaire de Rap1-GTP facilitant ainsi l'interaction de la taline avec la chaîne β (Han et al., 2006). L'activation des agonistes des récepteurs aux protéines G aboutit à la formation de DAG, augmentant la concentration de calcium intracellulaire. Ceci entraîne la translocation de Rap1-GTP à la membrane cellulaire où a lieu l'activation de RIAM qui recrute la taline pour activer l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Ye et al., 2013).

Comme décrit précédemment, plusieurs adaptateurs moléculaires, notamment les protéines SKAP-55 et ADAP, sont requis pour permettre l'activation de l'intégrine dans les lymphocytes T suite à l'engagement du TCR. RIAM interagit constitutivement avec SKAP-55 et ADAP pour permettre le ciblage du complexe RIAM-Rap1 activé à la membrane cellulaire, suite à une stimulation du TCR, afin de permettre l'activation de LFA-1 (Menasche et al., 2007). Par ailleurs, grâce à une approche synthétique, il a été montré que Rap1 peut former un complexe avec la taline et RIAM, qui mène au démasquage du site de liaison aux intégrines de la taline et donc son recrutement à la membrane (Lee et al., 2009). Récemment, il a été montré que Rap1 et RIAM sont essentielles pour une adhésion efficace des lymphocytes T à ICAM-1 et VCAM-1, et pour leur migration aux organes lymphoïdes secondaires. Néanmoins, des souris KO conditionnelles pour ces protéines ne montrent pas de problèmes de développement des cellules T (Su et al., 2015).

4.2.4 ILK, kinase ou pseudokinase ?

L'ILK est une protéine intracellulaire initialement identifiée comme une serine/thréonine kinase interagissant avec la sous-unité $\beta 1$ des intégrines (Hannigan et al., 1996). Elle possède un domaine N-terminal qui lui permet, grâce aux sites akyrine (ARD), de se lier à la protéine PINCH (*Particularly interesting new Cys-His-rich protein*) et aux chaînes β des intégrines. Son domaine central PH (*Pleckstrin homology*) lui permet d'être activée par le phosphatidylinositol-3,4-5-triphosphate et l'on trouve en région C-terminale un domaine kinase (KD) liant les parvines, elles-mêmes capables de lier l'actine (Hannigan et al., 2011). Le complexe PINCH-Parvin-ILK, appelé IPP, joue un rôle central dans la régulation des intégrines. L'ILK peut aussi se fixer à la paxilline, une protéine d'adhésion focale (Nikolopoulos and Turner, 2001). Bien que l'étude initiale montre que l'ILK est capable de phosphoryler la chaîne $\beta 1$ des intégrines et qu'il existe une homologie de séquence avec les protéines kinases, l'activité kinase de l'ILK est aujourd'hui controversée. Des études suggèrent à l'inverse que l'ILK est incapable de phosphoryler des protéines cibles.

Une équipe a montré que l'ILK purifiée était capable de phosphoryler ses substrats. Bien que les auteurs aient vérifié l'absence de kinases ou autres protéines contaminantes par spectrométrie de masse, il n'est pas totalement exclu que des traces non détectables aient pu persister (Deng et al., 2001). Une autre étude a montré une corrélation entre le niveau et l'activité de l'ILK et une augmentation de la phosphorylation d'Akt ainsi qu'une augmentation de l'activité de la PI3K (Boppart et al., 2011).

À l'inverse, le principal argument en faveur de l'ILK comme une pseudokinase est que le domaine KD, bien qu'il contienne des acides aminés conservés et essentiels pour l'activité kinase, ne possède pas d'autres résidus clés pour cette activité (Boudeau et al., 2006). La structure cristallographique du domaine KD interagissant avec la parvine a été interprétée comme un argument de l'absence d'activité kinase. Cependant, il peut s'agir uniquement d'une conformation inactive qui inhibe l'activité kinase de l'ILK en présence de la parvine. Des mutants de l'ILK incapables d'assurer la fonction kinase permettent de pallier la perte de l'ILK chez des souris déficientes indiquant que cette protéine peut aussi jouer un rôle de protéine adaptatrice, en se liant à la parvine et à PINCH (Lange et al., 2009).

Toutefois, l'ILK joue un rôle central dans la signalisation des intégrines et peut augmenter l'activité d'Akt, jouant ainsi sur la survie cellulaire par la voie *outside-in* des intégrines (McDonald et al., 2008).

4.3 *Clustering* des intégrines

Les changements conformationnels des intégrines permettent d'augmenter leur affinité de manière individuelle, tandis que le *clustering*, ou regroupement des intégrines, permet d'augmenter l'avidité et la force des interactions. Le *clustering* est défini par l'interaction des intégrines formant un assemblage latéral pouvant éventuellement mener à la formation d'adhésions focales. L'engagement des intégrines avec leurs ligands, univalents ou multivalents, augmente l'adhérence des intégrines de manière significative dans les deux cas (Roca-Cusachs et al., 2013). Le *clustering* est essentiel pour l'initiation de la voie *outside-in* associée à l'activation fonctionnelle des leucocytes. Les intégrines forment tout d'abord des microclusters (1 min), qui peuvent ensuite évoluer en complexes focaux puis en adhésions focales plus larges (demi-vie de 20 min). Ces adhésions focales vont assurer le lien entre la matrice extracellulaire, ou la CPA, et le cytosquelette d'actine de la cellule.

La mobilité latérale est le premier élément clé dans le *clustering* des intégrines. La protéine MacMARCKS (*macrophage-enriched myristoylated alanine rich C kinase substrate*) permet la libération des intégrines du cytosquelette afin d'augmenter la diffusion des intégrines dans la membrane plasmique. Il a été montré que les intégrines, notamment LFA-1, pouvaient être présentes sous forme de *nanoclusters* au niveau des rafts lipidiques, permettant la formation rapide de *microclusters* lors de l'engagement avec leurs ligands.

Plusieurs protéines cytoplasmiques, telles que la taline, les kindlines et l' α -actinine, sont impliquées dans le *clustering*, mais les bases moléculaires de ce mécanisme sont peu connues.

En effet, ces protéines participent aussi à la signalisation *inside-out*, et ces deux processus étant liés, la distinction entre les changements de conformation et le *clustering* est difficile.

La surexpression de la taline induit le regroupement de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ grâce au PI(4,5)P2 se fixant au domaine FERM de la taline (Saltel et al., 2009). Bien que le mécanisme avec lequel la taline initie le regroupement des intégrines ne soit pas clair, il est suggéré qu'elle lie directement les intégrines entre elles grâce à ses quatre sites de fixation de la chaîne β (Klapholz et al., 2015).

Des études suggèrent que l'homodimérisation des domaines transmembranaires conduit au regroupement (Li et al., 2003). D'autres équipes suggèrent au contraire que ce phénomène ne joue pas un rôle significatif dans le *clustering* (Wang et al., 2011). Des simulations ont montré que la probabilité de dimérisation des domaines transmembranaires des chaînes α est faible. À l'inverse, la composition et la géométrie des chaînes β en font des candidats intéressants pour leur implication dans le regroupement des intégrines (Mehrbood and Mofrad, 2013).

5. Signalisation *outside-in*

Une fois les intégrines activées par la voie *inside-out*, elles sont capables de fixer leurs ligands avec une forte affinité, conduisant à la formation de complexes d'adhésion focaux et ainsi à l'activation de voies de signalisation diverses. Le déclenchement de la voie *outside-in* conduit ainsi à diverses fonctions biologiques telles que la prolifération, la migration, la sécrétion de cytokines ou la lyse des cellules tumorales lors de contacts stables entre le lymphocyte T et sa cible spécifique (Figure 20). La réorganisation du cytosquelette d'actine joue un rôle majeur dans la mise en place des fonctions leucocytaires.

Dans les lymphocytes T, l'engagement de l'intégrine LFA-1 entraîne la phosphorylation de PLC γ , l'hydrolyse des phospholipides, l'activation de certaines isoformes de la PKC et de la voie PI3K/Akt, la stimulation de Vav et de Rac et de tyrosine kinases telles que Pyk2, l'homologue de FAK. Il a aussi été montré que la liaison d'ICAM-1 avec LFA-1 induit la polymérisation et la réorganisation des filaments d'actine (Porter et al., 2002).

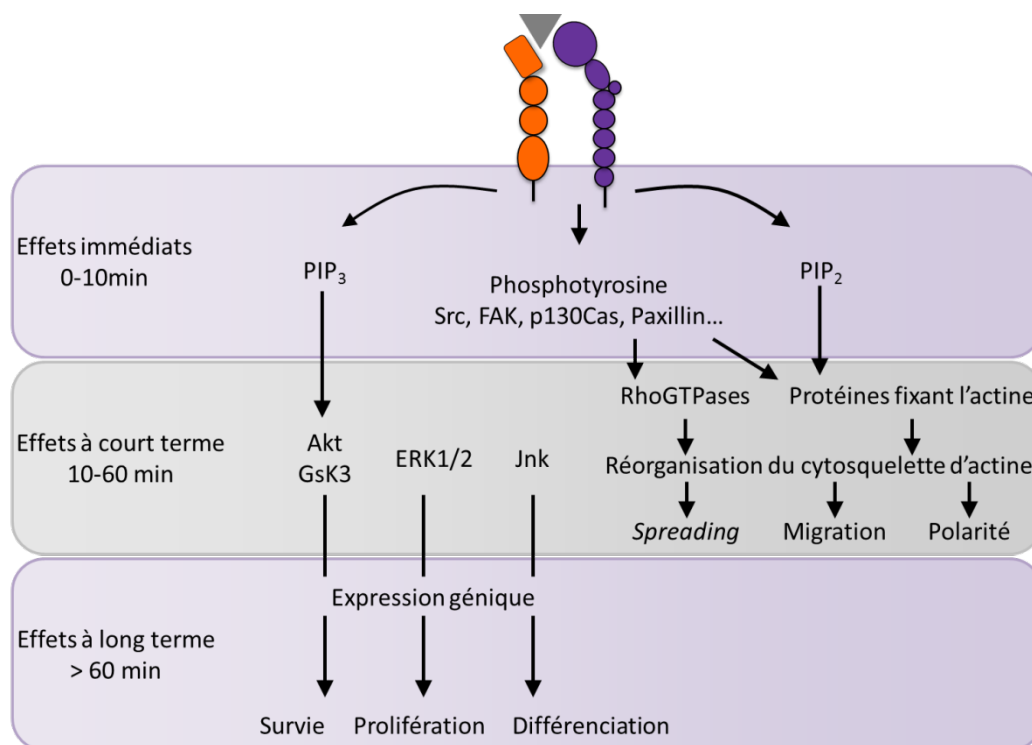


Figure 20 : Conséquences de l'activation de l'intégrine.

L'activation des intégrines conduit au déclenchement d'événements intracellulaires pouvant être divisés en trois étapes. Les effets immédiats de l'activation des intégrines sont l'augmentation des concentrations de PIP₃ et PIP₂, ainsi que la phosphorylation rapide de protéines aux points d'adhésion focaux. Entre 10 et 60 min, les voies de signalisation liées à Akt, ERK1/2 et Jnk ainsi que l'activation des RhoGTPases et autres protéines fixant l'actine sont déclenchées, conduisant à la réorganisation du cytosquelette d'actine. À plus long terme, les voies de survie, prolifération et différenciation sont déclenchées. Adaptée de (Legate et al., 2009).

5.1 Protéines impliquées dans la signalisation *outside-in*

5.1.1 La protéine FAK

Le recrutement de la kinase FAK intervient précocement dans la voie *outside-in*. Cette protéine ubiquitaire contient un domaine FERM, un domaine central kinase, une région riche en proline et un domaine FAT (*Focal Adhesion-Targeting*) interagissant avec la paxilline et la taline. À l'état basal, le domaine FERM de FAK interagit avec son propre domaine catalytique, bloquant ainsi l'accès aux substrats de FAK (Lietha et al., 2007). Il a été montré que l'interaction entre le domaine FERM de FAK et la queue de la chaîne β des intégrines lève l'auto-inhibition et induit l'autophosphorylation de FAK sur la tyrosine 397 et à l'activation de la protéine tyrosine kinase Src (Schaller et al., 1995). Src activée phosphoryle FAK induisant son activité kinase et l'interaction avec d'autres protéines. L'inhibition de FAK induit des défauts de mobilité cellulaire, tandis que sa surexpression conduit à la migration cellulaire (Mitra et al., 2005). Il a aussi été montré que FAK est capable de réguler l'activité de plusieurs GTPases telles que RhoA, cdc42 ou Rac-1 (Schaller, 2010). Bien que la taline ne soit pas nécessaire pour le recrutement de FAK, Lawson et ses collaborateurs ont

montré que l'interaction de FAK avec la taline est nécessaire pour la mobilité cellulaire (Lawson and Schlaepfer, 2012).

5.1.2 La protéine Pyk2

La protéine Pyk2 est une kinase présentant une forte homologie de séquence avec FAK. Cette protéine, régulée par le calcium, est capable de répondre à l'activation des intégrines. Elle est impliquée dans les étapes précoces de la signalisation des voies MAPK, PI3K-Akt et Rho, et joue ainsi un rôle important dans la régulation des processus cellulaires tels que la mobilité ou la régulation du cytosquelette. Les phosphorylations sur les tyrosines 402 et 881 créent des sites de fixation pour Src et Grb2 (Zhao et al., 2016). Tout comme FAK, Pyk2 contient un domaine FAT permettant la fixation de la paxilline. Cependant, Pyk2 présente une distribution périnucléaire et n'est pas fortement localisé aux points d'adhésions focaux comme FAK (Sulzmaier et al., 2014).

Récemment, deux nouveaux inhibiteurs pharmacologiques ont été développés. L'utilisation de ces molécules sur des plaquettes induit un défaut d'adhésion et inhibe la phosphorylation d'Akt dans les cellules adhérentes, indiquant que Pyk2 régule la PI3K et le *spreading* induit par les intégrines des plaquettes humaines (Guidetti et al., 2016). D'autres études démontrent le rôle de Pyk2 dans la migration des leucocytes (Wang et al., 2010; Zhu et al., 2008b). Dans les CTL humains, il a été montré que Pyk2 contribue à la migration cellulaire en régulant le détachement de l'uropode (Cheung and Ostergaard, 2016).

5.1.3 Protéines tyrosine kinases de la famille Src et Syk

Les protéines tyrosines kinases (PTK) de la famille Src (SFK) et Syk sont rapidement activées suite à l'interaction de l'intégrine avec son ligand (Baruzzi et al., 2008). La famille des SFK contient neuf protéines, dont Src, Fyn et Yes, exprimées de manière ubiquitaire. En activant des kinases et des protéines adaptatrices en aval de la signalisation *outside-in*, les SFK contribuent au renforcement de l'adhésion cellulaire (Giannone and Sheetz, 2006). Après autophosphorylation sur la tyrosine 397, FAK entre en compétition avec le domaine SH2 de Src et lève son inhibition (Playford and Schaller, 2004). La queue des chaînes β des intégrines peuvent aussi interagir et activer directement des membres de la famille SFK (Wu et al., 2015).

5.1.4 La paxilline

La paxilline est une autre protéine de signalisation essentielle recrutée aux sites d'adhésion. Elle sert de plateforme pour le recrutement de nombreuses protéines régulatrices permettant le contrôle des changements dynamiques dans l'adhésion cellulaire. Cette protéine de 68 KDa existe sous trois isoformes, α , β et γ , mais la paxilline α reste l'isoforme la plus fréquente (Mazaki et al., 1997). Elle possède de nombreux domaines d'interaction protéine / protéine. En effet, on trouve en position N-terminale cinq motifs LD riches en leucines et aspartates et des résidus phosphorylables qui permettent la fixation d'autres protéines possédant un domaine SH2, ainsi que des domaines riches en proline liant les domaines de type SH3. La partie C-terminale présente quatre domaines LIM en doigts de zinc organisés en tandem. Les domaines LIM2 et LIM3 possèdent des sérines et des thréonines dont la phosphorylation régule la localisation de la paxilline au niveau des adhérences focales et permettent le recrutement de nombreuses protéines telles que la tubuline ou la tyrosine phosphatase PTP-PEST (Cote et al., 1999). Des kinases telles que FAK et Src, des phosphatases, des protéines liées à l'actine telles que vinculine et parvine, ou des RhoGTPases telles que PIX peuvent aussi se lier à la paxilline (Figure 21). Parmi les partenaires recrutés, nombre d'entre eux sont capables de réguler les GTPases et notamment RhoA, Rac1 ou encore cdc42 (Brown and Turner, 2004).

La paxilline peut se lier aux chaînes β 1, β 4 et β 9 des intégrines (Liu and Ginsberg, 2000; Tanaka et al., 1996). Sa liaison à la chaîne α 4 (Goldfinger et al., 2003; Han et al., 2001; Rose et al., 2003) est dépendante de la phosphorylation de cette dernière par la protéine kinase dépendante d'AMPc (PKA), et les résidus D983 et Y991 de l'intégrine sont essentiels pour cette interaction (Liu and Ginsberg, 2000). De plus, la mutation du résidu 988 de la chaîne α 4 en acide aspartique, mimant la phosphorylation, entraîne une perte de fixation de la paxilline et inhibe la migration et le *spreading* lymphocytaire. La mutation en alanine de ce même résidu conduit aussi à une perte de la migration, et indique la nécessité de la phosphorylation et déphosphorylation du domaine cytoplasmique de la chaîne α 4 pour réguler la fixation réversible de la paxilline et ainsi la migration cellulaire (Han et al., 2003).

Les phosphorylations sur les tyrosines 31 et 118 de la paxilline, induites par les kinases FAK et Src (Bellis et al., 1995), suite à l'engagement de l'intégrine, interviennent lors de l'adhérence et de la migration cellulaires (Iwasaki et al., 2002). Elles permettent de créer des sites SH2 pour l'ancrage de protéines telles que Crk ou p120RasGAP, impliquées dans l'activation de Rac ou l'inhibition de Rho (Zaidel-Bar et al., 2007).

La paxilline peut aussi être phosphorylée sur les sites S85 et S178, nécessaires pour l'activation de NFAT, ou sur les sites Y40, Y88 par Src (Lee et al., 2012; Schaller and Schaefer, 2001). Dans les cellules tumorales, la paxilline joue aussi un rôle dans l'invasion et la formation de métastases, et il a été récemment montré que l'interaction directe de la paxilline avec la LC3B, protéine structurale de la membrane des autophagosomes, stimule le désassemblage des adhésions focales. Cette interaction est favorisée par Src et dépendante de la phosphorylation de la tyrosine 40, mais indépendante de la phosphorylation des tyrosines 31 et 118 (Sharifi et al., 2016).

En utilisant des mutants mimant la phosphorylation constitutive sur des tyrosines, il a été montré que la phosphorylation des tyrosines régule l'assemblage et le renouvellement des points d'adhésion focaux. En effet, la paxilline est phosphorylée différenciellement sur les tyrosines Y31 et Y118 selon les formes d'adhésion. L'expression de mutants négatif ou phospho-mimétique perturbe la balance entre les différentes formes d'adhésions, la phosphorylation constitutive augmentant la formation de complexes focaux. Il a aussi été montré que FAK interagit préférentiellement avec le mutant phospho-mimétique et que son recrutement est impliqué dans un renouvellement plus important des complexes focaux (Zaidel-Bar et al., 2007).

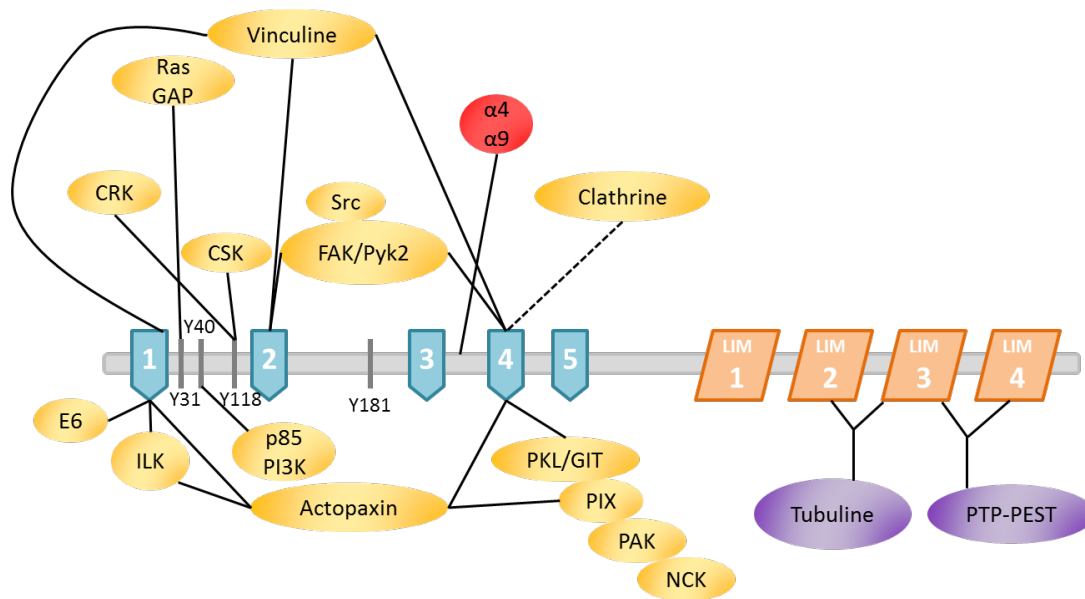


Figure 21 : Les partenaires protéiques de la paxilline.

La paxilline contient cinq motifs LD riches en leucines (bleu) et quatre domaines LIM en doigt de zinc (orange) impliqués dans les interactions protéines-protéines. Adaptée de (Brown and Turner, 2004).

6. L'intégrine CD103

6.1 Structure de l'intégrine CD103 et de son ligand E-cadhérine

L'intégrine $\alpha_E(\text{CD103})\beta_7$, permettant la rétention des lymphocytes dans les tissus épithéliaux, est un hétérodimère formé de la chaîne α_E (CD103, HML-1, ITGAE) et de la chaîne β_7 (Cerf-Bensussan et al., 1987). La chaîne α_E est la seule à pouvoir s'associer avec la chaîne β_7 , tandis que cette dernière peut s'associer aussi avec α_4 . La particularité de la sous-unité α_E est son clivage post-traductionnel qui génère une chaîne lourde et une chaîne légère, liées par un pont disulfure. La mutation R159S/R160S empêche ce clivage, sans pour autant altérer la fixation du ligand (Higgins et al., 2000).

CD103 est une intégrine leucocytaire qui a pour ligand la E-cadhérine, un marqueur des cellules épithéliales. Les cadhérines font partie d'une famille de molécule d'adhérence cellulaire dépendante du Ca^{2+} (Geiger and Ayalon, 1992). Ces glycoprotéines transmembranaires sont associées au cytosquelette par les caténines et joue un rôle important dans l'établissement des jonctions intercellulaires. L'interaction entre l'intégrine et son ligand se fait entre les domaines extracellulaires 1 et 2 de la E-cadhérine et le domaine MIDAS intégré au domaine A de CD103 (Figure 22). Des mutations dans les domaines extracellulaires de la E-cadhérine sur le résidu glutamine 31 entraînent des perturbations de l'interaction avec l'intégrine. De plus, la mutation D190A dans le domaine conservé MIDAS de la chaîne α_E et la mutation de la phénylalanine 298 proche du domaine MIDAS, abolissent

l'interaction avec la E-cadhérine, confirmant la nécessité des ions magnésium ou manganèse dans l'interaction avec le ligand. À l'inverse, la mutation E325A augmente la fixation de la E-cadhérine (Higgins et al., 2000). Un modèle du déroulement de la fixation du ligand sur l'intégrine a été proposé. Dans ce modèle, la glutamine 31 dans la boucle BC de la E-cadhérine est maintenue à une distance appropriée pour l'interaction avec l'ion magnésium chélaté par le domaine MIDAS. La E-cadhérine pivote ensuite afin d'optimiser l'interaction et de diminuer l'encombrement stérique. Ainsi, la phénylalanine 298 du domaine A de la chaîne α_E est située dans une poche hydrophobe formée entre les boucles BC et GF du domaine 1 de la E-cadhérine, fournissant la base de l'interaction.

Par ailleurs, bien que des travaux suggèrent l'existence d'un ligand alternatif présent dans les muqueuses, celui-ci n'a cependant pas encore été identifié à ce jour (Jenkinson et al., 2011; Strauch et al., 2001).

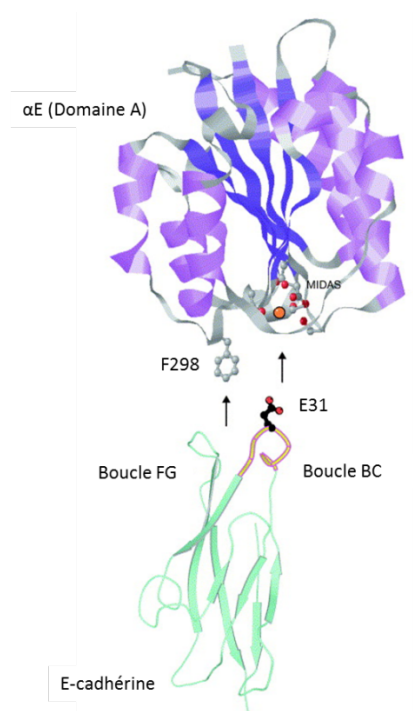


Figure 22 : Modélisation de l'interaction entre le domaine αI de l'intégrine $\alpha_E\beta_7$ et le domaine I de la E-cadhérine.

Le résidu E31 dans la boucle BC de la E-cadhérine interagit avec un ion Mg^{2+} présent dans le domaine MIDAS de CD103 en conformation ouverte (boucle orange). Le résidu F298 de CD103 participe lui, à la liaison de l'intégrine avec son ligand en se plaçant dans la poche hydrophobe formée par les boucles FC et BC de la E-cadhérine (Agace et al., 2000).

6.2 Spectre d'expression de l'intégrine $\alpha_E(CD103)\beta_7$

6.2.1 *Lymphocytes T effecteurs*

Initialement décrite comme marqueur des lymphocytes intestinaux intra-épithéliaux (IEL), CD103 est impliqué dans la rétention des lymphocytes T dans les tissus épithéliaux.

Cette intégrine est exprimée à la surface de diverses sous-populations de leucocytes et joue ainsi un rôle important dans les réponses immunitaires. Initialement, elle a été découverte à l'aide d'anticorps monoclonaux par criblage de protéines caractéristiques des IEL (Cerf-Bensussan et al., 1987; Kilshaw and Baker, 1988). Les lymphocytes T CD103⁺ sont généralement localisés là où le TGF- β est présent, étant donné que cette cytokine est impliquée dans la régulation de l'expression de l'intégrine. Seulement 2% des lymphocytes circulants expriment CD103, tandis que plus de 90% des IEL sont CD103⁺ ainsi que la moitié des cellules T de la *lamina propria* (Gorfu et al., 2009). On retrouve aussi des lymphocytes CD103⁺ dans les tissus épithéliaux, notamment le poumon et l'utérus. CD103 a aussi été identifiée dans les TIL de différents types de cancers, notamment le cancer de la vessie (Cresswell et al., 2002), du colon (Quinn et al., 2003), du pancréas (French et al., 2002), et du poumon (Le Floch et al., 2007). La présence de CD103 à la surface des TIL est de bon pronostic notamment dans les cancers du sein (Wang et al., 2016), de l'ovaire (Webb et al., 2015), du poumon (Djenidi et al., 2015) suggérant un rôle majeur dans l'activation leucocytaire et dans la réponse immune antitumorale.

Notre équipe a montré que l'intégrine CD103 est exprimée à la surface de lymphocytes T infiltrant une tumeur bronchique, tandis que les lymphocytes du sang périphérique expriment très faiblement CD103 (Le Floch et al., 2007). Cette observation a été confirmée par des expériences *in vivo* démontrant que l'expression de CD103 peut être induite *in situ*, grâce notamment à la production de TGF- β au site tumoral (Franciszkievicz et al., 2009).

6.2.2 Les cellules dendritiques CD103⁺

L'expression de CD103 à la surface des DC définit une population migratoire distincte impliquée dans la régulation, la tolérance, la présentation antigénique croisée et l'induction de la production des lymphocytes Treg, de manière dépendante de l'acide rétinoïque (Bedoui et al., 2009; Coombes et al., 2007; Jaensson et al., 2008).

Les DC CD103⁺ peuvent induire, sur les lymphocytes T qu'elles activent, l'expression de CCR9 et $\alpha_4\beta_7$, tous deux récepteurs nécessaires à la rétention des lymphocytes T dans l'intestin (*gut-homing*) (Jaensson et al., 2008). Les DC CD103⁺ sont aussi capables de générer une meilleure réponse immunitaire T CD8⁺ (Heath and Carbone, 2009). De plus, il a été montré que les DC CD103⁺ étaient capables de produire de l'IL-12 en grande quantité, notamment dans les tumeurs où cette population joue un rôle primordial dans l'immunosurveillance (Broz et al., 2014). Par ailleurs, les DC CD103⁺ favorisent le

développement de lymphocytes Treg par un mécanisme dépendant du TGF- β et de l'acide rétinoïque (Siddiqui and Powrie, 2008).

6.2.3 Les cellules Treg CD103⁺

L'intégrine CD103 peut aussi définir une sous-population de Treg. Ces cellules jouent un rôle central dans la maintenance de l'homéostasie et la prévention de l'autoimmunité (Sakaguchi, 2005). Environ 20% des cellules Treg expriment CD103 dans les tissus lymphoïdes, et présentent un phénotype mémoire (CD45RO^{low} CD44^{high}) (Lehmann et al., 2002). L'expression de CD103 à la surface des Treg est corrélée à une meilleure activité immunosuppressive de ces cellules, qui possèdent des fonctions suppressives plus fortes que les Treg dites « conventionnelles » (Anz et al., 2011). En effet, la production d'IL-10 et de TGF- β est plus élevée dans les Treg CD103⁺ que CD103⁻ (Banz et al., 2003).

La fonction des Treg CD103⁺ semble dépendante de leur localisation. Ces cellules peuvent s'accumuler dans les sites d'inflammation de la peau (Suffia et al., 2005), et des expériences indiquent que ce sont les Treg CD103⁺ qui contrôlent les réactions inflammatoires cutanées (Braun et al., 2015). Cependant, dans l'intestin, les cellules CD25⁻CD103⁻ sont capables d'inhiber l'inflammation, indiquant que la fonction des Treg est dépendante du site de l'inflammation (Annacker et al., 2005).

In vivo, l'absence de production du TGF- β induit une diminution de la fréquence des Treg CD103⁺ à la tumeur, démontrant que l'expression de l'intégrine sur les Treg est induite par le TGF- β intratumoral. Par ailleurs, le blocage de CD103 par un anticorps monoclonal n'a pas d'influence sur le nombre de Treg intratumoraux, indiquant que CD103 n'est pas impliqué dans le *homing* ou la rétention des cellules Foxp3⁺ dans le tissu tumoral (Hadley et al., 2001)

6.3 Régulation de l'expression de CD103

6.3.1 Régulation transcriptionnelle de CD103

Dès les années 1990, plusieurs équipes ont démontré le rôle du TGF- β dans la régulation de la transcription de CD103 (Kilshaw, 1999; Parker et al., 1992). Les lymphocytes T présents dans un environnement riche en TGF- β expriment fortement CD103, notamment dans le poumon où plus de 60% des lymphocytes T CD8⁺ expriment l'intégrine. À l'inverse, les cellules circulantes du sang périphérique n'expriment CD103 que très rarement. Cependant, la stimulation des PBL CD103⁻ par le TGF- β en combinaison avec l'engagement du TCR induit l'expression de l'intégrine à la surface (Le Floc'h et al., 2007). La liaison de l'intégrine β 1 peut agir en synergie avec le TGF- β afin de permettre l'induction de la chaîne

α_E . Par ailleurs, l'expression de CD103 peut aussi être augmentée à la surface des lymphocytes CD8⁺ humains naïfs par une stimulation avec un anticorps anti-CD3 et la présence d'IL-4 (Teraki and Shiohara, 2002). L'IL-12 permet aussi la régulation de CD103, tandis que l'IL-1 inhibe son expression. L'IL-2 semble nécessaire pour une induction optimale de CD103 à la surface des lymphocytes T CD4⁺ (Sharma et al., 2009). Des souris transgéniques possédant un défaut d'activation de Smad7 dans les lymphocytes T matures, présentent un blocage de la signalisation induite par le TGF- β 1 et ainsi un défaut d'expression de CD103 sur environ 50% des IEL (Suzuki et al., 2002).

La transcription de CD103 est généralement attribuée au TGF- β 1, bien que toutes les isoformes possèdent cette caractéristique. Cependant, il n'a pas encore été décrit quelle isoforme jouait ce rôle *in vivo*. Robinson et ses collaborateurs ont démontré que le TGF- β pouvait induire l'expression de la chaîne α_E en seulement 30 min (Robinson et al., 2001). La rapidité de l'induction suggère que la synthèse d'intermédiaires ou de nouveaux facteurs de transcription n'est probablement pas nécessaire. Mon équipe d'accueil a pu montrer que les facteurs de transcription Smad2/3 et NFAT-1 sont deux régulateurs essentiels dans ce processus et sont capables de se fixer à des séquences régulatrices du gène ITGAE qui code pour CD103 (Mokrani et al., 2014).

6.3.2 *Le TGF- β et les voies smad et non-smad*

i) La voie d'activation des Smads

Le TGF- β appartient à une famille de facteurs de croissance et de différenciation solubles, comprenant plus de trente membres dont le TGF- β , les Activines et les BMP (*Bone Morphogenic Proteins*). Il existe trois isoformes du TGF- β humain (TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3), codées par trois gènes distincts présentant 80% d'homologie entre les séquences protéiques. Le rôle du TGF- β n'est plus à démontrer dans le développement, l'homéostasie, la régulation de la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire. En effet, la perturbation de la signalisation du TGF- β cause différentes pathologies dont le cancer, des maladies autoimmunes ou inflammatoires. Les souris *knock-out* pour les trois isoformes du TGF- β présentent des déficiences dans la régulation de l'inflammation et la réparation tissulaire. Le TGF- β est synthétisé par de nombreux types cellulaires dont les plaquettes, les macrophages, les fibroblastes ou les cellules tumorales, sous forme d'un précurseur latent (LTGF- β , *Latent TGF- β*). Ce précurseur est constitué d'un peptide signal de sécrétion en N-terminal, d'une région LAP (*Latency-Associated Peptide*) et d'une région C-terminale constituant le TGF- β bioactif après maturation. L'action de protéases est nécessaire pour la

libération de la forme mature et active du TGF- β qui pourra alors se fixer à ses récepteurs et induire une réponse cellulaire (Luo, 2017). Les récepteurs possèdent une activité du type sérine/thréonine kinase qui permet la transduction du signal lors de la fixation du TGF- β . Le récepteur du TGF- β est un hétérodimère formé du récepteur de type I (T β RI) et du récepteur de type II (T β RII) qui présentent des similarités d'un point de vue structural. La fixation du TGF- β actif sur le T β RII entraîne un changement de conformation du récepteur qui facilite la dimérisation avec le T β RI. Le T β RII, qui possède une activité kinase intrinsèque, va pouvoir phosphoryler le T β RI. Par la suite, le T β RI phosphoryle deux résidus sérines dans le motif SSXS de la partie C-terminale des récepteurs Smad (R-Smad), Smad2 et Smad3. Cet évènement conduit à la formation d'un complexe entre les deux R-Smad et un co-Smad (*common-Smad*), Smad4, et à sa translocation au noyau afin d'agir comme facteur de transcription (Shi and Massague, 2003). L'interaction de Smad4 avec Smad2/3 peut être bloquée par un Smad inhibiteur, Smad7, qui agit comme régulateur négatif de la signalisation du TGF- β (Sedda et al., 2015).

ii) Les voies non-smad

Le TGF- β peut aussi activer des voies de signalisation « non-Smad », incluant les voies MAPK, PI3K et Wnt (Guo and Wang, 2009) (**Figure 23**). La stimulation des cellules par le TGF- β peut activer la voie des MAPK par le recrutement d'une protéine adaptatrice Shc au niveau de la tyrosine phosphorylée du T β RI. L'adaptateur Grb2 en complexe avec sos1, un facteur d'échange nucléotidique de Ras, peut alors se fixer à la tyrosine phosphorylée de la protéine Shc, et Ras activé peut induire la voie des MAPK (Lee et al., 2007).

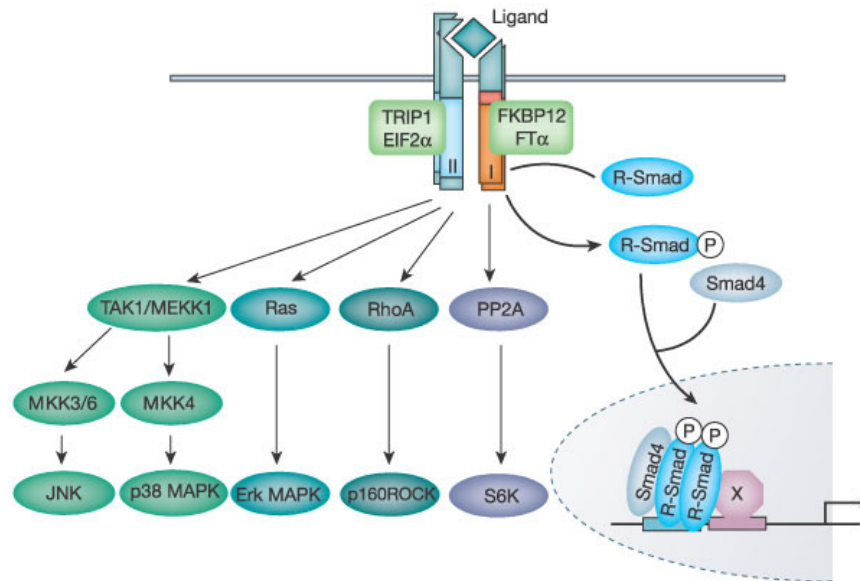


Figure 23 : Signalisation du récepteur au TGF- β par les voies non Smad

D'autres protéines que les smad sont capables de s'associer au récepteur du TGF- β et de déclencher les voies non-Smad telles que MAPK, PP2Ap/p70^{S6k}, RhoA et TAK1/MEKK (Derynck and Zhang, 2003).

Certaines intégrines sont aussi capables d'activer le TGF- β . L'absence d'expression de certaines intégrines, telles que $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ ou $\alpha_v\beta_8$ corrèle avec une baisse d'activation du TGF- β 1 (Worthington et al., 2015).

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$, dont la transcription est activée par le TGF- β , forme un complexe avec le T β RII, facilitant la formation d'un complexe actif et augmentant la signalisation du TGF- β et ainsi la prolifération cellulaire (Scaffidi et al., 2004). De plus, l'intégrine $\alpha_v\beta_8$ apparaît essentielle pour l'activation du TGF- β par les DC CD11c⁺, et l'absence de cette intégrine sur les DC conduit à un nombre réduit de Treg Foxp3⁺ dans l'intestin (Travis et al., 2007).

Les intégrines α_v sont capables de reconnaître le motif RGD, notamment présent dans la région LAP du TGF- β 1. Il a été proposé que la métalloprotéinase MMP14 clive LAP pour libérer la forme active du TGF- β (Worthington et al., 2011). Les cellules Treg déficientes pour l'intégrine $\alpha_v\beta_8$ sont capables de maintenir l'homéostasie des cellules T et de prévenir le développement de l'inflammation *in vivo*. Cependant, la présence de cette intégrine est nécessaire pour que les Treg inhibent l'activité des cellules T effectrices lors de l'inflammation *via* l'activation du TGF- β , qui déclenche la signalisation TGF- β dans les Treg Foxp3⁺ (Worthington et al., 2015).

6.4 Fonctions de l'intégrine $\alpha_E\beta_7$

6.4.1 Rôle dans la rétention des cellules T

L'intégrine CD103 est aussi un marqueur des lymphocytes T résidents mémoires (T_{RM}). Divers arguments expérimentaux sont en faveur de l'implication de CD103 dans la rétention

intraépithéliale des T_{RM} en modulant leur capacité à quitter les tissus non lymphoïdes. Les T_{RM} correspondent à une population de cellules T capables de réagir en premier lieu lors d'une ré-infection locale. Tout comme les DC $CD103^+$, ces cellules jouent un rôle important dans l'immunosurveillance antitumorale (Webb et al., 2014).

Récemment, il a été montré que le TGF- β contrôle la différenciation des T_{RM} intestinaux par divers mécanismes. Lors de la phase de la formation des T_{RM} , la signalisation du TGF- β inhibe la migration des T $CD8^+$ effecteurs de la rate vers l'intestin en diminuant l'expression de l'intégrine $\alpha_4\beta_7$. De plus, au cours de la phase de maintenance, le TGF- β est requis pour la rétention des T_{RM} intestinaux notamment grâce à l'induction des intégrines $\alpha_E\beta_7$ et α_1 et CD69 (Zhang and Bevan, 2013).

Par ailleurs, les facteurs de transcription Eomes et T-bet semblent contrôler la formation des T_{RM} $CD8^+$ $CD103^+$ grâce au TGF- β et à l'IL-15, deux cytokines centrales dans le développement et la survie de cette population T mémoire (Mackay et al., 2015). Une autre équipe a aussi montré que les lymphocytes T $CD4^+$ sont importants pour la formation de T_{RM} $CD8^+$ dans le poumon après une infection au virus de la grippe, en limitant l'expression de T-bet et en permettant le développement des cellules T_{RM} $CD103^+$ (Laidlaw et al., 2014).

6.4.2 Implication de CD103 dans la SI et la cytotoxicité

L'intégrine CD103 n'est définitivement pas une simple molécule d'adhésion. Au niveau de la SI entre un CTL et une cellule cible spécifique, cette intégrine joue un rôle clé dans la rétention de cellules T $CD103^+$ via le recrutement du récepteur de chimiokines CCR5 dans la SI, conduisant à une inhibition de la sensibilité à un gradient de la chimiokine CCL5 (Franciszkiewicz et al., 2009).

En plus de son rôle de rétention, l'intégrine contribue directement à la destruction de cellules tumorales épithéliales par les lymphocytes T $CD8^+$. Dès 1992, il a été montré que les IEL sont capables d'exercer une activité cytotoxique vis-à-vis de diverses lignées tumorales épithéliales (Taunk et al., 1992). Plus tard, il a été montré que les lymphocytes T $CD103^+$ étaient capables de lyser des cellules tumorales pancréatiques humaines transfectées avec la E-cadhérine. Une diminution de la lyse de ces cellules tumorales était observée lorsque la E-cadhérine ou CD103 étaient absentes (French et al., 2002). De même, ce phénomène a été observé avec des cellules T $CD103^+$ et des cellules pulmonaires épithéliales E-cadhérine⁺ (Smyth et al., 2007). Mon équipe a aussi démontré l'implication de CD103 dans la maturation de la SI cytotoxique en déclenchant la relocalisation et l'exocytose des granules lytiques et ainsi la lyse des cellules tumorales (Le Floc'h et al., 2007). En effet, CD103 peut servir de

signal de costimulation, et l'engagement de l'intégrine avec son ligand la E-cadhérine est suffisant pour induire la polarisation des GC, tandis que la dégranulation nécessite aussi l'engagement du TCR (Le Floc'h et al., 2011).

CD103 est aussi impliquée dans les phénomènes de cytotoxicité des lymphocytes T CD8⁺ dans la réaction du greffon contre l'hôte (GvHD). En effet, les CTL CD103⁺ sont impliqués dans la destruction de l'épithélium intestinal lors de la GvHD (El-Asady et al., 2005), tandis que l'absence de CD103 protège de cette réaction (Liu et al., 2011). Le rôle de CD103 a aussi été démontré dans le rejet de transplantation (Hadley et al., 2001) et dans les maladies autoimmunes (Oshitani et al., 2003).

6.5 Signalisation de CD103

À l'inverse de l'intégrine LFA-1, peu d'études ont été réalisées concernant la signalisation de l'intégrine $\alpha_E\beta_7$. L'avidité de CD103 vis à vis de la E-cadhérine est régulée de manière similaire aux autres intégrines. En effet, des signaux *inside-out* sont induits suite à l'engagement du TCR ou suite au traitement avec la PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*), permettant d'augmenter l'avidité de l'intégrine à la surface des IEL (Higgins et al., 1998). De plus, les chimiokines permettent aussi l'activation de la voie *inside-out*. La fixation de la chimiokine CCL25, produite notamment par les cellules de l'épithélium intestinal, sur son récepteur CCR9 à la surface des IEL, induit l'adhérence des lymphocytes T CD8⁺ *via* l'interaction de CD103 avec la E-cadhérine (Ericsson et al., 2004). Dans un autre contexte, la chimiokine CCL7 exprimée par les cellules rénales, est aussi capable d'induire l'activation de CD103 lors des rejets de greffe (Al-Hamidi et al., 2008).

Peu de protéines sont considérées comme étant capables d'interagir de manière directe avec CD103. WD-WAIT-1 (*WD protein associated with integrin tails*) interagit avec les domaines cytoplasmiques de l'intégrine (Rietzler et al., 1998). La sous-unité β_7 peut interagir avec la filamine, protéine associée aux filaments d'actine (Pfaff et al., 1998), ainsi qu'avec des protéines adaptatrices possédant un domaine PTB telles que Dab1, Dok1, la taline et la tensine (Calderwood et al., 2003).

Dans un modèle d'infection au virus de la grippe, où les lymphocytes T CD8⁺CD103⁺ jouent un rôle de protection, il a été montré que la protéine ADAP forme un complexe avec TRAF6 et TAK1, active Smad3 pour augmenter la production de TGF- β 1 et ainsi l'expression de l'intégrine CD103 (Li et al., 2015).

Récemment, nous avons montré que le TGF- β permet d'augmenter les fonctions effectrices des lymphocytes T CD103⁺, grâce à l'engagement du T β RI qui recrute l'ILK et

induit sa phosphorylation. L'ILK interagit ensuite avec le domaine cytoplasmique de CD103, ce qui induit l'activation d'AKT et initie la signalisation *inside-out* (Boutet et al., 2016).

L'engagement de l'intégrine CD103 avec son ligand E-cadhérine déclenche des signaux dits *outside-in* impliqués dans diverses fonctions dont la prolifération, le *spreading* et la mobilité des lymphocytes. Ainsi, Schlickum et ses collaborateurs ont mis en évidence la capacité de l'intégrine CD103 à induire des déformations cellulaires et à la formation d'expansions membranaires suite à l'engagement avec la E-cadhérine (Schlickum et al., 2008). Ces résultats démontrent que l'intégrine CD103 ne joue pas seulement un rôle dans la rétention dans les tissus épithéliaux, mais aussi dans la morphologie, indiquant un réarrangement du cytosquelette permettant une meilleure interaction avec la cellule cible.

Notre équipe a montré que la phosphorylation des protéines ERK1/2 et de PLC γ 1 était observée sur les CTL suite à la stimulation avec la E-cadhérine. De plus, ces signaux conduisent à la polarisation des GC à la zone de contact avec le ligand, mais ne seront sécrétés qu'après la reconnaissance spécifique de l'antigène par le TCR (Le Floc'h et al., 2011). Ainsi, l'intégrine CD103 est capable d'initier une signalisation *outside-in*, régulant les fonctions leucocytaires, mais les mécanismes moléculaires sous-jacents sont jusqu'à présent peu décrits.

OBJECTIFS DES TRAVAUX

OBJECTIFS DES TRAVAUX

Il est aujourd'hui admis que l'infiltration des tumeurs par les lymphocytes T CD8⁺ est un marqueur de bon pronostic dans de nombreux cancers (Galon et al., 2006). La migration et le recrutement lymphocytaire sont régulés par les chimiokines et les molécules d'adhésion. Les intégrines sont les principales molécules d'adhésion responsables des interactions cellule-cellule ou cellule-MEC (Pribila et al., 2004). Ces molécules sont cruciales pour le développement, les interactions cellulaires, la migration, l'extravasation, l'activation et la rétention des lymphocytes dans le tissu, et jouent donc un rôle essentiel dans la réponse antitumorale.

À l'état basal, les intégrines sont présentes à la surface cellulaire sous forme inactive. Des signaux provenant de l'engagement de récepteurs aux chimiokines ou du TCR sont requis pour initier la signalisation *inside-out* et ainsi permettre aux intégrines d'adopter une conformation active capable de fixer leurs ligands. L'engagement de l'intégrine avec son ligand déclenche alors une signalisation *outside-in* et contribue à la costimulation du signal TCR, au *spreading* des lymphocytes et à la cytotoxicité. La compréhension de la signalisation des intégrines est une étape importante dans l'optimisation des réponses antitumorales. Le laboratoire s'intéresse à une intégrine particulière, l'intégrine CD103, impliquée dans la rétention des cellules T résidentes dans les tissus (T_{RM}) (Mackay et al., 2012; Schon et al., 1999), et dans les tumeurs épithéliales (Djenidi et al., 2015).

Les travaux antérieurs de l'équipe ont permis de montrer que l'intégrine CD103 est impliquée dans la reconnaissance et la lyse des cellules tumorales épithéliales (Le Floc'h et al., 2007). L'engagement de CD103 avec son ligand la E-cadhérine, un marqueur des cellules épithéliales, entraîne la phosphorylation des protéines ERK1/2 et PLCγ1, ainsi que la polarisation des GC. L'engagement conjoint de CD103 et du TCR permet l'exocytose des GC, qui est bloquée par l'inhibition de PLCγ1 (Le Floc'h et al., 2011). Ces travaux montrent que l'intégrine CD103 est bien plus qu'une molécule d'adhésion, et qu'elle joue aussi un rôle de costimulation du signal TCR. Cependant, peu d'études ont été réalisées sur les voies de signalisation de cette intégrine.

Dans ce contexte, les objectifs de mes travaux de thèse sont de :

- 1) Identifier les protéines clés impliquées dans la signalisation de l'intégrine CD103 afin d'optimiser la réponse cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺.

2) Déterminer le rôle du domaine cytoplasmique de CD103 et définir les acides aminés de ce domaine nécessaires à sa signalisation.

Pour cela, j'ai utilisé différents modèles d'études. À partir de prélèvements tumoraux frais de patients atteints de CBNPC, les TIL $CD8^+CD103^+$ ont été extraits. En parallèle, j'ai utilisé un modèle établi précédemment au laboratoire à partir d'une pièce chirurgicale d'un patient atteint de CBNPC (Figure 24). La lignée tumorale IGR-Heu a été générée, et des clones lymphocytaires ont été isolés à partir des TIL et du sang périphérique du patient. Ces clones sont spécifiques de l'antigène tumoral α -actinine-4 muté et plusieurs d'entre eux expriment l'intégrine CD103. De plus, la lignée lymphocytaire $CD4^+$ Jurkat-TAg a été utilisée afin de transférer les constructions CD103-GFP.

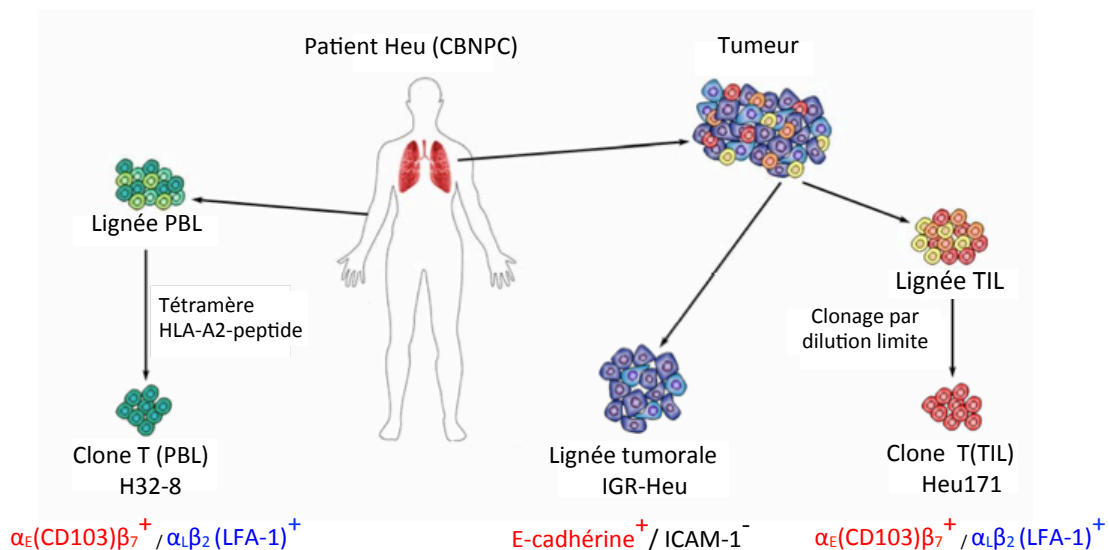


Figure 24 : Modèle expérimental

À partir d'une tumeur pulmonaire, la lignée tumorale (IGR-Heu) et le clone Heu171 $CD8^+CD103^+$ ont été établis. Le clone H32-8 a été isolé à partir des lymphocytes du sang périphérique (PBL) du même patient et possède la même spécificité antigénique que Heu171. La lignée tumorale IGR-Heu exprime la E-cadhérine, ligand de CD103, et non ICAM-1, le ligand de LFA-1.

RÉSULTATS

« Binding of paxillin to CD103 cytoplasmic domain promotes CD8⁺ tumor tissue-resident memory T (T_{RM}) cell adhesion and effector functions »

Ludiane Gauthier, M'barka Mokrani, Stéphanie Corgnac, Pierre Validire, Georges Bismuth and Fathia Mami-Chouaib

Soumis pour publication (mai 2017)

Binding of paxillin to the CD103 cytoplasmic domain promotes CD8⁺ tumor tissue resident memory T (T_{RM})-cell adhesion and effector functions

Ludiane Gauthier¹, M'barka Mokrani¹, Stéphanie Cognac¹, Pierre Validire², Georges Bismuth³ and Fathia Mami-Chouaib^{1#}

¹INSERM UMR 1186, Integrative Tumor Immunology and Genetic Oncology, Gustave Roussy, EPHE, Fac. de médecine - Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 94805, Villejuif, France

²Institut Mutualiste Montsouris, Service d'Anatomie pathologique, 75014 Paris, France.

³INSERM U1016, CNRS UMR8104, Université Paris Descartes, Institut Cochin, 75014 Paris.

Running title: CD103 signaling in human T_{RM} cells

Corresponding author: Fathia Mami-Chouaib, INSERM UMR 1186, GustaveRoussy. 39, rue Camille Desmoulins, F-94805 Villejuif. Phone: +33 1 42 11 49 65, Fax: +33 1 42 11 52 88, e-mail: fathia.mami-chouaib@gustaveroussy.fr and fathia.mami-chouaib@inserm.fr

Potential conflict of interest: The authors have no conflict of interest.

Abbreviations: IS: immune synapse; LFA: leukocyte function-associated antigen; FI: fluorescence intensity; mAb: monoclonal antibody; phospho: phosphorylated; Pyk2: proline-rich tyrosine kinase-2; NSCLC: non-small-cell lung carcinoma; r: recombinant; sh-pxn: *shorthairpin* RNA-paxillin; TCR: T-cell receptor; TIL: tumor-infiltrating lymphocyte; T_{RM}: tissue-resident memory T.

Abstract

CD8⁺/CD103⁺ tissue resident memory T (T_{RM}) cells have been identified in several human solid tumors, and are associated with a favorable prognosis. However, the role of the α_E(CD103)b₇ integrin in T_{RM} retention and functions is not yet clearly established. In this report, we investigated the involvement of the cytoplasmic domain of the integrin α_E subunit and the paxillin (Pxn) focal-adhesion-associated protein in downstream signaling and functional activities triggered through CD103. Our results indicate that binding to immobilized recombinant (r)E-cadherin-Fc of CD103, expressed on tumor-specific CTL clones, promotes phosphorylation of Pxn and Pyk2 and binding of Pxn to the CD103 α_E subunit tail. Inhibition of Pxn phosphorylation by the Src inhibitor saracatinib or its knockdown using specific *short* hairpin (sh)RNA, dramatically altered adhesion and spreading of freshly isolated CD8⁺/CD103⁺ lung-tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) and/or CD103⁺ tumor-specific CTL clones. Moreover, inhibition of Pxn phosphorylation with saracatinib in these CTL clones severely compromised their cytotoxic activity toward autologous tumor cells. Using Jurkat T cells as a model to study CD103 activation, we also demonstrated the key role of serine residue S¹¹⁶³ of the α_E chain intracellular domain in polarization of CD103 and recruitment of lysosomes and Pxn at the contact zone of T lymphocytes with rE-cadherin-Fc-coated beads. Overall, our data indicate that the association of Pxn with the CD103 cytoplasmic tail triggers outside-in signaling that promotes CD8⁺ T-cell migratory behavior and effector functions. These results also explain the more favorable prognosis associated with retention of T_{RM} cells in the tumor microenvironment.

Introduction

The $\alpha_E(\text{CD103})\beta_7$ integrin, hereafter referred to as CD103, plays a key role in cytotoxic immunological synapse (IS) formation and T-cell-receptor (TCR)-mediated cytotoxicity toward epithelial tumor cells, through polarized exocytosis of their lytic granules at the IS (Franciszkiewicz et al., 2013; Le Floc'h et al., 2007). CD103 defines a novel subtype of memory CD8^+ T cells, called tissue resident memory T (T_{RM}) cells, that stably reside in peripheral non-lymphoid tissues, including lung, gut and skin, where they orchestrate a highly protective local immune response to persistent viral infections (Jiang et al., 2012; Mackay et al., 2012; Mueller and Mackay, 2016; Piet et al., 2011) and probably also toward cancer cells. This CD103^+ T_{RM} subset, which likely derives from tissue-recruited effector T (T_{Eff}) cells, is defined by a $\text{CD69}^{\text{high}}/\text{CCR7}^{\text{low}}/\text{S1PR1}^{\text{low}}$ profile and expression of transcription factors Hobit and Blimp1, that cooperate to repress genes involved in tissue egress, including *ccr7* and *Slpr1* (Mackay et al., 2016; Turner and Farber, 2014). Accumulating evidence now indicates that $\text{CD8}^+/\text{CD103}^+$ T_{RM} cells ostensibly play a central role in anti-tumor T-cell immunity. Indeed, a correlation between tumor infiltration by CD103^+ tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) and patient survival has been established in many malignant diseases, including ovarian, lung, endometrial and breast cancers (Djenidi et al., 2015; Wang et al., 2016; Webb et al., 2014; Workel et al., 2016). CD103 promotes CD8^+ TIL activities by mediating T-cell recruitment within epithelial tumor islets, and initiating intratumoral early T-cell signaling (Boutet et al., 2016). This integrin also controls $\text{CD3}^+/\text{CD8}^+$ TIL functions, not only by inducing T-cell adhesion to cancer cells upon interaction with its ligand, the epithelial cell marker E-cadherin on target cells, but also by triggering bi-directional signaling events that cooperate with TCR signals to enable tumor cell killing by specific CTL (Boutet et al., 2016; Le Floc'h et al., 2011). In this context, it is therefore crucial to understand the mechanisms behind the signaling properties of the CD103 integrin.

After recognition by specific CTL of MHC class I antigenic peptide complexes on target cells, microclusters are generated prior to IS formation in which TCR and signaling molecules assemble at the interface between the two cell types. Each TCR microcluster is surrounded by an adhesion molecule structure, including leukocyte-function-associated antigen (LFA-1), the focal-adhesion-associated adaptor protein paxillin (Pxn) and proline-rich tyrosine kinase-2 (Pyk2). Disruption of these microstructures by downregulating both Pxn and Pyk2 inhibits T-cell activation and functions, indicating that these molecules are necessary for providing the

outside-in signals required for optimal CTL responses (Hashimoto-Tane and Saito, 2016; Hashimoto-Tane et al., 2016). Pxn is a 68 kDa protein associated with actin binding and signaling proteins. This adaptor molecule is activated through phosphorylation of several tyrosine (Tyr³¹ and Tyr¹¹⁸) and serine (Ser⁸⁵ and Ser¹⁷⁸) residues by different kinases, including focal adhesion kinase (FAK), Src kinase, JNK and p38 MAPK (Lee et al., 2012; Petit et al., 2000; Tsubouchi et al., 2002). Phosphorylated (phospho)-Pxn participates in TCR-mediated CTL activation through an integrin-dependent mechanism (Doucey et al., 2003; Robertson and Ostergaard, 2011; Romanova and Mushinski, 2011). Moreover, binding of Pxn to the α_4 integrin cytoplasmic tail promotes an outside-in co-stimulatory signal that participates in integrin-mediated T-cell migration (Liu and Ginsberg, 2000; Liu et al., 1999). A mutation (E983A or Y991A) in the α_4 cytoplasmic tail selectively blocks the interaction with Pxn and thus reduces T-cell spreading.

In this report, we investigated the role of the intracellular domain of the α_E subunit in signaling and downstream functions of the CD103 integrin, and the involvement of Pxn in these processes. Our data show that the interaction of CD103 with its ligand E-cadherin promotes phosphorylation of Pxn and Pyk2 and binding of Pxn to the α_E chain cytoplasmic domain. Our data also indicate the key role of serine residue S¹¹⁶³ in the α_E cytoplasmic tail in CD103 integrin-mediated T-cell functions. Indeed, an S1163A mutation abrogates relocalization of CD103 at the contact zone between T cells and rE-cadherin-Fc-coated beads and inhibits the secretory lysosome and Pxn polarization. Thus, the CD103-Pxn partnership is likely to represent a major outside-in signaling axis required for effector functions of CTL, including T_{RM}, and thereby the success of T-cell-based cancer immunotherapies.

Results

Pxn is involved in CD103-mediated adhesion and spreading of CD8⁺ T_{RM} cells from human lung tumors

To investigate the contribution of adapter protein Pxn to CD103-mediated T-cell functions, we first tested the effect of the Src inhibitor saracatinib (AZD0530) on the adhesion and migratory behavior of CD8⁺/CD103⁺ T_{RM} cells freshly isolated from human lung tumors. In these tumors, the CD8⁺/CD103⁺ T_{RM} subset frequently represents around half of the total CD3⁺/CD8⁺ T cells, and most of them expressed activation marker CD69 (Fig. 1A). Results indicated that saracatinib inhibited adhesion and spreading of freshly isolated CD8⁺/CD103⁺ T_{RM} cells on a human recombinant (r) E-cadherin-Fc (rE-cadherin-Fc) monolayer (Fig. 1B and C). In contrast, vehicle control (DMSO) had no effect. Similar effects of saracatinib were obtained with the tumor-specific H32-8 T-cell clone (Fig. 2A and B) and the Heu171 TIL clone (Supplementary Fig. 1A and B), with both displaying a typical CD3⁺/CD8⁺/CD103⁺/CD69⁺/CD27⁻/CD28⁻/CD62L⁻/CCR7⁻ T_{RM} phenotype ((El Hage et al., 2005) and data not shown).

Next, we tested whether CD103 engagement on the H32-8 CD8⁺/CD103⁺ T-cell clone with plastic-coated rE-cadherin-Fc was able to induce phosphorylation of Pxn, and how saracatinib could affect this phosphorylation. Western blot analyses with a phospho-Pxn-specific monoclonal antibody (mAb) revealed that ligation of CD103 on T-cell clone H32-8 triggered phosphorylation of Pxn, and this phosphorylation was inhibited by saracatinib (Fig. 2C). Ligation of CD103 on the CTL clone also triggered phosphorylation of the binding partner of Pxn, Pyk2 tyrosine kinase, which was abrogated by saracatinib (Fig. 2D). Then, and to directly address the role of Pxn, we used two short hairpin (sh)RNA (sh-pxn-1 and sh-pxn-2) targeting the *PXN* gene (Supplementary Fig. 1C). Results indicated that Pxn knockdown impaired T-cell adhesion and spreading on plate-bound rE-cadherin-Fc of the CD103⁺ CTL clone H32-8 (Fig. 2A and 2B). Similar results for T-cell adhesion were obtained with CD8⁺/CD103⁺ T cells generated from healthy donor peripheral blood lymphocytes (PBL) after treatment with a combination of TGF- β plus anti-CD3 mAb (Mokrani et al., 2014) (Supplementary Fig. 1D). In these experiments, we verified that neither saracatinib nor sh-pxn had an effect on T-cell viability (Supplementary Fig. 2A and B) or cell surface expression of CD3, CD8 and CD103 molecules (Supplementary Fig. 2C and D). These results demonstrated that Pxn is involved in CD103 intracellular signaling and CD103-mediated T_{RM} cell adhesion and spreading.

Pxn binds to the CD103 cytoplasmic domain and its phosphorylation promotes CD8⁺ T_{RM} cell functions

We then evaluated the consequences of inhibiting Pxn phosphorylation on the CD103-dependent TCR-mediated cytotoxicity of CD8⁺/CD103⁺ Heu171 and H32-8 T-cell clones toward autologous target cells. Results showed that pre-incubating these CTL clones with saracatinib abrogated their lytic activity toward specific IGR-Heu tumor cells (Fig. 3A). This inhibition of cytotoxicity correlated with inhibition of CD103 relocalization at the IS between saracatinib-treated CD8⁺/CD103⁺ H32-8 CTL and autologous ICAM-1/E-cadherin⁺ IGR-Heu target cells (Fig. 3B). Importantly, inhibition of CD103 relocalization at the IS was also observed after knockdown of Pxn in this T-cell clone with sh-pxn-1 or sh-pxn-2 shRNA (Fig. 3B). In contrast, sh-scrambled, used as a negative control, had no effect.

We next investigated whether Pxn could bind to CD103 in CD8⁺/CD103⁺ T cells. With this aim, we stimulated CD103⁺ CTL clone H32-8 with immobilized rE-cadherin-Fc, and then performed immunoprecipitation experiments with anti-CD103 or anti-Pxnm Abs. Western blot analysis of the two types of immunoprecipitates after CD103 engagement showed that a complex is formed in which the two proteins are present (Fig. 3C). These results further support the conclusion that Pxn is involved in CD103 signaling upon its binding to the CD103 intracellular domain.

The Ser¹¹⁶³ residue in the a_E tail is required for triggering CD103 clustering and outside-in signaling

The short a_E chain cytoplasmic domain of CD103 contains one Tyr (Y¹¹⁵⁶) and two Ser (S¹¹⁶³ and S¹¹⁷¹) residues that could potentially be phosphorylated after CD103 engagement with its ligand E-cadherin. Studies were thus carried out to investigate their role in CD103 signaling and Pxn binding. With this aim, we first constructed several deletion mutants of the a_E subunit, containing, or not, these residues and fused to GFP (Fig. 4A, upper panel). In these mutants, the cytoplasmic KCGFFKRRK sequence of CD103 was kept intact, since the conserved GFFKR juxta-membrane domain is required for integrin activation and interaction with the b-integrin chain through a salt bridge between the arginine residue from the a-chain and the aspartic acid residue from the HDR(R/K)E proximal domain of the b-chain (Adair and Yeager, 2002; Vinogradova et al., 2000). These CD103 constructs were transfected into an α_E⁻ Jurkat T-cell (JTag) clone, which was previously selected for spontaneous strong expression

of the integrin β_7 -subunit (see supplementary Fig. 3A) in order to obtain satisfactory expression of the $\alpha_E\beta_7$ heterodimer in the transfected cells. CD103 integrin clustering at the contact zone with rE-cadherin-Fc-coated beads was then analyzed by confocal microscopy as well as accumulation of lysosomes. A wild-type (WT) CD103-GFP molecule was used as a control. Compared to the control, CD103 clustering and lysosome polarization were strongly inhibited by CD103- $\Delta 1$ and CD103- $\Delta 2$ mutants (Fig. 4B). In contrast, the CD103- $\Delta 3$ mutant functioned like CD103-WT, suggesting that S¹¹⁶³, but not S¹¹⁷¹, is essential for this activity.

To further verify this hypothesis, we constructed four additional mutants containing single amino acid (aa) substitutions of S¹¹⁶³ and/or Y¹¹⁵⁶ to alanine (Fig. 4A, lower panel). We found that only the substitution of S¹¹⁶³ (S1163A) resulted in loss of integrin clustering and lysosome polarization (Fig. 4C). As expected, a construct containing both substitutions had similar effects. Moreover, substitution of the Ser by an aspartate (D) at position 1163 (CD103-S1163D), to mimic phosphorylation, restored CD103 clustering and lysosome relocalization. We controlled, in these experiments, that JTag cells transfected with the different CD103-GFP fusion proteins displayed similar expression levels of CD103. For unexplained reasons, only the CD103-S1163D protein was expressed at lower levels (Supplementary Fig. 3B). All transfectants also displayed the same capacity to adhere to plastic-bound rE-cadherin-Fc (supplementary Fig. 3C) and to form conjugates with rE-cadherin-Fc-coated beads (supplementary Fig. 3D). These results further support the conclusion that the phosphorylation status of S¹¹⁶³ in the α_E -ESIRKAQL intracellular motif is crucial for CD103 clustering and outside-in signaling.

The α_E -Ser¹¹⁶³ residue is required for triggering Pxn polarization and CD103-mediated early T-cell signaling

Next, we investigated the impact of S1163A substitution on relocalization of Pxn at the contact zone of transfected JTag T cells with rE-cadherin-Fc-coated beads using the same CD103-GFP constructs used above. Pxn was strongly polarized at the contact zone with E-cadherin-Fc-coated beads when JTag T cells were transfected with the CD103-WT-GFP molecule (Fig. 4D). As expected, this polarization was inhibited by saracatinib (Supplementary Fig. 4A). Analyzing the different CD103-GFP mutants, we found that neither CD103- $\Delta 2$ nor CD103-S1163A was able to recruit Pxn at the contact area (Fig. 4D).

We finally questioned whether S¹¹⁶³ in the CD103 cytoplasmic domain was necessary for CD103-dependent early T-cell signaling by monitoring the Ca²⁺ response triggered by a combination of rE-cadherin-Fc and low doses of anti-CD3 mAb in JTag T cells transfected with the different constructs. As expected, a strong calcium response was obtained with cells transfected with CD103-WT, CD103-Δ3 and CD103-S1163D fusion proteins (Supplementary Fig. 4B). In contrast, only a weak Ca²⁺ increase was observed with CD103-Δ2. Notably, CD103-S1163A substitution had no effect on calcium response, suggesting that the structural integrity of the ES¹¹⁶³IRKAQL motif, rather than the phosphorylation status of S¹¹⁶³, is important for CD103-mediated early T-cell signaling. These results further support the conclusion that the CD103-ESIRKAQL intracellular motif is required for binding Pxn and initiating CD103 outside-in signaling.

Discussion

In this report, we show that the CD103 integrin is indispensable for TCR-mediated CD8⁺/CD103⁺ T_{RM} activities through the α_E chain cytoplasmic domain, and that a phosphorylatable Ser at position 1163 in the ES¹¹⁶³IRKAQL motif of the subunit tail plays an important role in CD103 functions. We also show that the Pxn scaffold protein is involved in CD103 outside-in signaling. Indeed, engagement of CD103 with plastic-bound rE-cadherin-Fc on CD8⁺/CD103⁺T_{RM} cells freshly isolated from human lung tumors and tumor-specific CTL clones promotes Pxn phosphorylation and binding to the CD103 cytoplasmic tail. Moreover, we found that inhibition of Pxn phosphorylation or its knockdown resulted in blockade of CD103-dependent T_{RM} functions by inhibiting both CD103 clustering and intracellular signaling leading to cytotoxic granule polarization and exocytosis. Thus, we conclude that the α_E -subunit intracellular domain of CD103 triggers signals that control T_{RM} adhesion and migratory behavior, as well as lytic activity through a Pxn-dependent pathway. Consistently, we had previously reported that knockdown of E-cadherin in epithelial cancer cells blocked CD103 recruitment at the IS and, concomitantly, cytolytic granule relocalization and subsequent exocytosis (Le Floc'h et al., 2007).

Pxn exerts important functions in lymphoid cells, working as a signaling adaptor after its binding to integrin subunits (Deakin and Turner, 2008). Pxn localizes to focal adhesions and mediates scaffolding activities by recruiting numerous structural and signaling proteins. This phosphoprotein has also been shown to bind to the α_4 integrin subunit tail (Liu and Ginsberg, 2000; Liu et al., 1999). In this case, two critical specific residues (Glu⁹⁸³ or Tyr⁹⁹¹) in a conserved 9-aa region of the α_4 cytoplasmic domain have been identified as being sufficient for Pxn binding and downstream cell spreading and migratory activities induced via the integrin (Liu and Ginsberg, 2000; Liu et al., 1999). Similarly, our results show that the α_E cytoplasmic domain of the CD103 integrin contains an 8-aa region, ES¹¹⁶³IRKAQL, required for Pxn binding, CD103 polarization and lysosome accumulation at the contact zone between T cells and E-cadherin-Fc-coated beads. They also demonstrate the key role played by Ser¹¹⁶³ in this region for controlling these signaling events.

In additional experiments, we found that deletion of the whole ES¹¹⁶³IRKAQL motif suppressed the T-cell Ca²⁺ response induced after CD3 triggering and amplified by co-stimulation with immobilized rE-cadherin-Fc molecules. This suggests that the ESIRKAQL sequence is required for CD103-costimulatory activity during TCR engagement. In contrast, a

S1163A substitution had no effect on the Ca^{2+} response, suggesting that phosphorylation of S¹¹⁶³ is not required for this function. This discrepancy is reminiscent of what has been found with the NITY⁷⁵⁹ motif of the β_3 integrin cytoplasmic domain. In this case, the structural integrity of this motif was required for optimal β_3 post-ligand binding events, whereas Tyr⁷⁵⁹ was required for β_3 -mediated cytoskeleton reorganization and tyrosine phosphorylation of FAK and Pxn (Schaffner-Reckinger et al., 1998). Notably, none of the α_E cytoplasmic domain mutations generated in the present study affected the receptor-ligand interaction, indicating that the phosphorylation status of S¹¹⁶³ in the ESIRKAQL motif is dispensable for CD103-E-cadherin interaction, but indispensable for CD103-mediated tyrosine phosphorylation of Pxn and CD103 integrin outside-in signaling effects.

Pyk2 is a protein tyrosine kinase (PTK) that interacts with several signaling and cytoskeletal molecules, such as Src family PTK and Pxn (Avraham et al., 1995; Gismondi et al., 1997; Lev et al., 1995; Salgia et al., 1996). Pyk2 plays a major role in regulating cell adhesion and migration (Rose et al., 2003; Rumsey et al., 2001). It is also essential for LFA-1-mediated CD8 T-cell adhesion and migration, and a deficiency in Pyk2 resulted in a specific loss of short-lived effector CD8 T cells (Beinke et al., 2010). This tyrosine kinase also contributes to CTL migration by regulating detachment of CTL at the trailing edge (Cheung and Ostergaard, 2016). Studies performed with human NK cells indicated that LFA-1 induced phosphorylation of Pxn and Pyk2, and that LFA-1-dependent granule polarization was blocked following Pxn knockdown (March and Long, 2011). We show here that the interaction of CD103 on CD8⁺/CD103⁺ CTL with plastic-bound rE-cadherin-Fc resulted in phosphorylation of Pxn and Pyk2. Importantly, it has been reported that the α_4 -Pxn association enhanced Pyk2 and/or FAK phosphorylation, and that increased activation of Pyk2 and/or FAK is an immediate signaling event required for *trans*-regulation of LFA-1 by the $\alpha_4\beta_1$ integrin (Rose et al., 2003). It is therefore tempting to speculate that the augmented phosphorylation of Pyk2 induced upon α_E -Pxn ligation also stimulates LFA-1-mediated T-cell migration and functions, including in the tumor microenvironment. A role of the α_E -Pxn complex in this case would be to recruit Pyk2 to sites of α_E -mediated adhesion.

We report here that CD103-E-cadherin adhesion triggers phosphorylation of Pyk2 and Pxn proteins, both of which participate in the signaling properties of CD103. The Pxn N-terminus region contains five LD motifs that serve as binding sites for FAK tyrosine kinase and the

integrin-linked kinase (ILK) (Brown et al., 1996; Nikolopoulos and Turner, 2000; Nikolopoulos and Turner, 2001). The association of Pxn with ILK is essential for targeting ILK to focal adhesions. Involvement of ILK in both inside-out and outside-in integrin signaling (Grashoff et al., 2003; Stevens et al., 2004) and in β_2 integrin-mediated polarization of lytic granules toward the target have been reported (Zhang et al., 2014). We previously showed that the interaction of TGF- β with its receptors TGFBR on the surface of CD8⁺/CD103⁺ T cells induces recruitment and phosphorylation of ILK and its subsequent binding to the CD103 intracellular domain (Boutet et al., 2016). This CD103-phospho-ILK interaction induces phosphorylation of AKT, initiating an integrin inside-out signaling leading to activation of CD103 and strengthening of CD103-E-cadherin adhesion. Therefore, it is not excluded that a Pxn-Pyk2-ILK focal adhesion complex is formed during CD103 engagement with its ligand E-cadherin.

Together, our results emphasize the crucial role of the αE -cytoplasmic domain of the CD103 integrin for the functional activities of CD8⁺/CD103⁺ T_{RM} cells infiltrating human epithelial tumor lesions. They probably explain why CD103 expression is a hallmark of this CD8⁺/CD103⁺ T_{RM} subset, as its expression is usually required for optimal anti-tumor CTL responses. Therefore, manipulating this pathway could be of great interest in the emerging field of TIL-based adoptive cell transfer therapy and optimization of immune checkpoint blockade and T-cell-based cancer immunotherapies.

Methods

Tumor cell lines, T cells and freshly isolated lung TIL T_{RM}

The IGR-Heu tumor cell line was established from a non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) as described (Le Floc'h et al., 2007). Heu171 and H32-8 T-cell clones, generated from autologous TIL and PBL, respectively, recognized a mutated α -actinin-4 tumor neopeptide (Echchakir et al., 2002).

A JTag clone, stably transfected with the SV40 large T antigen, was derived from the human leukemia CD4⁺ Jurkat T-cell line. JTag cells were cloned by limiting dilution and an α_E^-/b_7^+ JTag T-cell clone was selected.

Fresh human NSCLC tumors were obtained from the Institut Mutualiste Montsouris (Paris) and immediately dissociated mechanically and enzymatically using a tumor dissociation kit (MACS, Miltenyi Biotec). Mononuclear cells were then isolated by a Ficoll-Hypaque gradient, and CD8 T cells were positively selected using CD8 microbeads according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec).

Recombinant molecules, antibodies and chemical inhibitor

The human rE-cadherin-Fc molecule was provided by R&D Systems. Anti-CD103 (2G5) mAb was purchased from Beckman Coulter and PE-conjugated anti-CD103 was purchased from eBiosciences. Anti-CD3 (UCHT1) was provided by Ozyme and anti-CD8 (RPA-T8) was supplied by BioLegend. Anti-Pxn and anti-phospho-Pxn (Tyr118) mAb were purchased from BD Biosciences and Cell signaling, respectively. Anti-Pyk2 and anti-phospho-Pyk2 (Tyr 402) were purchased from Life Technologies.

The src inhibitor, saracatinib (AZD0530), was purchased from Millipore.

Production of Pxn shRNA lentivirus and T-cell transfection

Two shRNA targeting human Pxn (sh-pxn-1: GGGCAGCAACCTTTCTGAACT and sh-pxn-2: GATCCCGCAAGGACTACTTCGACATGT) were synthesized (Sigma Aldrich) and then inserted into a pBlue Script containing the human *HI* promoter. A scrambled sequence (CGGCAGCTAGCGACGCCAT) was also synthesized and used as a negative control. The *HI*-pxn-1, *HI*-pxn-2 and *HI*-scrambled cassettes were inserted into the linearized pRRLsin-PGK-eGFP-WPRE viral vector. Lentivirus particles were prepared by transient co-transfection of HEK293T cells (human 293 embryonic kidney cells transformed with the SV40 large T-antigen) with lentiviral vector plasmids (sh-pxn-1, sh-pxn-2 or sh-scrambled), packaging plasmid pCMV Δ R8.91 and the pMD2.G protein envelope plasmid. JetPrime was

used for transfection of HEK293T according to the manufacturer's instructions (Ozyme). Briefly, lentivirus particles were immediately added to give a multiplicity of infection (MOI) of 30, spinoculated for 1 h at 1,300 rpm, and then lymphocytes were cultured in the presence of IL-2 (50 U/mL) for 3 days.

Confocal microscopy and quantification of protein polarization

For T-cell adhesion, poly-L-lysine slices were coated with rE-cadherin-Fc (5 µg/ml) overnight at 4°C, and lymphocytes, untreated or treated for 4 h with saracatinib (1µM) or infected with specific shRNA (sh-pxn-1, sh-pxn-2 or sh-scrambled) were incubated for 1 h min at 37°C. Cells were then fixed and permeabilized and polymerized F-actin was stained with rhodamine phalloidin as described (Boutet et al., 2016; Le Floc'h et al., 2007). Cell shape index was calculated as the ratio of the longest to the shortest axis measured via Image J software as described (Boutet et al., 2016).

For protein polarization, T cells, untreated or pretreated with saracatinib or sh-RNA or transfected with CD103-GFP constructs, were pre-incubated for 30 min with rE-cadherin-Fc-coupled protein G-Dynabeads or IGR-Heu tumor cells, at a 2:1 effector to target cell (E:T) ratio and then plated on poly-(L-lysine)-coated coverslips. Cells were then fixed, permeabilized and stained with mouse anti-CD103 or mouse anti-Pxn mAb, followed by anti-mouse-Alexa-Fluor-488. Coverslips were mounted and analyzed using a fluorescence microscope with x63 lenses as described (Boutet et al., 2016; Le Floc'h et al., 2007). To quantify polarization of the proteins to the IS with target cells or the contact zone with E-cadherin-Fc-coated beads, a volume corresponding to the synaptic area and an equal volume at the opposite site of the T cell were drawn and fluorescence intensities (FI) were calculated. Results were reported as the fold-increase in the corresponding staining integrated FI at the synaptic region, divided by the same FI measured at the distal region (Khazen et al., 2016).

Western blot and immunoprecipitation experiments

T cells (5×10^5), untreated or pretreated with saracatinib or shRNA, were unstimulated or stimulated for 10 min at 37°C with plastic-coated rE-cadherin-Fc. Total protein extracts were obtained by cell lysis in ice-cold lysis buffer supplemented with a cocktail of anti-proteases and anti-phosphatases as described (Le Floc'h et al., 2011). Equivalent amounts of protein extracts were denatured, separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Blots were incubated for 30 min in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 and 5% non-fat dry milk, and further incubated overnight at 4°C with rabbit anti-phospho-

Pxn, anti-Pxn, anti-phospho-Pyk-2 and anti-Pyk-2 mAb, followed by appropriate secondary HRP-conjugated Ab.

For immunoprecipitation, T-cell extracts were incubated for 2 h at 4°C with cross-linked anti-CD103 or anti-Pxn beads, or protein G-sepharose beads prebound with control mouse IgG. Beads were then washed and eluted with reducing agent at 95°C.

Construction of CD103-GFP fusion proteins and transfection of JTag cells

An *ITGAE* cDNA coding for the human α_E (CD103) subunit, cloned in a pAMR8 vector (Higgins et al., 2000), was a gift from Prof. Michael B. Brenner (Boston, MA). The cDNA clone was subcloned in pEGFPN1 plasmid and fused to GFP by directed mutagenesis (CD103-WT-GFP). Deletions in CD103 cytoplasmic domains were generated with the Quickchange II XL Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies). The CD103-WT-GFP construct was used to generate CD103- $\Delta 1$ with forward 5'-GTGTGGCTTTTTTAAAAGAAAAGCTCAAGCTTCGAATTCTGCAGTC-3' and reverse 3'-GACTGCAGAATTCGAAGCTTGAGTTTTCTTTTAAAAAAGCCACAC-5' primer pairs; CD103- $\Delta 2$ with forward 5'-GAAAATATCAACAAGCTGAACTTGCTCAAGCTTCGAATTCTGCAG-3' and reverse 5'-CTGCAGAATTCGAAGCTTGAGCAAGTTCAGTTGTTGATATTTTC-3'; CD103- $\Delta 3$ with forward 5'-GAGCATCAGGAAGGCCAGCTGCTCAAGCTTCGAATTCTG-3' and reverse 5'-CAGAATTCGAAGCTTGAGCAGCTGGGCCTTCCTGATGCTC-3'; CD103-Y1156A with forward 5'-GTGTGGCTTTTTTAAAAGAAAAGCACAACAAGCTGAACTTGGAGGC-3' and reverse 5'-GCCTCCAAGTTCAGTTGTTGTGCTTTTTCTTTTAAAAAAGCCACAC-3'. CD103-S1163A with forward 5'-AGCTGGGCCTTCCTGATTGCCTCCAAGTTCAGTTGTTG-3' and reverse 5'-CAACAAGCTGAACTTGGAGGCAATCAGGAAGGCCAGCT-3'; and CD103-S1163D with forward 5'-AGCTGGGCCTTCCTGATGTCCTCCAAGTTCAGTTGTTG-3' and reverse: 5'-CAACAAGCTGAACTTGGAGGACATCAGGAAGGCCAGCT-3' primer pairs. The CD103-S1163A construct was used to generate CD103-Y1156A/S1163A with forward 5'-GTGTGGCTTTTTTAAAAGAAAAGCACAACAAGCTGAACTTGGAGGC-3' and reverse 5'-GCCTCCAAGTTCAGTTGTTGTGCTTTTTCTTTTAAAAAAGCCACAC-3'.

Ten x 10⁶ b₇⁺ JTag cells were resuspended in RPMI supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum with 30 µg of plasmid DNA and transferred to a 0.4 cm electroporation cuvette. Electroporation was performed with the Gene Pulser II system (Biorad Laboratories) at 280 V and 900 µF; next, cells were cultured in fresh complete medium for 48 h.

Functional experiments

Cytotoxicity of T-cell clones was evaluated with a conventional 4 h ⁵¹Cr-release assay. T cells were either kept in medium or treated with saracatinib; then, cytotoxic activity towards autologous IGR-Heu tumor cells was determined at a 30:1, 10:1, 3:1 E:T ratios.

For single-cell calcium measurement, JTag cells were labeled with 1 µM Fura-2AM (Molecular Probes), and alternatively excited every 10 s at 350 and 380 nm on an inverted Eclipse TE300 microscope equipped with a x10 objective and a Metafluor imaging system. At 60 s, rE-cadherin-Fc (5 µg/mL) plus anti-CD3 (0.5 µg/mL)-coated beads were added. Values were represented as a ratio of FI at 350 nm/FI at 380 nm.

Statistical analysis

Statistical significance was determined with the one-way-ANOVA test with Bonferroni correction or with the two-tailed Student t-test (GraphPad Prism, GraphPad software).

Acknowledgments

We thank Prof. Michael B. Brenner and Jonathan Higgins for their kind gift of the *ITGAE* cDNA clone. We also thank Dr. Emmanuel Donnadieu, INSERM U1016, Institut Cochin Paris, for his help with calcium experiments, Dr. Olivier Bluteau, UMR 1009 INSERM Gustave Roussy, for his help with lentiviral constructs and the cytometry facility (Plateforme d'Imagerie-Cytométrie) of Gustave Roussy for flow cytometry analyses. This work was supported by grants from the INSERM, Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and the Institut National du Cancer (INCa). LG was a recipient of a MENRT fellowship from the French Ministry of Research and the Ligue contre le Cancer; SC is a recipient of a fellowship from INCa.

Author contributions

Conception and design: L Gauthier, M Mokrani, F, G Bismuth and F Mami-Chouaib.

Development of methodology: L Gauthier, M Mokrani, S Cognac, G Bismuth and F Mami-Chouaib.

Acquisition of data (providing animals, acquiring and managing patients, providing facilities, etc.): L Gauthier, M Mokrani, G Bismuth, P Validire and F Mami-Chouaib.

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): L Gauthier and F Mami-Chouaib.

Writing, reviewing and/or revision of the manuscript: L Gauthier, G Bismuth and F Mami-Chouaib.

Administrative, technical and material support (i.e. reporting and organizing data, constructing databases): L Gauthier, M Mokrani, S Cognac, P Validire and F Mami-Chouaib.

Study supervision: F Mami-Chouaib.

References

1. Le Floch A, Jalil A, Vergnon I, Le Maux Chansac B, Lazar V, Bismuth G, Chouaib S, and Mami-Chouaib F. Alpha E beta 7 integrin interaction with E-cadherin promotes antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(3):559-70.
2. Franciszkiewicz K, Le Floch A, Boutet M, Vergnon I, Schmitt A, and Mami-Chouaib F. CD103 or LFA-1 engagement at the immune synapse between cytotoxic T cells and tumor cells promotes maturation and regulates T-cell effector functions. *Cancer research*. 2013;73(2):617-28.
3. Piet B, de Bree GJ, Smids-Dierdorp BS, van der Loos CM, Remmerswaal EB, von der Thusen JH, van Haarst JM, Eerenberg JP, ten Brinke A, van der Bij W, et al. CD8(+) T cells with an intraepithelial phenotype upregulate cytotoxic function upon influenza infection in human lung. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(6):2254-63.
4. Jiang X, Clark RA, Liu L, Wagers AJ, Fuhlbrigge RC, and Kupper TS. Skin infection generates non-migratory memory CD8+ T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature*. 2012;483(7388):227-31.
5. Mackay LK, Stock AT, Ma JZ, Jones CM, Kent SJ, Mueller SN, Heath WR, Carbone FR, and Gebhardt T. Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(18):7037-42.
6. Mueller SN, and Mackay LK. Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nature reviews Immunology*. 2016;16(2):79-89.
7. Turner DL, and Farber DL. Mucosal resident memory CD4 T cells in protection and immunopathology. *Frontiers in immunology*. 2014;5(331).
8. Mackay LK, Minnich M, Kragten NA, Liao Y, Nota B, Seillet C, Zaid A, Man K, Preston S, Freestone D, et al. Hobit and Blimp1 instruct a universal transcriptional program of tissue residency in lymphocytes. *Science (New York, NY)*. 2016;352(6284):459-63.
9. Webb JR, Milne K, Watson P, Deleeuw RJ, and Nelson BH. Tumor-infiltrating lymphocytes expressing the tissue resident memory marker CD103 are associated with increased survival in high-grade serous ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20(2):434-44.
10. Djenidi F, Adam J, Goubar A, Durgeau A, Meurice G, de Montpreville V, Validire P, Besse B, and Mami-Chouaib F. 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.* 2015;194(7):3475-86.

11. Workel HH, Komdeur FL, Wouters MC, Plat A, Klip HG, Eggink FA, Wisman GB, Arts HJ, Oonk MH, Mourits MJ, et al. CD103 defines intraepithelial CD8+ PD1+ tumour-infiltrating lymphocytes of prognostic significance in endometrial adenocarcinoma. *Eur J Cancer.* 2016;60(1-11).

12. Wang ZQ, Milne K, Derocher H, Webb JR, Nelson BH, and Watson PH. CD103 and Intratumoral Immune Response in Breast Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2016.

13. Boutet M, Gauthier L, Leclerc M, Gros G, de Montpreville V, Theret N, Donnadiou E, and Mami-Chouaib F. TGFbeta Signaling Intersects with CD103 Integrin Signaling to Promote T-Lymphocyte Accumulation and Antitumor Activity in the Lung Tumor Microenvironment. *Cancer research.* 2016;76(7):1757-69.

14. Le Floc'h A, Jalil A, Franciszkiewicz K, Validire P, Vergnon I, and Mami-Chouaib F. Minimal engagement of CD103 on cytotoxic T lymphocytes with an E-cadherin-Fc molecule triggers lytic granule polarization via a phospholipase Cgamma-dependent pathway. *Cancer research.* 2011;71(2):328-38.

15. Hashimoto-Tane A, and Saito T. Dynamic Regulation of TCR-Microclusters and the Microsynapse for T Cell Activation. *Frontiers in immunology.* 2016;7(255).

16. Hashimoto-Tane A, Sakuma M, Ike H, Yokosuka T, Kimura Y, Ohara O, and Saito T. Micro-adhesion rings surrounding TCR microclusters are essential for T cell activation. *The Journal of experimental medicine.* 2016;213(8):1609-25.

17. Petit V, Boyer B, Lentz D, Turner CE, Thiery JP, and Valles AM. Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells. *The Journal of cell biology.* 2000;148(5):957-70.

18. Tsubouchi A, Sakakura J, Yagi R, Mazaki Y, Schaefer E, Yano H, and Sabe H. Localized suppression of RhoA activity by Tyr31/118-phosphorylated paxillin in cell adhesion and migration. *The Journal of cell biology.* 2002;159(4):673-83.

19. Lee YC, Chang AY, Lin-Feng MH, Tsou WI, Chiang IH, and Lai MZ. Paxillin phosphorylation by JNK and p38 is required for NFAT activation. *European journal of immunology.* 2012;42(8):2165-75.

20. Doucey MA, Legler DF, Faroudi M, Boucheron N, Baumgaertner P, Naeher D, Cebeauer M, Hudrisier D, Ruegg C, Palmer E, et al. The beta1 and beta3 integrins promote

T cell receptor-mediated cytotoxic T lymphocyte activation. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(29):26983-91.

21. Robertson LK, and Ostergaard HL. Paxillin associates with the microtubule cytoskeleton and the immunological synapse of CTL through its leucine-aspartic acid domains and contributes to microtubule organizing center reorientation. *J Immunol*. 2011;187(11):5824-33.

22. Romanova LY, and Mushinski JF. Central role of paxillin phosphorylation in regulation of LFA-1 integrins activity and lymphocyte migration. *Cell adhesion & migration*. 2011;5(6):457-62.

23. Liu S, Thomas SM, Woodside DG, Rose DM, Kiosses WB, Pfaff M, and Ginsberg MH. Binding of paxillin to alpha4 integrins modifies integrin-dependent biological responses. *Nature*. 1999;402(6762):676-81.

24. Liu S, and Ginsberg MH. Paxillin binding to a conserved sequence motif in the alpha 4 integrin cytoplasmic domain. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(30):22736-42.

25. El Hage F, Vergnon I, Grunenwald D, Soria JC, Chouaib S, and Mami-Chouaib F. Generation of diverse mutated tumor antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in a lung cancer patient with long survival. *Oncol Rep*. 2005;14(3):763-9.

26. Mokrani M, Klibi J, Bluteau D, Bismuth G, and Mami-Chouaib F. Smad and NFAT pathways cooperate to induce CD103 expression in human CD8 T lymphocytes. *J Immunol*. 2014;192(5):2471-9.

27. Adair BD, and Yeager M. Three-dimensional model of the human platelet integrin alpha IIb beta 3 based on electron cryomicroscopy and x-ray crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(22):14059-64.

28. Vinogradova O, Haas T, Plow EF, and Qin J. A structural basis for integrin activation by the cytoplasmic tail of the alpha IIb-subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(4):1450-5.

29. Deakin NO, and Turner CE. Paxillin comes of age. *Journal of cell science*. 2008;121(Pt 15):2435-44.

30. Schaffner-Reckinger E, Gouon V, Melchior C, Plancon S, and Kieffer N. Distinct involvement of beta3 integrin cytoplasmic domain tyrosine residues 747 and 759 in integrin-mediated cytoskeletal assembly and phosphotyrosine signaling. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(20):12623-32.

31. Lev S, Moreno H, Martinez R, Canoll P, Peles E, Musacchio JM, Plowman GD, Rudy B, and Schlessinger J. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature*. 1995;376(6543):737-45.
32. Avraham S, Jiang S, Ota S, Fu Y, Deng B, Dowler LL, White RA, and Avraham H. Structural and functional studies of the intracellular tyrosine kinase MATK gene and its translated product. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(4):1833-42.
33. Salgia R, Pisick E, Sattler M, Li JL, Uemura N, Wong WK, Burky SA, Hirai H, Chen LB, and Griffin JD. p130CAS forms a signaling complex with the adapter protein CRKL in hematopoietic cells transformed by the BCR/ABL oncogene. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(41):25198-203.
34. Gismondi A, Bisogno L, Mainiero F, Palmieri G, Piccoli M, Frati L, and Santoni A. Proline-rich tyrosine kinase-2 activation by beta 1 integrin fibronectin receptor cross-linking and association with paxillin in human natural killer cells. *J Immunol*. 1997;159(10):4729-36.
35. Rumsey LM, Teague RM, Benedict SH, and Chan MA. MIP-1alpha induces activation of phosphatidylinositol-3 kinase that associates with Pyk-2 and is necessary for B-cell migration. *Exp Cell Res*. 2001;268(1):77-83.
36. Rose DM, Liu S, Woodside DG, Han J, Schlaepfer DD, and Ginsberg MH. Paxillin Binding to the $\alpha 4$ Integrin Subunit Stimulates LFA-1 (Integrin $\alpha L \beta 2$)-Dependent T Cell Migration by Augmenting the Activation of Focal Adhesion Kinase/Proline-Rich Tyrosine Kinase-2. *The Journal of Immunology*. 2003;170(12):5912-8.
37. Beinke S, Phee H, Clingan JM, Schlessinger J, Matloubian M, and Weiss A. Proline-rich tyrosine kinase-2 is critical for CD8 T-cell short-lived effector fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(37):16234-9.
38. Cheung SM, and Ostergaard HL. Pyk2 Controls Integrin-Dependent CTL Migration through Regulation of De-Adhesion. *J Immunol*. 2016;197(5):1945-56.
39. March ME, and Long EO. beta2 integrin induces TCRzeta-Syk-phospholipase C-gamma phosphorylation and paxillin-dependent granule polarization in human NK cells. *J Immunol*. 2011;186(5):2998-3005.
40. Brown MC, Perrotta JA, and Turner CE. Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *The Journal of cell biology*. 1996;135(4):1109-23.

41. Nikolopoulos SN, and Turner CE. Actopaxin, a new focal adhesion protein that binds paxillin LD motifs and actin and regulates cell adhesion. *The Journal of cell biology*. 2000;151(7):1435-48.
42. Nikolopoulos SN, and Turner CE. Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(26):23499-505.
43. Grashoff C, Aszodi A, Sakai T, Hunziker EB, and Fassler R. Integrin-linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation. *EMBO reports*. 2003;4(4):432-8.
44. Stevens JM, Jordan PA, Sage T, and Gibbins JM. The regulation of integrin-linked kinase in human platelets: evidence for involvement in the regulation of integrin alpha 2 beta 1. *J Thromb Haemost*. 2004;2(8):1443-52.
45. Zhang M, March ME, Lane WS, and Long EO. A signaling network stimulated by beta2 integrin promotes the polarization of lytic granules in cytotoxic cells. *Sci Signal*. 2014;7(346):ra96.
46. Echchakir H, Dorothee G, Vergnon I, Menez J, Chouaib S, and Mami-Chouaib F. Cytotoxic T lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen display similar HLA tetramer binding but distinct functional avidity and tissue distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(14):9358-63.
47. Khazen R, Muller S, Gaudenzio N, Espinosa E, Puissegur MP, and Valitutti S. Melanoma cell lysosome secretory burst neutralizes the CTL-mediated cytotoxicity at the lytic synapse. *Nature communications*. 2016;7(10823).
48. Higgins JM, Cernadas M, Tan K, Irie A, Wang J, Takada Y, and Brenner MB. The role of alpha and beta chains in ligand recognition by beta 7 integrins. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(33):25652-64.

Figure legends

Figure 1

The src inhibitor saracatinib (Sara) inhibits adhesion and spreading of freshly isolated lung tumor T_{RM} cells. **A.** Expression of CD103 and CD69 T_{RM} markers on NSCLC $CD3^+/CD8^+$ TIL. Freshly resected NSCLC tumors were dissociated, and the CD8 T-cell subset was positively selected and then directly analyzed by flow cytometry for CD69 and CD103 expression. Two representative TIL samples used in this study are shown. Percentages of $CD103^+/CD69^+$ among $CD3^+/CD8^+$ cells are indicated. **B.** Saracatinib inhibits adhesion of freshly isolated NSCLC T_{RM} to rE-cadherin-Fc. Adhesion to plastic-bound rE-cadherin-Fc of freshly isolated $CD8^+/CD103^+$ TIL, untreated or pretreated with saracatinib or vehicle control (DMSO), was analyzed by confocal microscopy. *Right panel:* Mean numbers of adherent lymphocytes per field. Adhesion was evaluated by counting adherent lymphocytes stained with CD103 and DAPI. Statistical analyses are from 3 independent experiments. Bars, 100 μm ; ***, $p < 0.0001$. **C.** Migratory behavior of freshly isolated TIL T_{RM} on immobilized rE-cadherin-Fc. $CD8^+/CD103^+$ TIL, untreated or pretreated with saracatinib, were seeded on rE-cadherin-Fc and polymerized F-actin was visualized with rhodamine phalloidin. *Right panel:* Mean T-cell shape index. Statistical analyses are from 3 independent experiments. Bars, 5 μm ; ***, $p < 0.0001$.

Figure 2

CD103 integrin promotes adhesion and spreading of $CD8^+/CD103^+$ CTL in a Pxn-dependent pathway. **A.** Adhesion of $CD8^+/CD103^+$ CTL on a rE-cadherin-Fc monolayer. Adhesion to plate-bound rE-cadherin-Fc of the $CD8^+/CD103^+$ T-cell clone H32-8, untreated (DMSO) or pretreated with saracatinib (Sara) or infected with sh-pxn-1 or sh-scrambled (sh-scram) negative control. *Right panel:* Mean numbers of adherent lymphocytes per field. Statistical analyses are from 3 independent experiments. Bars, 100 μm ; ***, $p < 0.0001$ and *, $p < 0.05$. **B.** Migratory behavior of $CD8^+/CD103^+$ CTL on rE-cadherin-Fc monolayer. The $CD8^+/CD103^+$ H32-8 T-cell clone, untreated (vehicle) or pretreated with saracatinib or infected with sh-pxn-1, was seeded on immobilized rE-cadherin-Fc and then cell shape was monitored. Sh-scrambled was used as a negative control. Polymerized F-actin was visualized with rhodamine phalloidin. *Right panel:* Mean T-cell shape index. Statistical analyses are from 3 independent experiments. Bars, 5 μm , ***, $p < 0.0001$. **C.** Interaction of CD103 with its ligand E-cadherin triggers phosphorylation of Pxn, which is inhibited by saracatinib. The $CD8^+/CD103^+$ T-cell clone H32-8, untreated (vehicle control) or pretreated with saracatinib,

was stimulated with immobilized rE-cadherin-Fc (E-cadh-Fc), and then protein extracts were analyzed by western blot using anti-phospho-Pxn, anti-Pxn or anti-F-actin mAb. *Right panel*: Normalization of phospho-Pxn relative to total Pxn. Data shown are from three independent experiments. *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.001$. **D.** Interaction of CD103 with E-cadherin triggers phosphorylation of Pyk2, which is inhibited by saracatinib. The CD8⁺/CD103⁺ T-cell clone H32-8, untreated (vehicle) or pretreated with saracatinib, was stimulated with plastic-bound rE-cadherin-Fc and then protein extracts were analyzed by western blot using anti-phospho-Pyk2, anti-Pyk2 or anti-F-actin mAb. *Right panel*: Normalization of phospho-Pyk2 relative to total Pyk2. Data shown are from three independent experiments. *, $p < 0.05$.

Figure 3

Pxn binds to the CD103 tail and controls CD103-dependent signaling and T_{RM} functions.

A. Cytotoxicity of CD8⁺/CD103⁺ CTL clones toward specific tumor cells was inhibited with saracatinib (Sara). Heu171 and H32-8 (CD103⁺/LFA-1⁺) CTL clones were untreated (vehicle control) or pretreated with saracatinib; then, cytotoxicity toward autologous IGR-Heu (E-cadherin⁺/ICAM-1⁻) tumor cells was measured by a chromium release assay. **B.** Polarization of CD103 at the IS is inhibited by saracatinib and shRNA targeting Pxn. The H32-8 T-cell clone, untreated or pretreated with saracatinib or infected with sh-pxn-1 or sh-pxn-2, was co-cultured with autologous IGR-Heu target cells and then CD103 relocalization at the IS was analyzed by confocal microscopy. Vehicle alone and sh-scrambled (sh-scram) were used as negative controls, respectively. *Right panel*: CD103 fluorescence intensity (FI) fold increase at the IS with target cells (n=40). Red horizontal lines correspond to the mean fold increase \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses are from two independent experiments. Bars, 5 μ m. ***, $p < 0.0001$. **C.** Pxn binds to the α_E subunit tail. Protein extracts from the CD8⁺/CD103⁺H32-8 clone, stimulated with immobilized rE-cadherin-Fc for 30 min, were immunoprecipitated (IP) using anti-CD103 mAb and then immunoblotted (WB) with anti-Pxn. An IgG negative control was included. *Right panel*: Protein extracts from the CD8⁺/CD103⁺ T-cell clone, stimulated with plastic-bound rE-cadherin-Fc, were immunoprecipitated (IP) by anti-Pxnm Ab and then immunoblotted (WB) with anti-CD103.

Figure 4

The α_E subunit cytoplasmic tail is required for CD103 integrin signaling. **A.** Integrin *ITGAE*-GFP constructs encoding WT-CD103-GFP fusion protein or mutated-CD103-GFP fusion proteins containing either deletions (CD103- Δ 1, CD103- Δ 2 and CD103- Δ 3) or punctual

mutations (CD103-Y1156A, CD103-S1163A, CD103-Y1156A/S1163A and CD103-S1163D) in the α_E subunit cytoplasmic domain. In the $\Delta 1$ construct, the entire cytoplasmic tail was deleted except for the juxtamembrane “GFFKR” domain. In the $\Delta 2$ construct, 6 aa containing Tyr¹¹⁵⁶ were added compared to $\Delta 1$ and 8 supplementary aa with Ser¹¹⁶³ were added in $\Delta 3$ as compared to $\Delta 2$. In the CD103-Y1156A construct, Tyr¹¹⁵⁶ was substituted by an Ala; in CD103-S1163A, Ser¹¹⁶³ was replaced by an Ala, and, in CD103-Y1156A/S1163A, both Tyr¹¹⁵⁶ and Ser¹¹⁶³ were substituted by Ala. In the CD103-S1163D construct, Ser¹¹⁶³ was replaced by Asp to mimic phosphorylation. **B.** Effects of CD103 cytoplasmic domain deletions on integrin and lysosome polarization. The α_E^-/b_7^+ JTag T-cell clone was transfected with WT-CD103-GFP or CD103- $\Delta 1$, - $\Delta 2$ or - $\Delta 3$ constructs, and then relocalization of CD103 or lysotracker at the contact zone with rE-cadherin-Fc-coated beads was analyzed by confocal microscopy. *Right panel:* CD103 and lysosome fluorescence intensity (FI) fold increase at the contact area with rE-cadherin-Fc-coated beads (n=30). Red and black horizontal lines correspond to mean fold increase \pm SEM. Data from three independent experiments were quantified. Bars 5 μ m. ***, p<0.0001. **C.** Effect of CD103 cytoplasmic domain substitutions on integrin and lysosome polarization. JTag cells were transfected with WT-CD103-GFP, CD103-Y1156A, CD103-S1163A, CD103-Y1156A/S1163A or CD103-S1163D constructs, and then relocalization of CD103 or the lysotracker at the contact zone with rE-cadherin-Fc-coated beads was analyzed. *Right panel:* CD103 and lysosome FI fold increase at the contact zone with rE-cadherin-Fc-coated beads (n=30). Red and black horizontal lines correspond to the mean fold increase \pm SEM. Data are from three independent experiments. Bars 5 μ m. ***, p<0.0001. **D.** Polarization of Pxn at the contact area with rE-cadherin-Fc-coated beads. JTag cells were transfected with CD103-WT or CD103- $\Delta 2$, CD103- $\Delta 3$, CD103-S1163A or CD103-S1163D constructs, and then relocalization of Pxn at the contact zone with rE-cadherin-Fc-coated beads was analyzed. *Right panel:* Pxn FI fold increase at the IS with rE-cadherin Fc-coated beads (n=30). Red horizontal lines correspond to the mean fold increase \pm SEM. Data from three independent experiments were quantified. Bars 5 μ m. ***, p<0.0001.

Supplementary figure legends

Supplementary Figure 1

Saracatinib and sh-RNA targeting Pxn compromise CD8⁺/CD103⁺ T-cell adhesion and spreading on rE-cadherin-Fc. **A.** Adhesion to plate-bound rE-cadherin-Fc of the CD8⁺/CD103⁺Heu171T cell clone, untreated (DMSO vehicle control) or pretreated with saracatinib (Sara). *Right panel:* Mean numbers of adherent lymphocytes per field. Statistical analyses are from 3 independent experiments. Bars, 100 μm; ***, p<0.0001; *, p<0.01.

B. Migratory behavior of CD8⁺/CD103⁺ CTL on the rE-cadherin-Fc monolayer. The CD8⁺/CD103⁺ Heu171 T-cell clone, untreated (vehicle control) or pretreated with saracatinib, was seeded on immobilized rE-cadherin-Fc and then cell shape was monitored. Polymerized F-actin was visualized with rhodamine phalloidin. *Right panel:* Mean T-cell shape index. Statistical analyses are from 3 independent experiments. Bars, 5 μm, ***, p<0.0001. **C.** Sh-pxn-1 and sh-pxn-2 inhibit Pxn expression and compromise CD8⁺/CD103⁺ T-cell adhesion to the rE-cadherin-Fc monolayer. Sh-pxn-1 and sh-pxn-2 reduce expression of Pxn in CD8⁺/CD103⁺ T cells generated from healthy donor PBL stimulated with a combination of plate-coated anti-CD3 mAb (UCHT1 at 5 ng/ml) and rTGF-β (5 ng/ml; Abcys). Sh-scrambled (sh-scram) was used as a negative control. *Right panel:* Normalization of Pxn relative to F-actin. Data shown correspond to one representative experiment out of two. **D.** Sh-pxn-1 and sh-pxn-2 inhibit adhesion to a rE-cadherin-Fc monolayer of CD8⁺/CD103⁺ T cells generated from healthy donor PBL as in A. *Right panel:* Mean numbers of adherent lymphocytes per field. Statistical analyses are from 3 independent experiments. Bars, 100 μm, ***, p<0.0001.

Supplementary Figure 2

T-cell treatment with saracatinib or infection with shRNA targeting Pxn does not alter cell viability or cell surface protein expression levels. **A.** CD8⁺/CD103⁺ T-cell clone H32-8 and freshly isolated tumor TIL were treated for 4 h with saracatinib (Sara at 1 μM); then, dead cells were evaluated by flow cytometry using an annexin V (AV)-FITC apoptosis detection kit and propidium iodide (PI) labeling. **B.** Infection of the CTL clone with shRNA targeting Pxn does not alter cell viability. The H32-8 T-cell clone was transduced with sh-pxn-1 or sh-pxn-2 and living cells were then detected by flow cytometry using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) labeling. Sh-scrambled (sh-scram) was used as a negative control. **C.** Treatment of the CTL clone with saracatinib does not alter surface protein expression levels. The H32-8 T-cell clone was treated for 4 h with saracatinib; then, lymphocytes were analyzed for CD3, CD8 and CD103 expression by flow cytometry. Percentages of positive

cells are indicated. Numbers in parentheses correspond to mean fluorescence intensity (MFI). **D.** Infection of the CTL clone with shRNA targeting Pxn does not alter cell surface protein expression levels. H32-8 T cells were infected with sh-pxn-1, sh-pxn-2 or a sh-scrambled negative control; then, lymphocytes were analyzed for CD3, CD8 and CD103 expression by flow cytometry. Percentages of positive cells are indicated. Numbers in parentheses correspond to MFI.

Supplementary Figure 3

Transfection of the α_E^-/b_7^+ JTag T-cell clone with CD103-GFP constructs. **A.** Selection of the α_E^-/b_7^+ JTag T-cell clone. The CD4⁺ JTag T-cell line was cloned by limiting dilution, and a T-cell clone was selected by flow cytometry for expression of the integrin b₇ chain, but not the α_E chain. *Left panel:* Integrin α_E chain surface expression analysis (gray fill). *Right panel:* Surface expression of the integrin b₇ subunit (gray fill). An isotopic control mAb was included (white fill). Percentages of positive cells are indicated. **B.** Expression of GFP and CD103 integrin on JTag cells transfected with α_E -GFP constructs. The α_E^-/b_7^+ JTag T-cell clone was transfected with CD103-WT-GFP fusion protein or mutated-CD103-GFP fusion proteins (CD103- Δ 1, CD103- Δ 2 and CD103- Δ 3 deletions, and CD103-Y1156A, CD103-S1163A, CD103-Y1156A/S1163A and CD103-S1163D point mutations) and sorted for GFP expression by the *BD Influx™ cell sorter (BD Biosciences)*. *Left panels:* Surface expression of GFP was determined by flow cytometry (black or colored fill). Non-transfected cells were included as a negative control (gray fill). Numbers in parentheses are GFP mean fluorescence intensity (MFI). *Right panels:* Surface expression of CD103 among GFP⁺ cells (black or colored fill). Percentage of CD103⁺ T cells among GFP⁺ cells is indicated; numbers in parentheses are CD103 MFI. **C.** CD103-transfected JTag cells display similar capacity to adhere to immobilized rE-cadherin-Fc. The α_E^-/b_7^+ JTag T cells were transfected with CD103-WT-GFP or mutated-CD103-GFP (CD103- Δ 1, CD103- Δ 2, CD103- Δ 3, CD103-Y1156A, CD103-S1163A, CD103-Y1156A/S1163A and CD103-S1163D), sorted for GFP expression; then, adhesion to immobilized rE-cadherin-Fc was analyzed by confocal microscopy. **D.** CD103-transfected JTag cells display similar capacity to form conjugates with rE-cadherin Fc-coated beads. The α_E^-/b_7^+ JTag T cells were transfected with CD103-WT-GFP or mutated-CD103-GFP (CD103- Δ 1, CD103- Δ 2, CD103- Δ 3, CD103-Y1156A, CD103-S1163A, CD103-Y1156A/S1163A and CD103-S1163D), sorted for GFP expression, and then analyzed for their capacity to form conjugates with rE-cadherin Fc-coated beads.

Supplementary Figure 4

The α_E cytoplasmic tail is required for Pxn-dependent CD103 polarization and CD103-mediated early T-cell signaling. **A.** Saracatinib (Sara) inhibits CD103 polarization at the contact area of CD103-transduced JTag cells with rE-cadherin-Fc-coated beads. The α_E^-/b_7^+ JTag T cells were transfected with the CD103-WT construct; GFP-positive T cells were sorted and then either kept untreated (DMSO vehicle) or treated with saracatinib. Next, relocalization of CD103 at the contact zone with rE-cadherin-Fc-coated beads was analyzed by confocal microscopy. *Right panel:* CD103 fluorescence intensity (FI) fold increase at the contact area with rE-cadherin-Fc-coated beads (n=30). Red horizontal lines correspond to mean fold increase \pm standard error of the mean (SEM). Data from three independent experiments were quantified. Bars, 5 μ m. ****, p<0.00001. **B.** The CD103-ESIRKAQL cytoplasmic domain is necessary for integrin-dependent early T-cell signaling. JTag T cells were transfected with CD103-WT, CD103- Δ 2, CD103- Δ 3, CD103-S1163A or CD103-S1163D fusion proteins, loaded with a Fura-2 probe and stimulated at 60 s with a combination of rE-cadherin-Fc plus low doses of anti-CD3-coated beads. T cells transfected with CD103-WT and stimulated with low doses of anti-CD3 mAb alone were included as a negative control. Intensity of calcium responses is represented in pseudo-colors from blue to white. Calcium response was calculated from the fluorescence [340/380] ratios (*lower panel*). Data are from three independent experiments. Bars: 30 μ m. ***, p<0.0001.

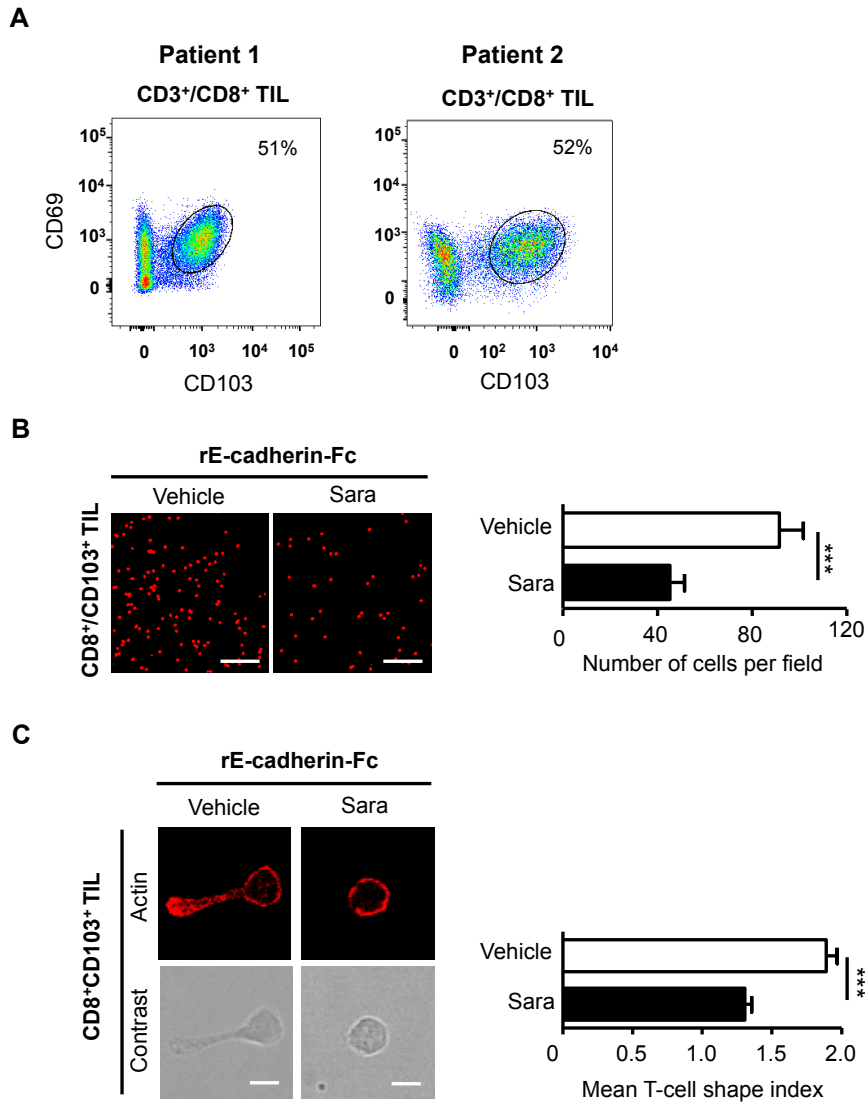


Figure 1

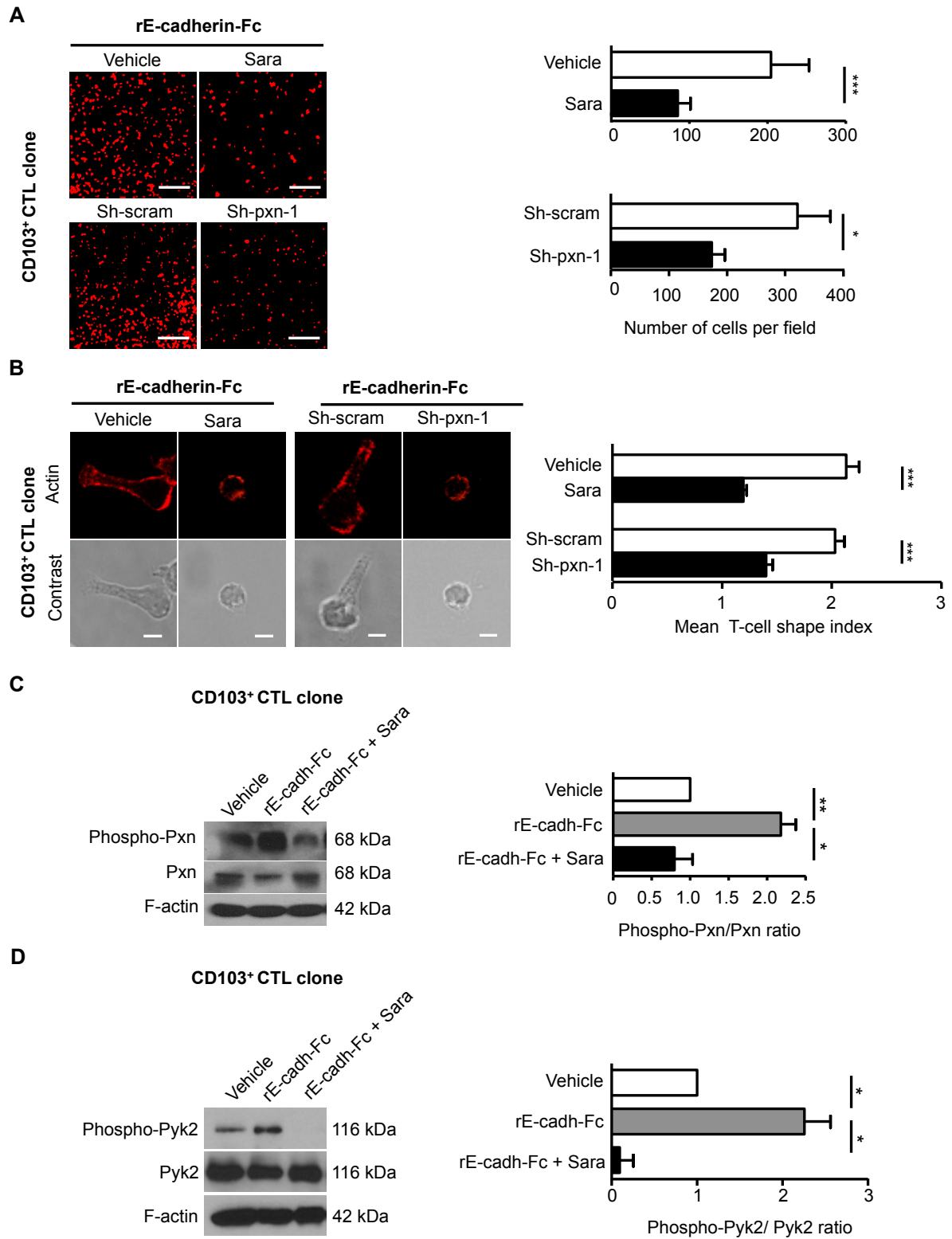


Figure 2

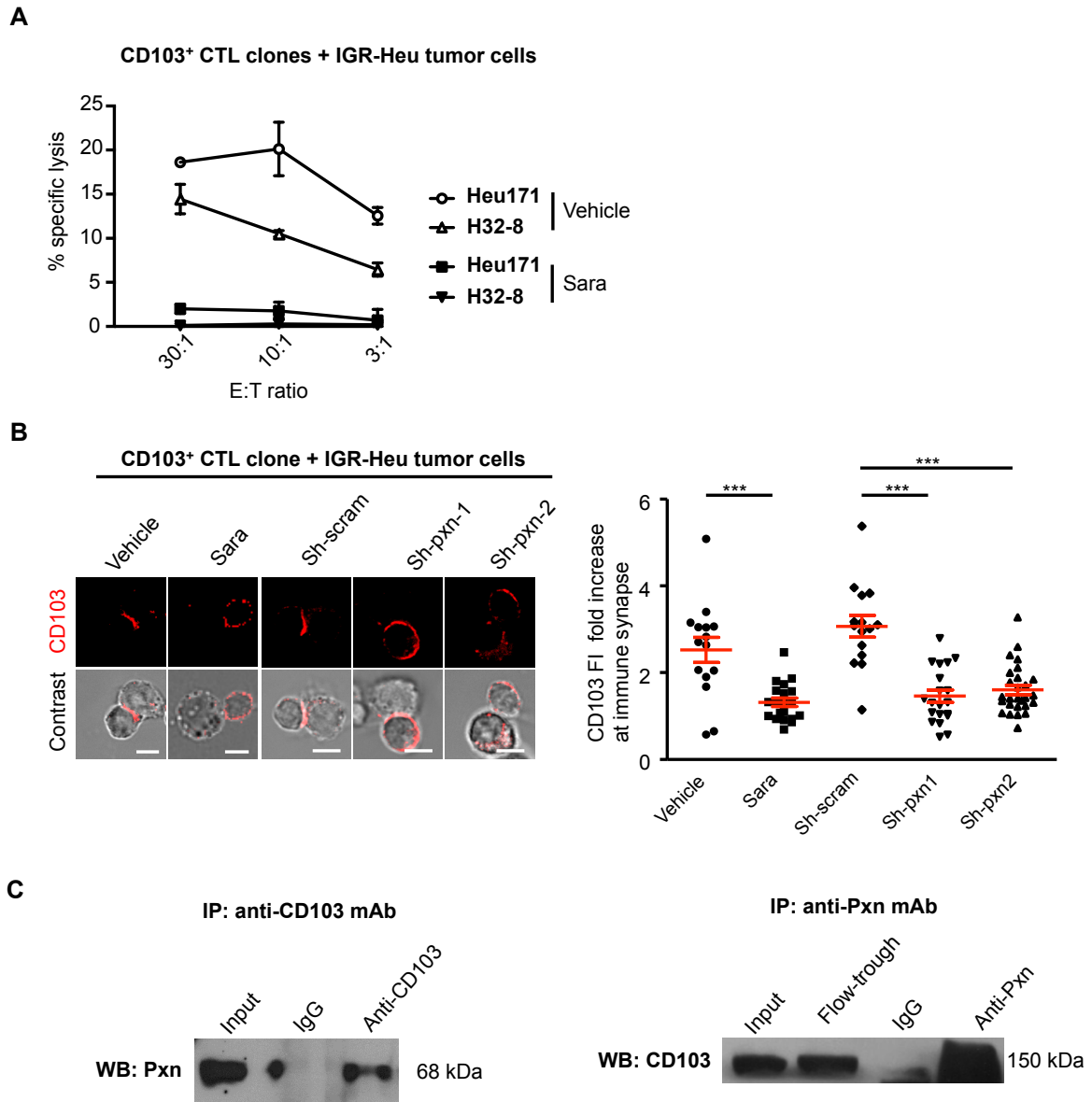


Figure 3

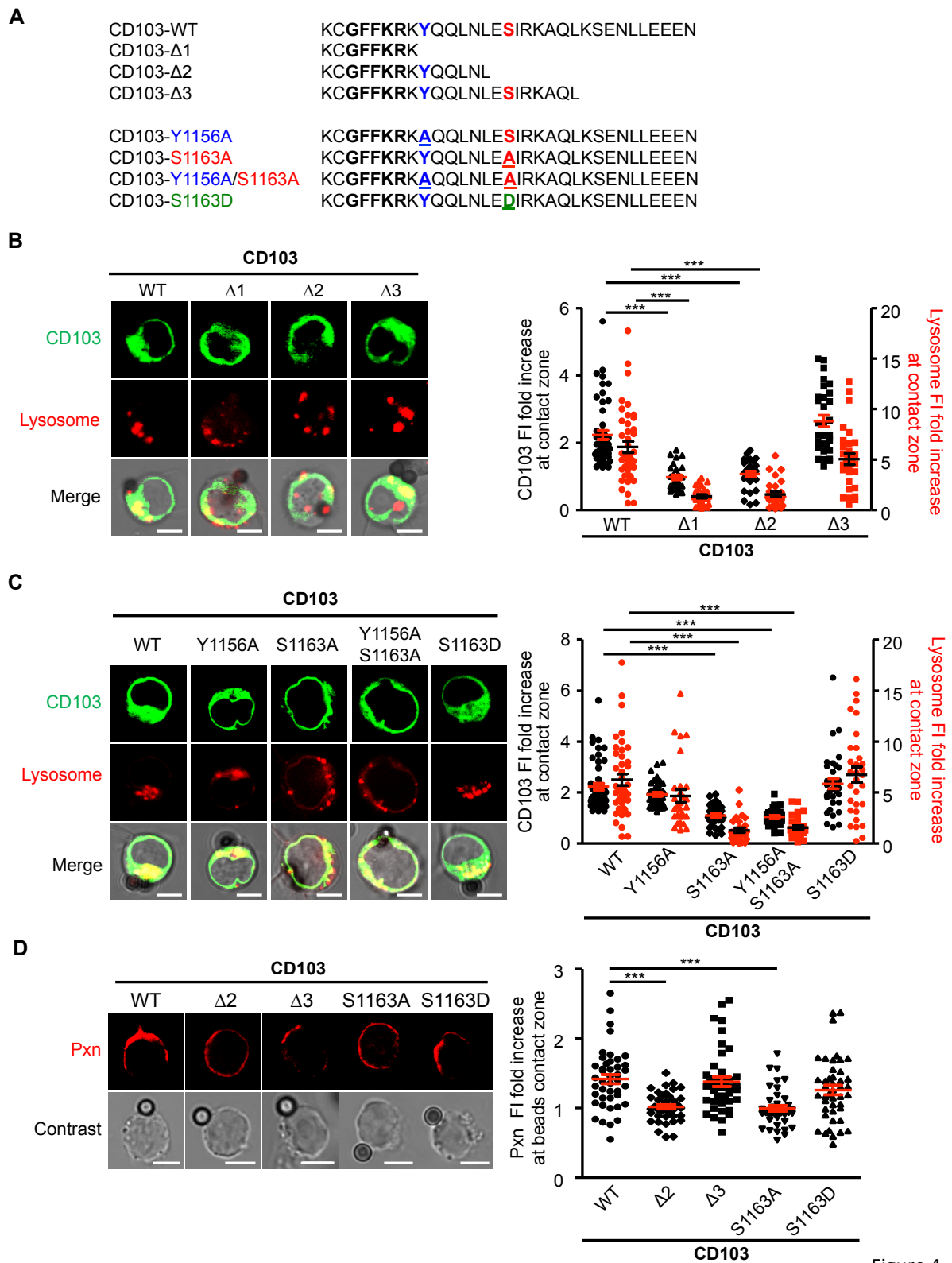
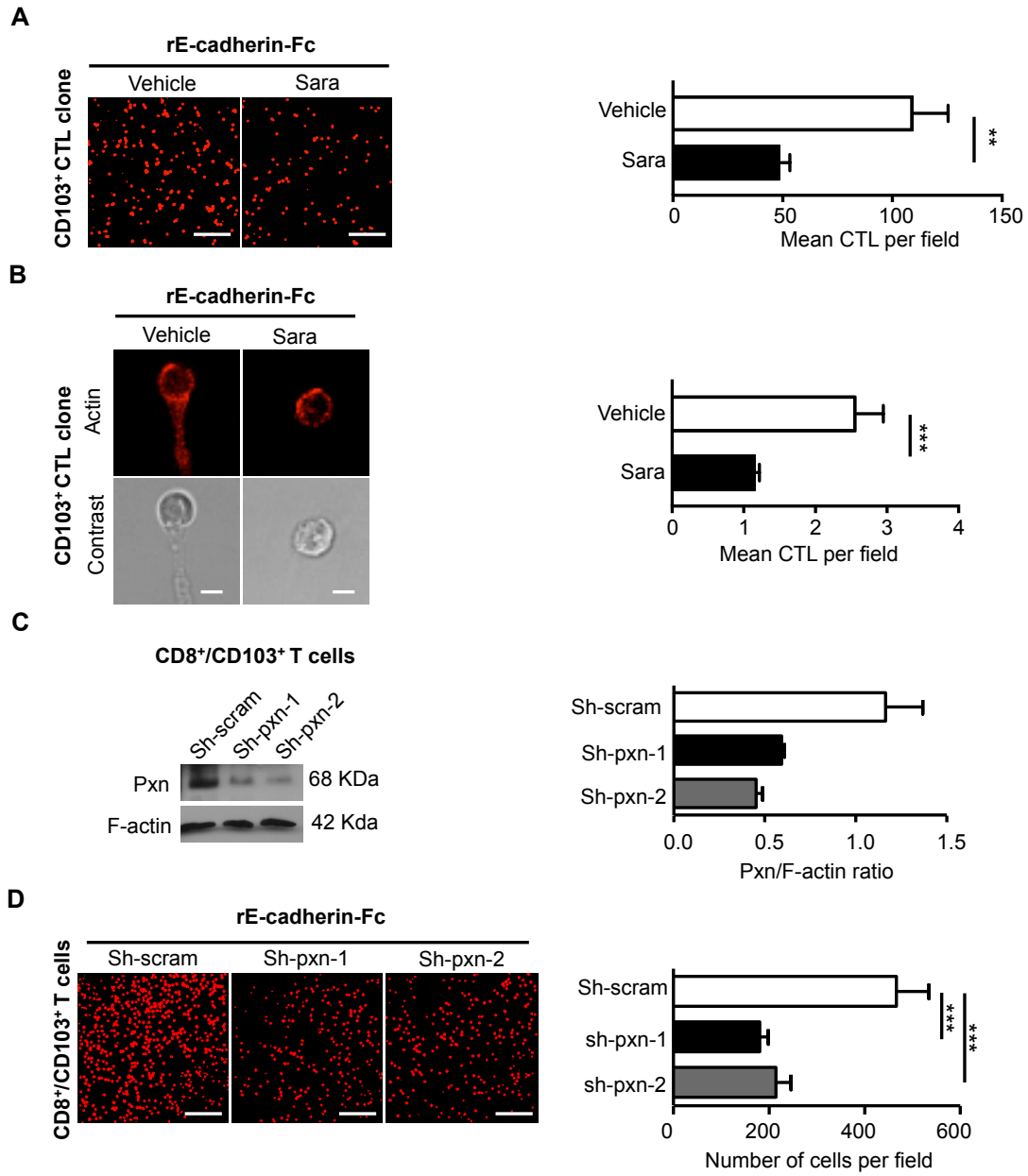
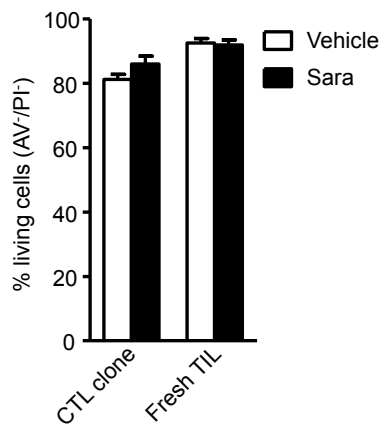
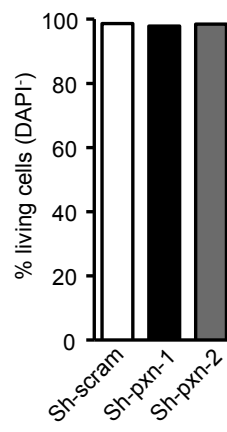
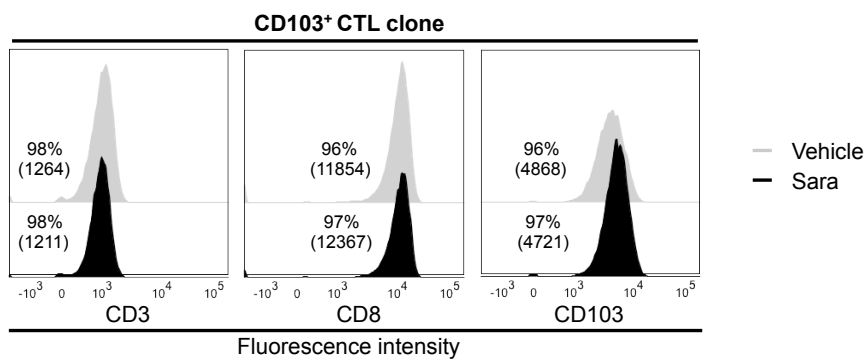
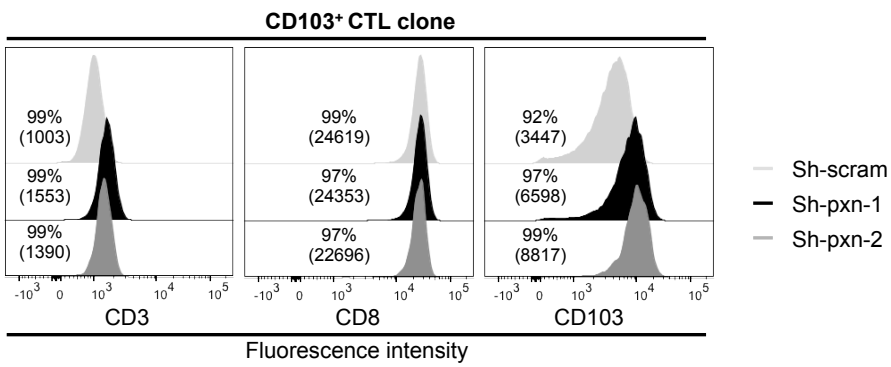


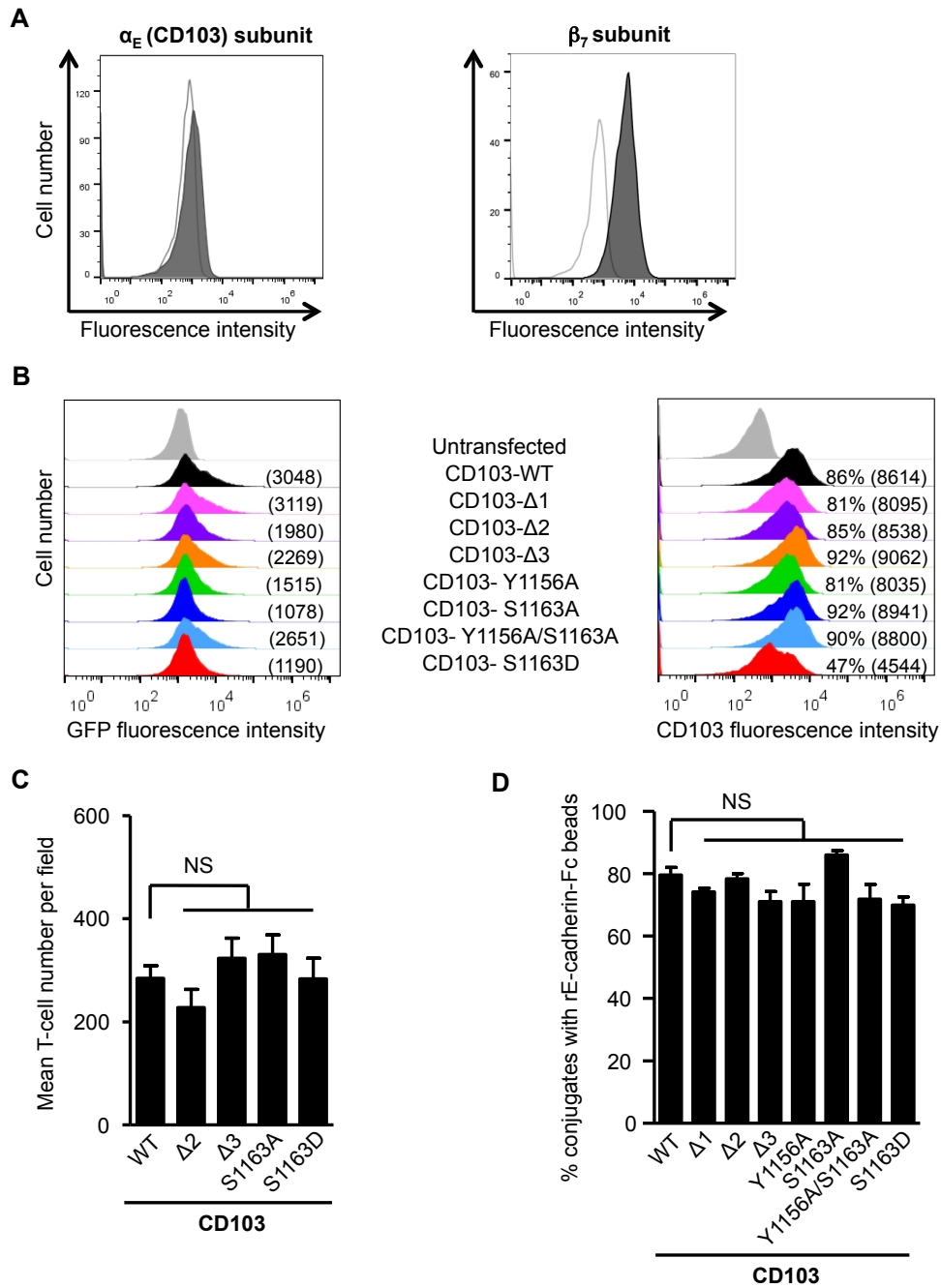
Figure 4



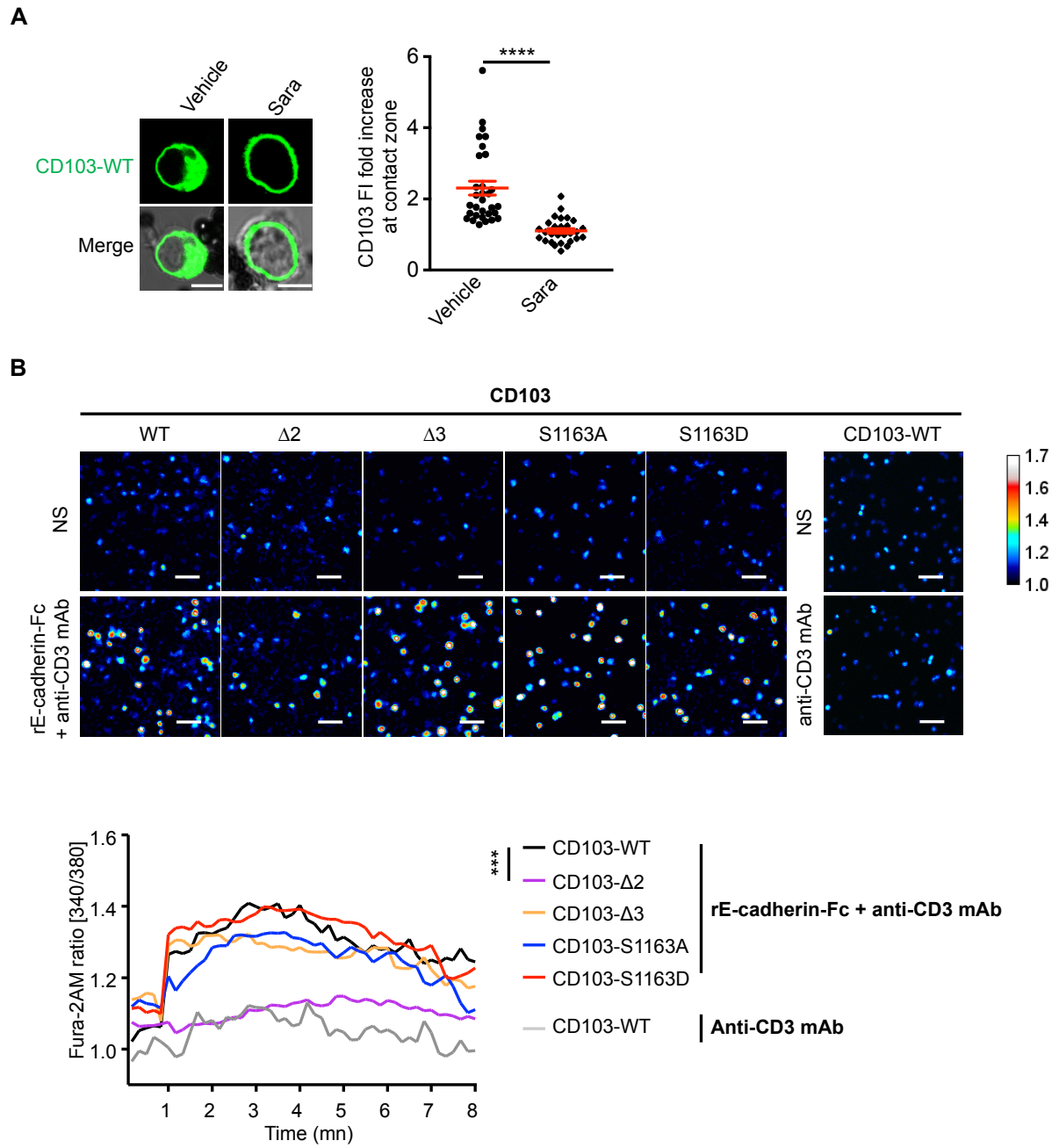
Supplementary Figure 1

A**B****C****D**

Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4

DISCUSSION

DISCUSSION

Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer dans le monde chez les hommes, et la seconde chez les femmes (Jemal et al., 2011). Le cancer bronchique a longtemps été considéré comme non-immunogénique, mais des régressions spontanées ont été observées (Gladwish et al., 2010). De plus, des études récentes ont montré que l'infiltrat immunitaire était de bon pronostic (Kilic et al., 2011; Ruffini et al., 2009). Cependant, l'expression des *checkpoints* CTLA-4 et PD-1 compromet l'activation des lymphocytes T et permet à la tumeur d'échapper au système immunitaire. De ce fait, les traitements antitumoraux ont largement évolué durant la dernière décennie. En plus du trépied thérapeutique classique qui comprend la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie, l'immunothérapie prend aujourd'hui une place considérable dans les options de traitements. Aux côtés de la vaccination thérapeutique, des thérapies ciblées et du transfert adoptif de lymphocytes T activés, on trouve les inhibiteurs de *checkpoints* tels que les anti-PD-1 ou anti-CTLA-4. Ces anticorps bloquants sont apparus comme un traitement efficace pour les patients atteints de mélanome, cancer rénal ou de lymphomes hodgkinien (Ott et al., 2013). Dans le cas du cancer bronchique, les anti-PD- ou anti-PD-L1 ont été approuvés dans le traitement de certains sous-groupes de patients présentant un CBNPC avancé. Il a été montré récemment que l'efficacité d'un anti-PD-1, utilisé en première intention chez des patients atteints de cancer du poumon et exprimant PD-1, est supérieur à la chimiothérapie. La survie globale est augmentée de 54% à 70% et le risque de progression est réduit de moitié (Reck et al., 2016). Cependant, encore de nombreux patients ne répondent pas à ces traitements. Ainsi, bien que l'infiltration des tumeurs par les CTL soit un bon marqueur de survie, la formation de métastases et la faible survie à 5 ans des patients indiquent un défaut du contrôle de la tumeur par le système immunitaire. Il est donc primordial de mieux caractériser la réponse antitumorale liée aux lymphocytes T afin de l'optimiser et d'améliorer les approches immunothérapeutiques actuelles. De ce fait, l'étude des mécanismes moléculaires mis en place par les CTL constitue un enjeu important dans le développement de nouvelles thérapies.

Dans ce contexte, l'objectif majeur de cette étude est d'étudier la signalisation de l'intégrine CD103, exprimée à la surface des TIL CD8⁺, dans un modèle de CBNPC, afin de permettre une meilleure compréhension des mécanismes de costimulation et d'optimiser la réponse antitumorale. Afin d'induire la lyse de la cellule cible, deux signaux sont nécessaires pour que les CTL polarisent et sécrètent leurs GC : l'engagement du TCR et de corécepteurs

activateurs. Ces derniers peuvent notamment être fournis par les intégrines. De nombreux travaux ont montré le rôle costimulateur de l'engagement de l'intégrine LFA-1 avec son ligand ICAM-1 (Anikeeva et al., 2005; Graf et al., 2007). En effet, l'engagement conjoint du TCR et de LFA-1 induit notamment la prolifération lymphocytaire, le *spreading*, et la cytotoxicité (Dustin and Springer, 1989; Lek et al., 2013). Dans la tumeur, ICAM-1 est souvent modulé négativement, notamment par le TGF- β et la pression exercée par le système immunitaire, et est donc faiblement exprimé dans les CBNPC (Passlick et al., 1996). Ainsi, la présence de CD103 et de son ligand peut permettre la costimulation du signal TCR nécessaire dans la cytotoxicité à médiation cellulaire. Notre équipe a montré que la polarisation des GC à la synapse est observée après engagement de CD103 avec la E-cadhérine. Leur exocytose nécessite cependant l'engagement simultané du TCR (Le Floc'h et al., 2011). Par ailleurs, comme les autres intégrines, CD103 joue un rôle essentiel dans le recrutement et la rétention des CTL dans les îlots tumoraux (Boutet et al., 2016; Zhang and Bevan, 2013). CD103, avec entre autre CD69 et CD49a, est un des marqueurs des T_{RM}. Cette sous-population de lymphocytes T CD8⁺ mémoire réside dans les tissus périphériques non lymphoïdes, tels que le poumon, l'intestin ou la peau, après une infection virale. Ces cellules T_{RM} sont capables de fournir une protection immédiate contre les infections virales persistantes (Mackay et al., 2012; Piet et al., 2011). Par ailleurs, plusieurs preuves expérimentales indiquent que les T_{RM} CD8⁺CD103⁺ jouent un rôle primordial dans l'immunité antitumorale. Une corrélation entre l'infiltration des lymphocytes T CD103⁺ et la survie des patients a été établie dans les cancers de l'ovaire, du poumon et du sein (Djenidi et al., 2015; Wang et al., 2016; Webb et al., 2014). Ainsi, l'étude de la signalisation CD103 peut permettre de contribuer à l'activation de cette population.

Les intégrines sont présentes à la surface membranaire des leucocytes dans un état inactif, permettant aux cellules de circuler librement dans le sang sans interagir avec les cellules endothéliales. La stimulation du TCR ou d'un récepteur aux chimiokines permet d'initier la signalisation *inside-out* de l'intégrine et de modifier sa conformation en augmentant l'affinité pour son ligand. Elle peut alors fixer son ou ses ligands extracellulaires et réguler de nombreux processus suite au déclenchement de la signalisation *outside-in*, dont l'adhérence et les fonctions effectrices des CTL. De nombreux travaux ont permis d'élucider les voies de signalisation en amont et en aval de LFA-1. Cependant, peu d'études ont été réalisées concernant la signalisation de l'intégrine CD103. Notre équipe a montré précédemment que les protéines ERK1/2 et PLC γ 1 sont essentielles à la lyse des cellules

tumorales par les CTL CD103⁺. De plus, l'engagement seul de CD103 avec la E-cadhérine suffit pour induire la phosphorylation des protéines ERK1/2 et PLC γ 1 (Le Floc'h et al., 2011).

1. Implication de la paxilline dans la signalisation de CD103

Afin d'étudier plus finement la signalisation de CD103, je me suis intéressée au lien entre l'intégrine et la paxilline, une protéine appartenant aux points d'adhésion focaux. Il est connu que la paxilline est impliquée dans la signalisation des intégrines, notamment de LFA-1 (Hashimoto-Tane and Saito, 2016; Robertson and Ostergaard, 2011). Elle permet le recrutement de protéines régulatrices et structurales afin de moduler l'adhésion, par l'assemblage et le désassemblage des complexes d'adhésion focaux ainsi que par la réorganisation du cytosquelette (Shortrede et al., 2016). Ainsi, la paxilline intervient dans les fonctions d'adhérence et de *spreading* des cellules (Hu et al., 2014). Par ailleurs, l'intégrine CD103 confère des propriétés d'adhérence et de *spreading* des lymphocytes T murins ou humains (Boutet et al., 2016; Schlickum et al., 2008). Mes travaux ont montré que la paxilline intervient aussi dans l'adhésion et le *spreading* dépendant de CD103. En effet, son inhibition dans les lymphocytes T CD8⁺CD103⁺ conduit à une forte diminution de ces fonctions, suite à l'interaction de CD103 avec la E-cadhérine. L'ensemble de ces données suggère un lien avec les protéines du cytosquelette et il serait intéressant de déterminer l'implication des protéines faisant le lien entre l'intégrine et le cytosquelette, telles que la taline et la vinculine dans la signalisation de CD103.

Par ailleurs, nos résultats indiquent que la stimulation des lymphocytes T CD8⁺CD103⁺ par la E-cadhérine induit une phosphorylation de la paxilline, mais aussi de Pyk2. Il a été décrit que ces deux protéines sont retrouvées dans l'anneau périphérique des microclusters de TCR, des structures semblables à la SI, bien qu'environ 10 fois plus petites, et sont impliquées dans l'activation des lymphocytes T (Hashimoto-Tane and Saito, 2016). De plus, l'inhibition de Pyk2 conduit à un défaut d'adhésion des lymphocytes T CD8⁺ *via* LFA-1 et de costimulation du signal TCR (Beinke et al., 2010). La diminution conjointe de l'expression de la paxilline et de Pyk2 conduit à une détérioration de la formation des microclusters de TCR, de la phosphorylation des molécules de signalisation ainsi que de la production d'IL-2. Ces résultats indiquent l'implication de la paxilline et de Pyk2 dans l'adhésion et la formation de microclusters qui sont essentiels à l'activation des lymphocytes T. Par ailleurs, il a été montré que l'association de la paxilline avec la chaîne α_4 des intégrines conduit à la phosphorylation

de Pyk2 et/ou FAK. Ce signal est requis pour la transrégulation de LFA-1 par $\alpha_4\beta_1$ (Rose 2003). Ainsi, il serait intéressant de déterminer si, dans notre modèle, l'association de la paxilline avec la chaîne α_E entraînant le recrutement et la phosphorylation de Pyk2, est responsable de la stimulation de LFA-1.

Les récents travaux de l'équipe ont pu montrer que l'engagement du TCR et de CD103 permet la relocalisation et l'exocytose des GC. Par ailleurs, il a été décrit que le complexe ILK/Pyk2/paxilline est nécessaire à la polarisation des GC dans un contexte dépendant de LFA-1 (Zhang et al., 2014). L'ILK, impliquée à la fois dans la signalisation *inside-out* et *outside-in* des intégrines, interagit avec CD103 suite à la fixation du TGF- β sur son récepteur conduisant à la phosphorylation d'AKT qui initie alors la signalisation *inside-out* (Boutet et al., 2016). Dans ce contexte, il n'est pas exclu qu'un complexe ILK/Pyk2/paxilline soit formé suite à l'engagement de CD103 et que celui-ci soit nécessaire pour la relocalisation des GC à la SI.

La paxilline peut se lier aux chaînes β_1 , β_4 et β_9 mais aussi à la chaîne α_4 des intégrines (Goldfinger et al., 2003; Han et al., 2001; Liu and Ginsberg, 2000; Rose et al., 2003; Tanaka et al., 1996). La coimmunoprécipitation de l'intégrine β_1 entraîne un complexe contenant à la fois la paxilline et les kinases FAK et Fyn (Chen et al., 2000). Nos résultats indiquent que la paxilline est retrouvée dans le complexe protéique coimmunoprécipité avec CD103. Ainsi, il serait intéressant de déterminer si les autres composants du complexe, notamment si les protéines Src, FAK et Pyk2 en font également partie.

2. Étude du domaine cytoplasmique de CD103 et de son implication dans la signalisation *outside-in* de l'intégrine

Des signaux, provenant de l'engagement du TCR ou de récepteurs aux chimiokines, sont nécessaires pour déclencher la voie *inside-out* des intégrines et conduire à des changements conformationnels, où les sous-unités α et β des intégrines vont se séparer, permettant la reconnaissance du ligand. Plusieurs études des queues cytoplasmiques des intégrines ont été réalisées, indiquant que le motif juxtamembranaire GFFKR de la chaîne α est impliqué dans l'activation des intégrines. La délétion de ce motif, ou de toute la partie cytoplasmique des intégrines, entraîne l'activation constitutive des intégrines. Les délétions du domaine cytoplasmique qui conservent la séquence GFFKR conduisent à la perte d'activation de l'intégrine (Lu and Springer, 1997; O'Toole et al., 1994; O'Toole et al., 1991). Les

constructions utilisées dans notre étude contiennent des délétions ou mutations ponctuelles du domaine cytoplasmique de la chaîne α_E , tout en conservant le motif GFFKR. Nos résultats montrent que les mutations de la partie cytoplasmique de la sous-unité α_E ne perturbent pas l'interaction avec la E-cadhérine. Ces résultats sont en accord avec les travaux déjà publiés démontrant que seules les mutations dans le domaine extracellulaire ou juxtamembranaire aboutissent à un défaut de reconnaissance du ligand (Schaffner-Reckinger et al., 1998).

Nos résultats démontrent aussi que la sérine 1163, acide aminé phosphorylable, du domaine cytoplasmique de la chaîne α_E , est impliquée dans la signalisation *outside-in* de CD103. Plusieurs études indiquent que les queues cytoplasmiques des intégrines peuvent être phosphorylées. L'intégrine β_3 , par exemple, peut être phosphorylée sur la tyrosine 747. Cette phosphorylation conduit à la fixation préférentielle de la taline, par rapport à Dok1, un régulateur négatif des intégrines, permettant ainsi le contrôle de l'activation de l'intégrine (Oxley et al., 2008). Par ailleurs, le domaine cytoplasmique de la sous-unité α_4 , chaîne pouvant se lier à la β_7 , peut aussi être phosphorylé sur la sérine 988, régulant la fixation réversible de la paxilline et permettant la migration optimale des cellules (Han et al., 2003). Nos travaux indiquent que la chaîne α_E semble quant à elle phosphorylée sur la sérine 1163. En effet, la mutation de cet acide aminé en alanine bloque le *clustering* de CD103 ainsi que la polarisation de la paxilline après engagement avec la E-cadhérine. De plus, les cellules exprimant la chaîne contenant une mutation mimant une phosphorylation constitutive en position 1163 polarisent fortement l'intégrine et la paxilline à la zone de contact avec la E-cadhérine. Il serait intéressant de déterminer par immunoprécipitation si la présence du domaine ESIRKAQL ou de la sérine en position 1163, permet l'interaction avec la paxilline. De même, le rôle de la dynamique de la phosphorylation dans la migration et le *spreading* des lymphocytes T restent à étudier.

Nous avons observé que la relocalisation des lysosomes suit celles de CD103 et de la paxilline. À l'instar des GC dans les lymphocytes T CD8⁺, la polarisation des lysosomes dans les lymphocytes T CD4⁺ est observée dans la SI avec la CPA spécifique (Shen et al., 2006). De plus, dans le modèle de Jurkat-TAg utilisé dans notre étude, la stimulation avec la E-cadhérine suffit pour induire la relocalisation des lysosomes. Des résultats précédents de l'équipe indiquent que, dans un modèle de clones T, l'engagement de l'intégrine suffit à induire la polarisation des GC, bien que l'engagement du TCR soit nécessaire pour leur exocytose (Le Floc'h et al., 2011). Il est donc envisageable que dans un modèle de lymphocytes T CD8⁺, la sérine 1163 soit nécessaire à la polarisation des GC, et donc de

l'initiation de la lyse de la cellule cible. Ainsi, la phosphorylation de la sérine 1163 semble être impliquée dans la signalisation *outside-in* de CD103, confirmant que cette intégrine est une molécule de signalisation à part entière.

Par ailleurs, une étude a montré que plusieurs isoformes de la PKC étaient capables de phosphoryler les sérines et thréonines du domaine cytoplasmique de la chaîne β_2 (Fagerholm et al., 2002). Cependant, une autre étude propose que la PKC a uniquement un effet indirect sur la phosphorylation des intégrines α_3 et α_6 (Zhang et al., 2001). Ainsi, il serait intéressant d'identifier la kinase impliquée dans la phosphorylation de la sérine 1163, et notamment de déterminer si les PKC sont impliquées dans ce phénomène.

Nos résultats ont montré aussi que le déclenchement du flux calcique des cellules Jurkat-TAg transfectées nécessite la présence du domaine ESIRKAQL de CD103. De façon inattendue, la mutation ponctuelle de la sérine 1163 en alanine, qui inhibe la relocalisation de CD103, des lysosomes et de la paxilline, n'affecte pas la réponse calcique. Les conditions expérimentales utilisées pour déclencher le flux calcique sont différentes de celles utilisées pour la polarisation de CD103 et des lysosomes. En effet, une combinaison de E-cadhérine et d'Ac anti-CD3 à faible dose a été utilisée pour visualiser une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire. De plus, celle-ci est observée en un temps très court (inférieur à 1 min), contrairement à la relocalisation des organelles acides qui nécessite plus de temps (plus de 30 min). La dose d'Ac anti-CD3 utilisée étant très faible, l'engagement simultané de CD103 est nécessaire pour obtenir une augmentation de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire. En effet, à la même concentration, l'Ac anti-CD3 seul n'est pas suffisant pour induire le flux calcique. Après la stimulation du TCR, la PLC γ 1 est rapidement activée. Celle-ci permet de générer de l'IP3 et du DAG. Lors de l'engagement de CD103, les effets immédiats concernent la phosphorylation des protéines des points d'adhésion focaux (Src, FAK, paxilline), mais aussi la génération de PIP3 et PIP2, substrat de la PLC γ 1, menant aussi à la génération d'IP3 et de DAG. Il est envisageable que la stimulation conjointe des cellules par la E-cadhérine recombinante et l'anti-CD3 présents sur une même bille induit la génération d'IP3 qui va se fixer à son récepteur (RIP3) présent sur la membrane du réticulum endoplasmique, permettant la libération des stocks de Ca^{2+} dans le cytosol. L'absence de l'induction du flux calcique lors de délétion du motif intracellulaire ESIRKAQL suggère l'implication de cette séquence dans la costimulation du signal TCR, mimée ici par l'anticorps anti-CD3. Cependant, la

phosphorylation de la sérine 1163, bien que nécessaire pour la relocalisation de CD103 et des lysosomes, ne semble pas requise pour cette fonction.

Notre étude s'est portée sur la chaîne α_E , mais les sous-unités β peuvent aussi initier la signalisation *outside-in* des intégrines. Les motifs conservés NPXY et HDRK des chaînes β servent de point d'ancrage pour des protéines cytoplasmiques permettant d'initier diverses voies de signalisation. L'activation des PTK, notamment Src et Syk, est un évènement précoce lors de l'engagement des intégrines, telles que β_1 , β_2 et β_3 , qui entraîne une cascade de phosphorylation d'autres protéines, permettant l'activation des ERK ou PI3K par exemple (Baruzzi et al., 2010). Il est envisageable que l'engagement de l'intégrine $\alpha_E\beta_7$ conduise à l'activation des PTK, grâce à leur recrutement par la sous-unité β_7 , permettant la phosphorylation des protéines ERK1/2 et PLC γ 1. Par ailleurs, il a été montré que la chaîne β_7 peut interagir avec la filamine A (Travis et al., 2004), Dab1, Dok1, la taline et la tensine (Calderwood et al., 2003), bien qu'aucune donnée fonctionnelle de ces interactions ne soit décrite. La compréhension des mécanismes de régulation des hétérodimères α_E et β_7 passe aussi par l'étude de la signalisation et des interactions protéiques de la chaîne β_7 .

CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION GÉNÉRALE

Un des facteurs limitant le succès des immunothérapies actuelles est l'infiltration des CTL dans la tumeur, une étape nécessaire à la reconnaissance des cellules tumorales entraînant leur élimination. Les cellules T_{RM}, exprimant CD103, jouent un rôle essentiel dans l'immunité antitumorale et peuvent ainsi correspondre à des nouvelles cibles pour l'optimisation des immunothérapies anticancéreuses. L'intégrine CD103 est impliquée à la fois dans la rétention intraépithéliale des lymphocytes mais aussi dans la costimulation du signal TCR, nécessaire à cytotoxicité des CTL. L'objectif de ce travail a été de caractériser la signalisation de CD103, afin de permettre une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui se déroulent lors de la lyse des cellules cibles.

Dans un premier temps, nos résultats ont permis de montrer que la paxilline et Pyk2 font partie de la signalisation de CD103. En effet, la stimulation des CTL avec la E-cadhérine induit une augmentation rapide de la phosphorylation de ces deux protéines. De plus, des expériences de coimmunoprécipitation nous ont permis d'identifier la paxilline et CD103 dans le même complexe protéique. Par ailleurs, l'inhibition de la voie Src, dans les clones T mais aussi dans les T_{RM} isolés de prélèvements tumoraux frais, bloque la signalisation *outside-in* de CD103 en diminuant les capacités d'adhérence et de *spreading* des CTL, ainsi que leur cytotoxicité vis à vis des cellules tumorales autologues. De plus, l'inhibition de l'expression de la paxilline par des shRNA spécifiques, dans des modèles de clones T ou de PBL CD8⁺CD103⁺ induit grâce à une stimulation simultanée avec un Ac anti-CD3 et du TGF- β recombinant, conduit à une baisse de l'adhésion et du *spreading* des lymphocytes T. L'absence d'expression de la paxilline dans les CTL conduit aussi à une perte de la relocalisation de CD103 dans la SI formée avec des cellules tumorales autologues. Dans ces conditions, CD103 ne peut pas exercer son rôle costimulateur conduisant certainement à une diminution de la lyse spécifique des cellules cibles. L'ensemble de ces résultats démontre l'implication de la paxilline dans la signalisation de CD103.

Dans un second temps, l'étude des domaines cytoplasmiques de la chaîne α_E nous a permis de mieux comprendre les mécanismes de signalisation de l'intégrine. Différents mutants de la chaîne α_E , fusionnés à la GFP et transfectés dans les cellules Jurkat-TAg, nous ont permis de montrer que le domaine cytoplasmique de CD103 est nécessaire au *clustering* de l'intégrine et à l'activation des lymphocytes T. En effet, l'absence du motif ESIRKAQL conduit à un défaut d'activation cellulaire associé à un défaut de la réponse calcique lors de la

stimulation par un Ac anti-CD3 et la E-cadhérine recombinante. De plus, la mutation de la sérine 1163 en alanine conduit à une perte du *clustering* de CD103 après engagement avec la E-cadhérine. Dans ces conditions, les lysosomes ainsi que la paxilline ne sont plus polarisés à la zone de contact avec la E-cadhérine. À l'inverse, lorsque la phosphorylation constitutive de la sérine 1163 est mimée par une mutation en acide aspartique, la relocalisation de CD103, des lysosomes et de la paxilline est observée, indiquant que la phosphorylation de la sérine semble impliquée dans la signalisation de CD103.

Dans l'ensemble, ces résultats nous permettent de déterminer une partie des mécanismes de régulation et d'activation de CD103 (Figure 25), jusqu'à présent peu étudiés. Ceux-ci constituent une composante essentielle de la réponse cytotoxique antitumorale et correspondent à une cible thérapeutique potentielle pour les tumeurs épithéliales. Il a d'ores et déjà été montré que l'expression de CD103 est un facteur de bon pronostic dans plusieurs cancers, démontrant l'importance de l'intégrine et des $T_{RM} CD8^+CD103^+$ dans les mécanismes antitumoraux. Il est désormais important d'optimiser la réponse antitumorale des CTL, notamment dans le domaine du transfert adoptif de lymphocytes T et des immunothérapies, grâce à la régulation de CD103.

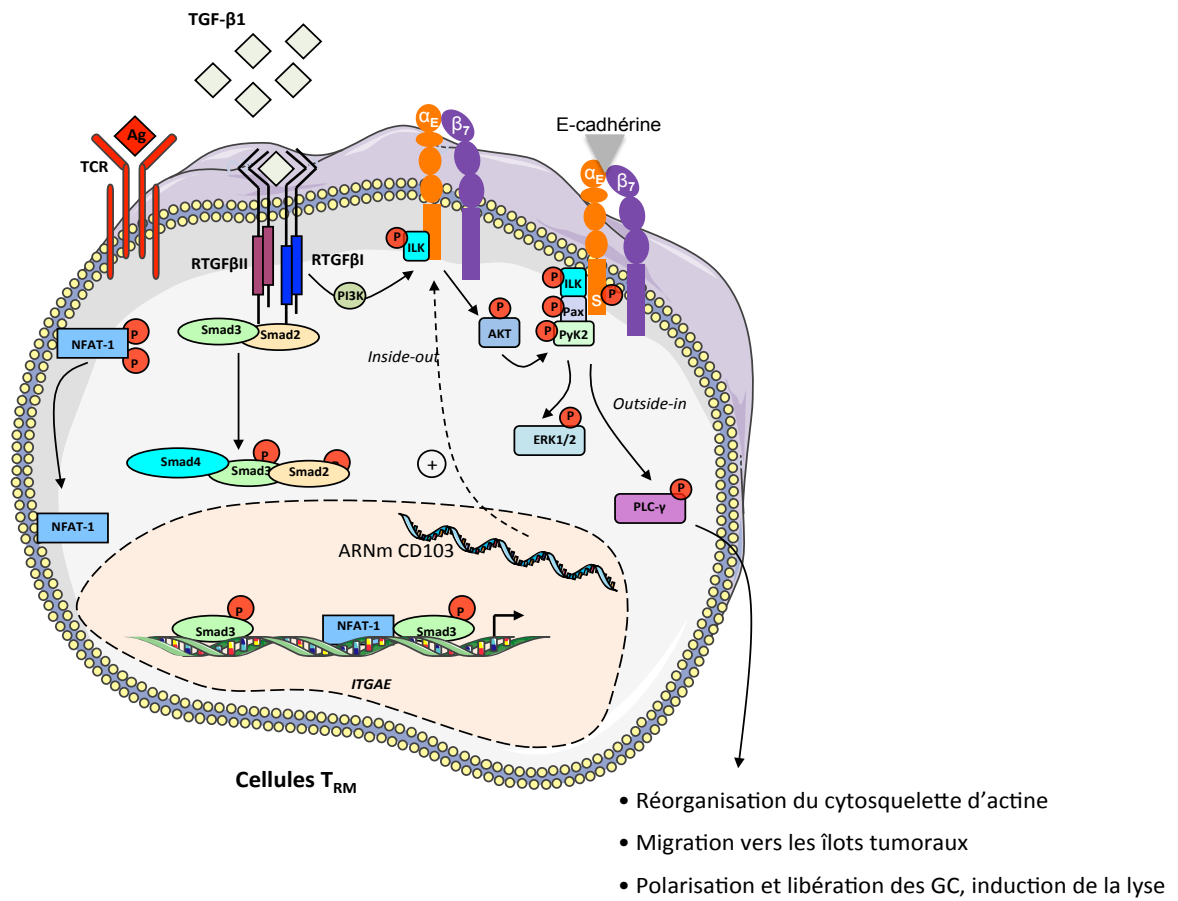


Figure 25 : Modèle proposé de la signalisation *inside-out* et *outside-in* de l'intégrine CD103

PROCÉCURES EXPÉRIMENTALES

PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

Etablissement et culture des lignées tumorales et des clones CTL

La lignée Jurkat-TAg (CD103⁻/β7^{low}) a été fournie par le Dr. Georges Bismuth (Institut Cochin, Paris). Un marquage avec un Ac anti-β7 puis un clonage par dilution limite ont été réalisés afin d'obtenir un clone Jurkat-TAg (CD103⁻/β7^{high}). La lignée tumorale humaine IGR-Heu et le clone T CD8⁺ H171 (CD103⁺/β7⁺) ont été établis à partir des prélèvements tumoraux d'un patient Heu atteint d'un cancer bronchique non à petites cellules. Le clone H32-8 (CD103⁺/β7⁺) a été isolé à partir des PBL du même patient. Les lignées tumorales sont maintenues en culture dans du milieu DMEM/F12 complémenté avec 10% de sérum de veau foetal (Seromed) décomplémenté, 1% d'Ultrosor G, 1% de sodium pyruvate et 0,2% de pénicilline et streptomycine (GibcoBRL, Life Technologies). Les CTL sont cultivés dans du milieu RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies, France) contenant 10% de sérum humain AB (Institut Jacques Boy), 1% de sodium pyruvate et 100 UI/mL d'IL-2 recombinante (Roussel-uclaf) en présence de cellules tumorales (3.10³/puits) et de cellules lymphoblastoïdes (4.10⁴/puits, cellules B transformées avec le virus EBV, ou Heu-EBV) autologues irradiées.

Extraction de TIL de cancer bronchique

Les prélèvements tumoraux frais ont été digérés pendant 40 min à 37°C selon le protocole du kit « Tumor dissociation » (MACS, Miltenyi Biotec, Allemagne) puis filtrés (100 μm) et lavés dans du RMPI contenant 10% de sérum humain. Les lymphocytes ont été enrichis par séparation sur un gradient de Ficoll et les CD8 ont été purifiés par sélection positive (Miltenyi Biotec, Allemagne). La fraction positive a ensuite été analysée par cytométrie de flux ou microscopie confocale.

Molécules recombinantes, anticorps et inhibiteurs chimiques

La E-cadhérine humaine recombinante (rE-cadh-Fc) a été fournie par R&D Systems. Le TGF-β recombinant humain provient d'Eurbio, France. L'inhibiteur Saracatinib (AZD0530) provient de chez Calbiochem (MerckMillipore). Les anticorps secondaires Alexa-Fluor ainsi que la phalloïdine proviennent de Life Technologies. Les anticorps utilisés sont résumés dans le tableau suivant :

Anticorps	Clone	Fournisseur
CD3	UCHT1	Biolegend
CD8	RPA-T8	Biolegend
CD103	2G5	BeckmanCoulter
CD103	BerACT8	Biolegend
Paxilline (mouse)	349	BD Biosciences
Paxilline (rabbit)	polyclonal	Biolegend
Phospho-Paxilline	polyclonal	Cell signaling
Phospho-Pyk2 (Tyr 402)	Polyclonal	Life (44-618G)
Pyk2	9H12L1	Invitrogen (700183)

Construction des plasmides

L'ADNc codant pour la sous-unité CD103 (humaine) présent dans un vecteur pAMR8, nous a été fourni par le Dr Brenner. L'ADNc de CD103 a été sous-cloné dans le vecteur pEGFPN1 au niveau du site de restriction HindIII, puis fusionné à la GFP à l'aide de la technique de mutagenèse dirigée. Des mutants de délétion de CD103 ont été réalisés à l'aide du kit de mutagenèse Quickchange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). Le mutant CD103-Δ1 a été réalisé à partir du plasmide codant pour la protéine de fusion CD103-GFP avec les amorces suivantes :

sens 5' GTGTGGCTTTTTTAAAAGAAAAGCAACTCAAGCTTCGAATTCTGCAGTC 3'

et antisens GACTGCAGAATTCGAAGCTTGAGTTTTCTTTTAAAAAAGCCACAC 5'.

Le mutant CD103-Δ2 a été réalisé à partir du plasmide codant pour la protéine de fusion avec les amorces suivantes :

sens 5' GAAAATATCAACAAGCTGCAAGCTTCGAATTCTGCAG 3'

et antisens 5' CTGCAGAATTCGAAGCTTGAGCAAGTTCAGTTGTTGATATTTTC 3'.

Le mutant CD103-Δ3 a été réalisé à partir du plasmide codant pour la protéine de fusion avec les amorces suivantes :

sens 5' GAGCATCAGGAAGGCCAGCTGCTCAAGCTTCGAATTCTG 3'

et antisens 5' CAGAATTCGAAGCTTGAGCAGCTGGGCCTTCCTGATGCTC 3'.

Le mutant CD103-Y1156A a été réalisé à partir du plasmide codant pour la protéine de fusion avec les amorces suivantes :

sens 5' GTGTGGCTTTTTTAAAAGAAAAGCACAACAAGCTGCAACTTGGAGGC 3'

et antisens 5' GCCTCCAAGTTCAGTTGTTGTGCTTTTCTTTTAAAAAAGCCACAC 3'

Le mutant CD103-S1163A a été réalisé à partir du plasmide codant pour la protéine de fusion avec les amorces suivantes :

sens 5' AGCTGGGCCTTCCTGATTGCCTCCAAGTTCAGTTGTTG 3'

et antisens 5' CAACAACCTGAACTTGGAGGCAATCAGGAAGGCCAGCT 3'

Le mutant CD103-Y1156A/S1163A a été réalisé à partir du plasmide CD103-S1163A codant pour la protéine de fusion avec les amorces suivantes :

sens 5' GTGTGGCTTTTTTAAAAGAAAAGCACAACAACCTGAACTTGGAGGC 3'

et antisens 5' GCCTCCAAGTTCAGTTGTTGTGCTTTTCTTTTAAAAAAGCCACAC 3'

Le mutant CD103-S1163D a été réalisé à partir du plasmide codant pour la protéine de fusion avec les amorces suivantes :

sens 5' AGCTGGGCCTTCCTGATGTCCTCCAAGTTCAGTTGTTG 3'

et antisens 5' CAACAACCTGAACTTGGAGGACATCAGGAAGGCCAGCT 3'

Constructions lentivirales

L'inhibition de l'expression de la Paxilline a été réalisée par shRNA. Des ADN doubles brins contenant les séquences inhibitrices ont été synthétisés et insérés dans un plasmide pBlue Scirpt contenant le promoteur humain H1. La cassette contenant le promoteur H1 et la séquence inhibitrice ont été clonées dans le vecteur viral pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE. Les particules lentivirales ont été préparées après transfection transitoire des cellules HEK293T avec le jetPRIME (Ozyme, France). Les plasmides pRRL contenant les séquences inhibitrices, le plasmide « packaging » pCMV Δ R8.91 et le plasmide « enveloppe » pMD2.G ont été utilisés. Les particules virales ont été concentrées à environ 10^8 particules/mL et utilisées immédiatement sur les cellules T à une multiplicité d'infection (MOI) de 30 pour les clones T ou de 10 pour les PBMC CD8⁺. Les cellules ont été spinoculées pendant 1 h à 1300 rpm. 72 h après l'infection, les cellules GFP⁺ ont été triées sur le trieur BD Influx.

shScrambled : CGGCAGCTAGCGACGCCAT

shPaxillin-1 : GGGCAGCAACCTTTCTGAACT

sh Paxillin-2 : GATCCCGGCAAGGACTACTTCGACATGT

Transfection transitoire des cellules Jurkat-TAg

Les cellules Jurkat-TAg ($10 \cdot 10^6$) sont transfectées par électroporation avec 30 μ g de plasmide avec le système Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories) dans une cuvette de 4 mm à 280 V et 900 μ F. Les cellules sont ensuite placées dans des plaques 6 puits dans un milieu frais RPMI supplémenté en SVF. L'expression de la GFP et de la molécule CD103 est ensuite analysée à 48 h par cytométrie en flux les cellules sont triées à l'aide du trieur BD Influx.

Analyse par microscopie confocale

Analyse des conjugués entre clones CTL et cellules tumorales

Les cellules tumorales et effectrices sont déposées sur des lames traitées avec de la poly-L-Lysine (Sigma-Aldrich) au rapport E:C=2:1 et incubées à 37°C pendant la coculture. Les cellules sont alors fixées avec 2% de paraformaldéhyde pendant 10 min, perméabilisées avec 0,5% de Triton X-100 pendant 10 min, puis bloquées avec 10% de sérum de veau foetal pendant 20 min. Les lames sont ensuite marquées avec un Ac primaire, puis un Ac secondaire couplé à l'Alexa-488, 546 ou 647 (Life Technologies). Tous les Ac sont dilués en PBS IX contenant 1 mg/mL d'albumine de sérum bovin. Les lames sont montées avec un milieu de montage contenant du DAPI (Fluoromount-G with DAPI, eBioscience) et conservées à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à l'analyse avec un microscope à fluorescence Olympus SP8.

Analyse de l'adhérence et du spreading des CTL à la rE-cadhérine-Fc

Les lames de verre sont prétraitées avec la molécule rE-cadhérine-Fc humaine (RnD Systems) 2 h à 37°C. Elles sont ensuite lavées en PBS 1X. Les CTL sont incubés sur les lames à 37°C pendant 1 h puis fixés avec 2% de paraformaldéhyde pendant 10 min. Les marquages sont ensuite réalisés comme décrit précédemment. Le nombre de cellules ayant adhéré est compté avec ImageJ. L'index d'étalement est calculé en mesurant la longueur et la largeur des cellules sur ImageJ.

Analyse des conjugués Jurkat-TAg et billes rE-cadhérine-Fc

Les cellules Jurkat-TAg sont transfectées avec les différents plasmides comme décrit précédemment, 48 h post-transfection, les cellules sont triées sur la base de la GFP, lavées et incubées en présence du lysotracker Red (Invitrogen) durant 20 min à 37°C. Puis, les cellules sont lavées avec du milieu. Parallèlement, des billes magnétiques de protéines G (Invitrogen), sont incubées en présence de rE-cadhérine-Fc durant 30 min à température ambiante sous agitation. Par la suite les cellules sont incubées en présence des billes magnétiques durant 1 h

dans des chambres d'imagerie en plastique et analysées par microscopie confocale. Ainsi, l'analyse par microscopie permet d'observer en *live*, la GFP et le lysotracker. Les marquages des cellules Jurkat-TAg avec la Paxilline nécessitent la fixation des cellules sur lames poly-L-lysine, comme décrit précédemment.

Western Blot

Les extraits protéiques totaux sont préparés par la lyse des cellules dans une solution Laemmli (Tris, HCl pH 6.8 1M, SDS 10%, Glycérol 30%) supplémentée par un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (ThermoFisher Scientific). 1.10^6 lymphocytes T sont récoltés et subissent une sonication pendant 30 sec. Les lysats protéiques sont ensuite centrifugés à 10 000 g afin d'éliminer les débris cellulaires. Après dosage, les échantillons protéiques sont dénaturés dans le tampon de Laemmli 5 min à 95°C et déposés sur le gel de polyacrylamide-bisacrylamide dénaturant. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Pierce/Perbio, Rockford, IL) par électrophorèse en milieu liquide, pendant 90 min à 100 V). Après transfert, la membrane est bloquée dans une solution de TBS 1X (20 mM Tris-HCl), de 5% lait ou BSA, et de 0,1% Tween 20 (TBS-Tween-lait/BSA) pendant 1 h à température ambiante. Puis, la membrane est incubée avec les Ac primaires puis secondaires couplés à la peroxydase, dilués dans le tampon TBS-Tween-lait/BSA. Enfin, l'immunoréactivité est révélée par chimioluminescence avec le substrat SuperSignal WestPico (Pierce/Perbio). Une autoradiographie était alors réalisée avec un film CL-XPosure™ (Pierce/Perbio).

Test de cytotoxicité

L'activité cytotoxique des clones CTL est mesurée par le test conventionnel de relargage de chrome radioactif ^{51}Cr (Amersham-Biosciences). La lignée tumorale autologue IGR-Heu a été utilisée comme cellule cible. Brièvement, un million de cellules cibles sont marquées avec 100 μL de chrome radioactif pendant 1 h à 37°C. Après lavage, 3000 cellules cibles sont déposées dans chaque puits de plaques 96 puits à fond rond. Les cellules effectrices sont alors ajoutées à différents rapports effecteur/cible. Après 4 h d'incubation, les surnageants sont transférés sur une plaque LumaPlate™-96 puits (PerkinElmer). Celles-ci sont placées 18 h à 56°C. La lecture des plaques est réalisée à l'aide du programme TopCount NXT. Le pourcentage de lyse spécifique est alors calculé de manière conventionnelle. Dans les expériences d'inhibition, les cellules effectrices sont pré-incubées avec les inhibiteurs.

Mesure de l'activité calcique des Jurkat-TAg transfectées

La réponse calcique a été mesurée dans les Jurkat-TAg transfectées avec les constructions CD103 et chargées et avec la sonde fluorescente Fura-2-AM (Molecular Probes) à 1 μ M pendant 20 min à 37°C dans du HBSS. Les cellules ont été lavées, resuspendues dans du HBSS contenant 2% de sérum, et déposées sur des Ibidi (Biovalley). Des billes recouvertes de rE-cadh-FC (5 μ g/mL) et d'anti-CD3 (0.5 μ g/mL) ont été ajoutées après 1 min d'acquisition. Les images ont été acquises toutes les 10 sec à 310 nm et 350 nm, à l'aide d'un microscope inversé équipé d'un objectif 10x (Eclipse TE300 microscope, Nikon). L'analyse a été effectuée avec ImageJ.

Immunoprécipitation

Les clones T CD103⁺ (10 millions) ont été lysés pendant 30 min à 4° C, sous agitation, dans un tampon contenant du Brij97. Les lysats ont été centrifugés 20 min à 10 000g afin d'éliminer les débris cellulaires, puis incubés pendant 2 h à 4°C avec des billes recouvertes d'anticorps cross-linkés anti-CD103, anti-paxilline ou avec l'anticorps contrôle IgG adéquat. Les billes ont ensuite été lavées et éluées à 95°C dans un tampon laemmli.

Induction de l'expression de CD103 à la surface des PBMC CD8⁺

Afin d'induire l'expression de CD103 à la surface des PBMC enrichis en CD8⁺, les cellules sont stimulées avec le TGF- β 1. Brièvement, l'Ac anti-CD3 (clone UCHT1) est incubé dans des plaques à fond plat à la concentration de 5 μ g/mL, pendant 18 h à 4° C. Après lavage, les cellules sont ajoutées et incubées 4 jours en présence de TGF- β 1 à la concentration finale de 5 ng/mL. L'expression de CD103 à la surface des PBMC CD8⁺ est alors vérifiée par cytométrie en flux.

BIBLIOGRAPHIE

- Adair, B. D., and Yeager, M. (2002). Three-dimensional model of the human platelet integrin alpha IIb beta 3 based on electron cryomicroscopy and x-ray crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 14059-14064.
- Agace, W. W., Higgins, J. M., Sadasivan, B., Brenner, M. B., and Parker, C. M. (2000). T-lymphocyte-epithelial-cell interactions: integrin alpha(E)(CD103)beta(7), LEEP-CAM and chemokines. *Current opinion in cell biology* 12, 563-568.
- Al-Hamidi, A., Pekalski, M., Robertson, H., Ali, S., and Kirby, J. A. (2008). Renal allograft rejection: the contribution of chemokines to the adhesion and retention of alphaE(CD103)beta7 integrin-expressing intratubular T cells. *Molecular immunology* 45, 4000-4007.
- Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, P., Squarcina, P., Accornero, P., Lozupone, F., Lugini, L., *et al.* (2002). Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *The Journal of experimental medicine* 195, 1303-1316.
- Anikeeva, N., Somersalo, K., Sims, T. N., Thomas, V. K., Dustin, M. L., and Sykulev, Y. (2005). Distinct role of lymphocyte function-associated antigen-1 in mediating effective cytolytic activity by cytotoxic T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 6437-6442.
- Annacker, O., Coombes, J. L., Malmstrom, V., Uhlig, H. H., Bourne, T., Johansson-Lindbom, B., Agace, W. W., Parker, C. M., and Powrie, F. (2005). Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *The Journal of experimental medicine* 202, 1051-1061.
- Anton van der Merwe, P., Davis, S. J., Shaw, A. S., and Dustin, M. L. (2000). Cytoskeletal polarization and redistribution of cell-surface molecules during T cell antigen recognition. *Seminars in immunology* 12, 5-21.
- Anz, D., Mueller, W., Golic, M., Kunz, W. G., Rapp, M., Koelzer, V. H., Ellermeier, J., Ellwart, J. W., Schnurr, M., Bourquin, C., and Endres, S. (2011). CD103 is a hallmark of tumor-infiltrating regulatory T cells. *International journal of cancer* 129, 2417-2426.
- Arjonen, A., Alanko, J., Veltel, S., and Ivaska, J. (2012). Distinct recycling of active and inactive beta1 integrins. *Traffic* 13, 610-625.
- Avraham, S., Jiang, S., Ota, S., Fu, Y., Deng, B., Dowler, L. L., White, R. A., and Avraham, H. (1995). Structural and functional studies of the intracellular tyrosine kinase MATK gene and its translated product. *The Journal of biological chemistry* 270, 1833-1842.
- Baker, R. G., Hsu, C. J., Lee, D., Jordan, M. S., Maltzman, J. S., Hammer, D. A., Baumgart, T., and Koretzky, G. A. (2009). The adapter protein SLP-76 mediates "outside-in" integrin signaling and function in T cells. *Molecular and cellular biology* 29, 5578-5589.
- Balkwill, F. R. (2012). The chemokine system and cancer. *The Journal of pathology* 226, 148-157.
- Banz, A., Peixoto, A., Pontoux, C., Cordier, C., Rocha, B., and Papiernik, M. (2003). A unique subpopulation of CD4+ regulatory T cells controls wasting disease, IL-10 secretion and T cell homeostasis. *European journal of immunology* 33, 2419-2428.
- Barcia, C., Thomas, C. E., Curtin, J. F., King, G. D., Wawrowsky, K., Candolfi, M., Xiong, W. D., Liu, C., Kroeger, K., Boyer, O., *et al.* (2006). In vivo mature immunological synapses forming SMACs mediate clearance of virally infected astrocytes from the brain. *The Journal of experimental medicine* 203, 2095-2107.
- Barczyk, M., Carracedo, S., and Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell and tissue research* 339, 269-280.
- Baruzzi, A., Cavegion, E., and Berton, G. (2008). Regulation of phagocyte migration and recruitment by Src-family kinases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65, 2175-2190.

- Baruzzi, A., Iacobucci, I., Soverini, S., Lowell, C. A., Martinelli, G., and Berton, G. (2010). c-Abl and Src-family kinases cross-talk in regulation of myeloid cell migration. *FEBS letters* *584*, 15-21.
- Basu, R., Whitlock, B. M., Husson, J., Le Floc'h, A., Jin, W., Olyer-Yaniv, A., Dotiwala, F., Giannone, G., Hivroz, C., Biais, N., *et al.* (2016). Cytotoxic T Cells Use Mechanical Force to Potentiate Target Cell Killing. *Cell* *165*, 100-110.
- Beal, A. M., Anikeeva, N., Varma, R., Cameron, T. O., Vasiliver-Shamis, G., Norris, P. J., Dustin, M. L., and Sykulev, Y. (2009). Kinetics of early T cell receptor signaling regulate the pathway of lytic granule delivery to the secretory domain. *Immunity* *31*, 632-642.
- Bedoui, S., Whitney, P. G., Waithman, J., Eidsmo, L., Wakim, L., Caminschi, I., Allan, R. S., Wojtasiak, M., Shortman, K., Carbone, F. R., *et al.* (2009). Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nature immunology* *10*, 488-495.
- Beinke, S., Phee, H., Clingan, J. M., Schlessinger, J., Matloubian, M., and Weiss, A. (2010). Proline-rich tyrosine kinase-2 is critical for CD8 T-cell short-lived effector fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 16234-16239.
- Bellis, S. L., Miller, J. T., and Turner, C. E. (1995). Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase. *The Journal of biological chemistry* *270*, 17437-17441.
- Bhat, S. S., Friedmann, K. S., Knorck, A., Hoxha, C., Leidinger, P., Backes, C., Meese, E., Keller, A., Rettig, J., Hoth, M., *et al.* (2016). Syntaxin 8 is required for efficient lytic granule trafficking in cytotoxic T lymphocytes. *Biochimica et biophysica acta* *1863*, 1653-1664.
- Billadeau, D. D., Nolz, J. C., and Gomez, T. S. (2007). Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nature reviews Immunology* *7*, 131-143.
- Billingham, R. E., Brent, L., and Medawar, P. B. (2010). 'Actively acquired tolerance' of foreign cells. 1953. *J Immunol* *184*, 5-8.
- Birnbaum, M. E., Berry, R., Hsiao, Y. S., Chen, Z., Shingu-Vazquez, M. A., Yu, X., Waghray, D., Fischer, S., McCluskey, J., Rossjohn, J., *et al.* (2014). Molecular architecture of the alphabeta T cell receptor-CD3 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, 17576-17581.
- Bladergroen, B. A., Strik, M. C., Bovenschen, N., van Berkum, O., Scheffer, G. L., Meijer, C. J., Hack, C. E., and Kummer, J. A. (2001). The granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, is mainly expressed by dendritic cells and at immune-privileged sites. *J Immunol* *166*, 3218-3225.
- Blanchard, N., Decraene, M., Yang, K., Miro-Mur, F., Amigorena, S., and Hivroz, C. (2004). Strong and durable TCR clustering at the T/dendritic cell immune synapse is not required for NFAT activation and IFN-gamma production in human CD4+ T cells. *J Immunol* *173*, 3062-3072.
- Blattman, J. N., Antia, R., Sourdive, D. J., Wang, X., Kaech, S. M., Murali-Krishna, K., Altman, J. D., and Ahmed, R. (2002). Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *The Journal of experimental medicine* *195*, 657-664.
- Boissonnas, A., Fetler, L., Zeelenberg, I. S., Hugues, S., and Amigorena, S. (2007). In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. *The Journal of experimental medicine* *204*, 345-356.
- Boppart, M. D., Burkin, D. J., and Kaufman, S. J. (2011). Activation of AKT signaling promotes cell growth and survival in alpha7beta1 integrin-mediated alleviation of muscular dystrophy. *Biochimica et biophysica acta* *1812*, 439-446.
- Boshoff, C., and Weiss, R. (2002). AIDS-related malignancies. *Nature reviews Cancer* *2*, 373-382.

- Bottcher, R. T., Stremmel, C., Meves, A., Meyer, H., Widmaier, M., Tseng, H. Y., and Fassler, R. (2012). Sorting nexin 17 prevents lysosomal degradation of beta1 integrins by binding to the beta1-integrin tail. *Nature cell biology* *14*, 584-592.
- Bouaouina, M., Lad, Y., and Calderwood, D. A. (2008). The N-terminal domains of talin cooperate with the phosphotyrosine binding-like domain to activate beta1 and beta3 integrins. *The Journal of biological chemistry* *283*, 6118-6125.
- Boudeau, J., Miranda-Saavedra, D., Barton, G. J., and Alessi, D. R. (2006). Emerging roles of pseudokinases. *Trends in cell biology* *16*, 443-452.
- Bouso, P., and Robey, E. A. (2004). Dynamic behavior of T cells and thymocytes in lymphoid organs as revealed by two-photon microscopy. *Immunity* *21*, 349-355.
- Boutet, M., Gauthier, L., Leclerc, M., Gros, G., de Montpreville, V., Theret, N., Donnadieu, E., and Mami-Chouaib, F. (2016). TGFbeta Signaling Intersects with CD103 Integrin Signaling to Promote T-Lymphocyte Accumulation and Antitumor Activity in the Lung Tumor Microenvironment. *Cancer research* *76*, 1757-1769.
- Braakman, E., Goedegebuure, P. S., Vreugdenhil, R. J., Segal, D. M., Shaw, S., and Bolhuis, R. L. (1990). ICAM- melanoma cells are relatively resistant to CD3-mediated T-cell lysis. *International journal of cancer* *46*, 475-480.
- Brakebusch, C., and Fassler, R. (2003). The integrin-actin connection, an eternal love affair. *The EMBO journal* *22*, 2324-2333.
- Braun, A., Dewert, N., Brunnert, F., Schnabel, V., Hardenberg, J. H., Richter, B., Zachmann, K., Cording, S., Classen, A., Brans, R., *et al.* (2015). Integrin alphaE(CD103) Is Involved in Regulatory T-Cell Function in Allergic Contact Hypersensitivity. *The Journal of investigative dermatology* *135*, 2982-2991.
- Breart, B., Lemaitre, F., Celli, S., and Bouso, P. (2008). Two-photon imaging of intratumoral CD8+ T cell cytotoxic activity during adoptive T cell therapy in mice. *The Journal of clinical investigation* *118*, 1390-1397.
- Brossard, C., Feuillet, V., Schmitt, A., Randriamampita, C., Romao, M., Raposo, G., and Trautmann, A. (2005). Multifocal structure of the T cell - dendritic cell synapse. *European journal of immunology* *35*, 1741-1753.
- Brown, C. E., Vishwanath, R. P., Aguilar, B., Starr, R., Najbauer, J., Aboody, K. S., and Jensen, M. C. (2007). Tumor-derived chemokine MCP-1/CCL2 is sufficient for mediating tumor tropism of adoptively transferred T cells. *J Immunol* *179*, 3332-3341.
- Brown, M. C., Perrotta, J. A., and Turner, C. E. (1996). Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *The Journal of cell biology* *135*, 1109-1123.
- Brown, M. C., and Turner, C. E. (2004). Paxillin: adapting to change. *Physiological reviews* *84*, 1315-1339.
- Browne, K. A., Blink, E., Sutton, V. R., Froelich, C. J., Jans, D. A., and Trapani, J. A. (1999). Cytosolic delivery of granzyme B by bacterial toxins: evidence that endosomal disruption, in addition to transmembrane pore formation, is an important function of perforin. *Molecular and cellular biology* *19*, 8604-8615.
- Broz, M. L., Binnewies, M., Boldajipour, B., Nelson, A. E., Pollack, J. L., Erle, D. J., Barczak, A., Rosenblum, M. D., Daud, A., Barber, D. L., *et al.* (2014). Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen-presenting cells critical for T cell immunity. *Cancer cell* *26*, 638-652.
- Calderwood, D. A. (2004). Talin controls integrin activation. *Biochemical Society transactions* *32*, 434-437.
- Calderwood, D. A., Fujioka, Y., de Pereda, J. M., Garcia-Alvarez, B., Nakamoto, T., Margolis, B., McGlade, C. J., Liddington, R. C., and Ginsberg, M. H. (2003). Integrin beta

- cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 2272-2277.
- Campi, G., Varma, R., and Dustin, M. L. (2005). Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *The Journal of experimental medicine* *202*, 1031-1036.
- Cascio, G., Martin-Cofreces, N. B., Rodriguez-Frade, J. M., Lopez-Cotarelo, P., Criado, G., Pablos, J. L., Rodriguez-Fernandez, J. L., Sanchez-Madrid, F., and Mellado, M. (2015). CXCL12 Regulates through JAK1 and JAK2 Formation of Productive Immunological Synapses. *J Immunol* *194*, 5509-5519.
- Caswell, P. T., and Norman, J. C. (2006). Integrin trafficking and the control of cell migration. *Traffic* *7*, 14-21.
- Cederbom, L., Hall, H., and Ivars, F. (2000). CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *European journal of immunology* *30*, 1538-1543.
- Cerf-Bensussan, N., Jarry, A., Brousse, N., Lisowska-Grospierre, B., Guy-Grand, D., and Griscelli, C. (1987). A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes. *European journal of immunology* *17*, 1279-1285.
- Chen, D. S., and Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* *39*, 1-10.
- Chen, L. M., Bailey, D., and Fernandez-Valle, C. (2000). Association of beta 1 integrin with focal adhesion kinase and paxillin in differentiating Schwann cells. *J Neurosci* *20*, 3776-3784.
- Cheung, S. M., and Ostergaard, H. L. (2016). Pyk2 Controls Integrin-Dependent CTL Migration through Regulation of De-Adhesion. *J Immunol* *197*, 1945-1956.
- Childs, R. W., and Carlsten, M. (2015). Therapeutic approaches to enhance natural killer cell cytotoxicity against cancer: the force awakens. *Nature reviews Drug discovery* *14*, 487-498.
- Choudhuri, K., Wiseman, D., Brown, M. H., Gould, K., and van der Merwe, P. A. (2005). T-cell receptor triggering is critically dependent on the dimensions of its peptide-MHC ligand. *Nature* *436*, 578-582.
- Comrie, W. A., and Burkhardt, J. K. (2016). Action and Traction: Cytoskeletal Control of Receptor Triggering at the Immunological Synapse. *Frontiers in immunology* *7*, 68.
- Coomes, J. L., Siddiqui, K. R., Arancibia-Carcamo, C. V., Hall, J., Sun, C. M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine* *204*, 1757-1764.
- Cote, J. F., Turner, C. E., and Tremblay, M. L. (1999). Intact LIM 3 and LIM 4 domains of paxillin are required for the association to a novel polyproline region (Pro 2) of protein-tyrosine phosphatase-PEST. *The Journal of biological chemistry* *274*, 20550-20560.
- Crabtree, G. R., and Olson, E. N. (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* *109 Suppl*, S67-79.
- Cresswell, J., Wong, W. K., Henry, M. J., Robertson, H., Neal, D. E., and Kirby, J. A. (2002). Adhesion of lymphocytes to bladder cancer cells: the role of the alpha(E)beta(7) integrin. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* *51*, 483-491.
- Curotto de Lafaille, M. A., and Lafaille, J. J. (2009). Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* *30*, 626-635.
- Dadi, S., Chhangawala, S., Whitlock, B. M., Franklin, R. A., Luo, C. T., Oh, S. A., Toure, A., Pritykin, Y., Huse, M., Leslie, C. S., and Li, M. O. (2016). Cancer Immun-surveillance by Tissue-Resident Innate Lymphoid Cells and Innate-like T Cells. *Cell* *164*, 365-377.
- Darmon, A. J., Nicholson, D. W., and Bleackley, R. C. (1995). Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* *377*, 446-448.

- Das, V., Nal, B., Dujeancourt, A., Thoulouze, M. I., Galli, T., Roux, P., Dautry-Varsat, A., and Alcover, A. (2004). Activation-induced polarized recycling targets T cell antigen receptors to the immunological synapse; involvement of SNARE complexes. *Immunity* *20*, 577-588.
- De Franceschi, N., Hamidi, H., Alanko, J., Sahgal, P., and Ivaska, J. (2015). Integrin traffic - the update. *Journal of cell science* *128*, 839-852.
- de Saint Basile, G., Menasche, G., and Fischer, A. (2010). Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nature reviews Immunology* *10*, 568-579.
- Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J. F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., *et al.* (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine* *204*, 1257-1265.
- Deakin, N. O., and Turner, C. E. (2008). Paxillin comes of age. *Journal of cell science* *121*, 2435-2444.
- Deng, J. T., Van Lierop, J. E., Sutherland, C., and Walsh, M. P. (2001). Ca²⁺-independent smooth muscle contraction. a novel function for integrin-linked kinase. *The Journal of biological chemistry* *276*, 16365-16373.
- Depoil, D., Zaru, R., Guiraud, M., Chauveau, A., Harriague, J., Bismuth, G., Utzny, C., Muller, S., and Valitutti, S. (2005). Immunological synapses are versatile structures enabling selective T cell polarization. *Immunity* *22*, 185-194.
- Derniame, S., Vignaud, J. M., Faure, G. C., and Bene, M. C. (2008). Alteration of the immunological synapse in lung cancer: a microenvironmental approach. *Clinical and experimental immunology* *154*, 48-55.
- Derynck, R., and Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* *425*, 577-584.
- Djenidi, F., Adam, J., Goubar, A., Durgeau, A., Meurice, G., de Montpreville, V., Validire, P., Besse, B., and Mami-Chouaib, F. (2015). 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*, 3475-3486.
- Donnadieu, E., Bismuth, G., and Trautmann, A. (1992). Calcium fluxes in T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* *267*, 25864-25872.
- Doucey, M. A., Legler, D. F., Faroudi, M., Boucheron, N., Baumgaertner, P., Naeher, D., Cebecauer, M., Hudrisier, D., Ruegg, C., Palmer, E., *et al.* (2003). The beta1 and beta3 integrins promote T cell receptor-mediated cytotoxic T lymphocyte activation. *The Journal of biological chemistry* *278*, 26983-26991.
- Dunn, G. P., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* *21*, 137-148.
- Dustin, M. L. (1998). Making a little affinity go a long way: a topological view of LFA-1 regulation. *Cell adhesion and communication* *6*, 255-262.
- Dustin, M. L. (2004). Stop and go traffic to tune T cell responses. *Immunity* *21*, 305-314.
- Dustin, M. L. (2008). T-cell activation through immunological synapses and kinapses. *Immunological reviews* *221*, 77-89.
- Dustin, M. L., and de Fougères, A. R. (2001). Reprogramming T cells: the role of extracellular matrix in coordination of T cell activation and migration. *Current opinion in immunology* *13*, 286-290.
- Dustin, M. L., and Shaw, A. S. (1999). Costimulation: building an immunological synapse. *Science (New York, NY)* *283*, 649-650.
- Dustin, M. L., and Springer, T. A. (1989). T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* *341*, 619-624.

- Echchakir, H., Dorothee, G., Vergnon, I., Menez, J., Chouaib, S., and Mami-Chouaib, F. (2002). Cytotoxic T lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen display similar HLA tetramer binding but distinct functional avidity and tissue distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 9358-9363.
- Ehrlich, L. I., Ebert, P. J., Krummel, M. F., Weiss, A., and Davis, M. M. (2002). Dynamics of p56lck translocation to the T cell immunological synapse following agonist and antagonist stimulation. *Immunity* *17*, 809-822.
- El Hage, F., Vergnon, I., Grunenwald, D., Soria, J. C., Chouaib, S., and Mami-Chouaib, F. (2005). Generation of diverse mutated tumor antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in a lung cancer patient with long survival. *Oncol Rep* *14*, 763-769.
- El-Asady, R., Yuan, R., Liu, K., Wang, D., Gress, R. E., Lucas, P. J., Drachenberg, C. B., and Hadley, G. A. (2005). TGF- β -dependent CD103 expression by CD8(+) T cells promotes selective destruction of the host intestinal epithelium during graft-versus-host disease. *The Journal of experimental medicine* *201*, 1647-1657.
- Ericsson, A., Arya, A., and Agace, W. (2004). CCL25 enhances CD103-mediated lymphocyte adhesion to E-cadherin. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1029*, 334-336.
- Fagerholm, S., Morrice, N., Gahmberg, C. G., and Cohen, P. (2002). Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the integrin CD18 chain by protein kinase C isoforms in leukocytes. *The Journal of biological chemistry* *277*, 1728-1738.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Fioretti, M. C., Alegre, M. L., and Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature immunology* *4*, 1206-1212.
- Faroudi, M., Utzny, C., Salio, M., Cerundolo, V., Guiraud, M., Muller, S., and Valitutti, S. (2003). Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction: manifestation of a dual activation threshold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 14145-14150.
- Faure, S., Salazar-Fontana, L. I., Semichon, M., Tybulewicz, V. L., Bismuth, G., Trautmann, A., Germain, R. N., and Delon, J. (2004). ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. *Nature immunology* *5*, 272-279.
- Feldmann, J., Callebaut, I., Raposo, G., Certain, S., Bacq, D., Dumont, C., Lambert, N., Ouachee-Chardin, M., Chedeville, G., Tamary, H., *et al.* (2003). Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* *115*, 461-473.
- Feske, S., Giltnane, J., Dolmetsch, R., Staudt, L. M., and Rao, A. (2001). Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nature immunology* *2*, 316-324.
- Foukas, P. G., Tsilivakos, V., Zacharatos, P., Mariatos, G., Moschos, S., Syrianiou, A., Asimacopoulos, P. J., Bramis, J., Fotiadis, C., Kittas, C., and Gorgoulis, V. G. (2001). Expression of HLA-DR is reduced in tumor infiltrating immune cells (TIICs) and regional lymph nodes of non-small-cell lung carcinomas. A putative mechanism of tumor-induced immunosuppression? *Anticancer research* *21*, 2609-2615.
- Francisco, L. M., Sage, P. T., and Sharpe, A. H. (2010). The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological reviews* *236*, 219-242.
- Franciszkiwicz, K., Boutet, M., Gauthier, L., Vergnon, I., Peeters, K., Duc, O., Besse, B., de Saint Basile, G., Chouaib, S., and Mami-Chouaib, F. (2014). Synaptic release of CCL5 storage vesicles triggers CXCR4 surface expression promoting CTL migration in response to CXCL12. *J Immunol* *193*, 4952-4961.
- Franciszkiwicz, K., Le Floc'h, A., Boutet, M., Vergnon, I., Schmitt, A., and Mami-Chouaib, F. (2013). CD103 or LFA-1 engagement at the immune synapse between cytotoxic T cells

and tumor cells promotes maturation and regulates T-cell effector functions. *Cancer research* 73, 617-628.

Franciszkiwicz, K., Le Floc'h, A., Jalil, A., Vigant, F., Robert, T., Vergnon, I., Mackiewicz, A., Benihoud, K., Validire, P., Chouaib, S., *et al.* (2009). Intratumoral induction of CD103 triggers tumor-specific CTL function and CCR5-dependent T-cell retention. *Cancer research* 69, 6249-6255.

Fraser, S. A., Karimi, R., Michalak, M., and Hudig, D. (2000). Perforin lytic activity is controlled by calreticulin. *J Immunol* 164, 4150-4155.

French, J. J., Cresswell, J., Wong, W. K., Seymour, K., Charnley, R. M., and Kirby, J. A. (2002). T cell adhesion and cytolysis of pancreatic cancer cells: a role for E-cadherin in immunotherapy? *British journal of cancer* 87, 1034-1041.

Friedl, P., and Brocker, E. B. (2002). TCR triggering on the move: diversity of T-cell interactions with antigen-presenting cells. *Immunological reviews* 186, 83-89.

Friedl, P., den Boer, A. T., and Gunzer, M. (2005). Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nature reviews Immunology* 5, 532-545.

Friedl, P., Entschladen, F., Conrad, C., Niggemann, B., and Zanker, K. S. (1998). CD4+ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize beta1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion. *European journal of immunology* 28, 2331-2343.

Fukuda, K., Bledzka, K., Yang, J., Perera, H. D., Plow, E. F., and Qin, J. (2014). Molecular basis of kindlin-2 binding to integrin-linked kinase pseudokinase for regulating cell adhesion. *The Journal of biological chemistry* 289, 28363-28375.

Fuortes, M., Jin, W. W., and Nathan, C. (1994). Beta 2 integrin-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin in human neutrophils treated with tumor necrosis factor. *The Journal of cell biology* 127, 1477-1483.

Fushimi, T., Kojima, A., Moore, M. A., and Crystal, R. G. (2000). Macrophage inflammatory protein 3alpha transgene attracts dendritic cells to established murine tumors and suppresses tumor growth. *The Journal of clinical investigation* 105, 1383-1393.

Gabrilovich, D. I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews Immunology* 9, 162-174.

Galgano, D., Onnis, A., Pappalardo, E., Galvagni, F., Acuto, O., and Baldari, C. T. (2017). The T cell IFT20 interactome reveals new players in immune synapse assembly. *Journal of cell science*.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., *et al.* (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science (New York, NY)* 313, 1960-1964.

Galon, J., Pages, F., Marincola, F. M., Thurin, M., Trinchieri, G., Fox, B. A., Gajewski, T. F., and Ascierto, P. A. (2012). The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J Transl Med* 10, 1.

Garin, M. I., Chu, C. C., Golshayan, D., Cernuda-Morollon, E., Wait, R., and Lechler, R. I. (2007). Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 109, 2058-2065.

Gebhardt, T., Wakim, L. M., Eidsmo, L., Reading, P. C., Heath, W. R., and Carbone, F. R. (2009). Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nature immunology* 10, 524-530.

Geiger, B., and Ayalon, O. (1992). Cadherins. *Annual review of cell biology* 8, 307-332.

Geiger, B., Rosen, D., and Berke, G. (1982). Spatial relationships of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells. *The Journal of cell biology* 95, 137-143.

- Giannone, G., and Sheetz, M. P. (2006). Substrate rigidity and force define form through tyrosine phosphatase and kinase pathways. *Trends in cell biology* *16*, 213-223.
- Ginsberg, M. H., Partridge, A., and Shattil, S. J. (2005). Integrin regulation. *Current opinion in cell biology* *17*, 509-516.
- Girardi, M., Glusac, E., Filler, R. B., Roberts, S. J., Propperova, I., Lewis, J., Tigelaar, R. E., and Hayday, A. C. (2003). The distinct contributions of murine T cell receptor (TCR)gammadelta+ and TCRalphabeta+ T cells to different stages of chemically induced skin cancer. *The Journal of experimental medicine* *198*, 747-755.
- Girardi, M., Oppenheim, D. E., Steele, C. R., Lewis, J. M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R. E., and Hayday, A. C. (2001). Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science (New York, NY)* *294*, 605-609.
- Gismondi, A., Bisogno, L., Mainiero, F., Palmieri, G., Piccoli, M., Frati, L., and Santoni, A. (1997). Proline-rich tyrosine kinase-2 activation by beta 1 integrin fibronectin receptor cross-linking and association with paxillin in human natural killer cells. *J Immunol* *159*, 4729-4736.
- Gladwish, A., Clarke, K., and Bezjak, A. (2010). Spontaneous regression in advanced non-small cell lung cancer. *BMJ Case Rep* *2010*.
- Goldfinger, L. E., Han, J., Kiosses, W. B., Howe, A. K., and Ginsberg, M. H. (2003). Spatial restriction of alpha4 integrin phosphorylation regulates lamellipodial stability and alpha4beta1-dependent cell migration. *The Journal of cell biology* *162*, 731-741.
- Gondek, D. C., Lu, L. F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S., and Noelle, R. J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* *174*, 1783-1786.
- Gorfu, G., Rivera-Nieves, J., and Ley, K. (2009). Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Current molecular medicine* *9*, 836-850.
- Graf, B., Bushnell, T., and Miller, J. (2007). LFA-1-mediated T cell costimulation through increased localization of TCR/class II complexes to the central supramolecular activation cluster and exclusion of CD45 from the immunological synapse. *J Immunol* *179*, 1616-1624.
- Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., and Dustin, M. L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science (New York, NY)* *285*, 221-227.
- Grashoff, C., Aszodi, A., Sakai, T., Hunziker, E. B., and Fassler, R. (2003). Integrin-linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation. *EMBO reports* *4*, 432-438.
- Guidetti, G. F., Zara, M., Canobbio, I., Visconte, C., Di Nunzio, G., and Torti, M. (2016). Novel pharmacological inhibitors demonstrate the role of the tyrosine kinase Pyk2 in adhesion and aggregation of human platelets. *Thromb Haemost* *116*, 904-917.
- Gunzer, M., Schafer, A., Borgmann, S., Grabbe, S., Zanker, K. S., Brocker, E. B., Kampgen, E., and Friedl, P. (2000). Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity* *13*, 323-332.
- Guo, X., and Wang, X. F. (2009). Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell research* *19*, 71-88.
- Gutierrez-Dalmau, A., and Campistol, J. M. (2007). Immunosuppressive therapy and malignancy in organ transplant recipients: a systematic review. *Drugs* *67*, 1167-1198.
- Guy, C. S., and Vignali, D. A. (2009). Organization of proximal signal initiation at the TCR:CD3 complex. *Immunological reviews* *232*, 7-21.
- Hadley, G. A., Charandee, C., Weir, M. R., Wang, D., Bartlett, S. T., and Drachenberg, C. B. (2001). CD103+ CTL accumulate within the graft epithelium during clinical renal allograft rejection. *Transplantation* *72*, 1548-1555.
- Haining, A. W., Lieberthal, T. J., and Del Rio Hernandez, A. (2016). Talin: a mechanosensitive molecule in health and disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *30*, 2073-2085.

- Han, J., Lim, C. J., Watanabe, N., Soriani, A., Ratnikov, B., Calderwood, D. A., Puzon-McLaughlin, W., Lafuente, E. M., Boussiotis, V. A., Shattil, S. J., and Ginsberg, M. H. (2006). Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin alphaIIb beta3. *Current biology : CB* 16, 1796-1806.
- Han, J., Liu, S., Rose, D. M., Schlaepfer, D. D., McDonald, H., and Ginsberg, M. H. (2001). Phosphorylation of the integrin alpha 4 cytoplasmic domain regulates paxillin binding. *The Journal of biological chemistry* 276, 40903-40909.
- Han, J., Pluhackova, K., and Bockmann, R. A. (2017). The Multifaceted Role of SNARE Proteins in Membrane Fusion. *Frontiers in physiology* 8, 5.
- Han, J., Rose, D. M., Woodside, D. G., Goldfinger, L. E., and Ginsberg, M. H. (2003). Integrin alpha 4 beta 1-dependent T cell migration requires both phosphorylation and dephosphorylation of the alpha 4 cytoplasmic domain to regulate the reversible binding of paxillin. *The Journal of biological chemistry* 278, 34845-34853.
- Hannigan, G. E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M. G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J. C., and Dedhar, S. (1996). Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 379, 91-96.
- Hannigan, G. E., McDonald, P. C., Walsh, M. P., and Dedhar, S. (2011). Integrin-linked kinase: not so 'pseudo' after all. *Oncogene* 30, 4375-4385.
- Hara, S., Nakaseko, C., Yamasaki, S., Hattori, M., Bos, J. L., Saito, Y., Minato, N., and Saito, T. (2009). Involvement of Rap-1 activation and early termination of immune synapse in CTLA-4-mediated negative signal. *Hematology* 14, 150-158.
- Hashimoto-Tane, A., and Saito, T. (2016). Dynamic Regulation of TCR-Microclusters and the Microsynapse for T Cell Activation. *Frontiers in immunology* 7, 255.
- Hashimoto-Tane, A., Sakuma, M., Ike, H., Yokosuka, T., Kimura, Y., Ohara, O., and Saito, T. (2016). Micro-adhesion rings surrounding TCR microclusters are essential for T cell activation. *The Journal of experimental medicine* 213, 1609-1625.
- Heath, W. R., and Carbone, F. R. (2009). Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nature immunology* 10, 1237-1244.
- Heibein, J. A., Goping, I. S., Barry, M., Pinkoski, M. J., Shore, G. C., Green, D. R., and Bleackley, R. C. (2000). Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *The Journal of experimental medicine* 192, 1391-1402.
- Herberman, R. B., and Holden, H. T. (1978). Natural cell-mediated immunity. *Advances in cancer research* 27, 305-377.
- Higgins, J. M., Cernadas, M., Tan, K., Irie, A., Wang, J., Takada, Y., and Brenner, M. B. (2000). The role of alpha and beta chains in ligand recognition by beta 7 integrins. *The Journal of biological chemistry* 275, 25652-25664.
- Higgins, J. M., Mandelbrot, D. A., Shaw, S. K., Russell, G. J., Murphy, E. A., Chen, Y. T., Nelson, W. J., Parker, C. M., and Brenner, M. B. (1998). Direct and regulated interaction of integrin alphaE beta7 with E-cadherin. *The Journal of cell biology* 140, 197-210.
- Holt, O., Kanno, E., Bossi, G., Booth, S., Daniele, T., Santoro, A., Arico, M., Saegusa, C., Fukuda, M., and Griffiths, G. M. (2008). Slp1 and Slp2-a localize to the plasma membrane of CTL and contribute to secretion from the immunological synapse. *Traffic* 9, 446-457.
- Homey, B., Muller, A., and Zlotnik, A. (2002). Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nature reviews Immunology* 2, 175-184.
- Hosseini, B. H., Louban, I., Djandji, D., Wabnitz, G. H., Deeg, J., Bulbuc, N., Samstag, Y., Gunzer, M., Spatz, J. P., and Hammerling, G. J. (2009). Immune synapse formation determines interaction forces between T cells and antigen-presenting cells measured by atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 17852-17857.

- Hu, Y. L., Lu, S., Szeto, K. W., Sun, J., Wang, Y., Lasheras, J. C., and Chien, S. (2014). FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells. *Scientific reports* 4, 6024.
- Humphries, M. J., McEwan, P. A., Barton, S. J., Buckley, P. A., Bella, J., and Mould, A. P. (2003). Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. *Trends in biochemical sciences* 28, 313-320.
- Huse, M. (2012). Microtubule-organizing center polarity and the immunological synapse: protein kinase C and beyond. *Frontiers in immunology* 3, 235.
- Huse, M., Klein, L. O., Girvin, A. T., Faraj, J. M., Li, Q. J., Kuhns, M. S., and Davis, M. M. (2007). Spatial and temporal dynamics of T cell receptor signaling with a photoactivatable agonist. *Immunity* 27, 76-88.
- Huse, M., Quann, E. J., and Davis, M. M. (2008). Shouts, whispers and the kiss of death: directional secretion in T cells. *Nature immunology* 9, 1105-1111.
- Husson, J., Chemin, K., Bohineust, A., Hivroz, C., and Henry, N. (2011). Force generation upon T cell receptor engagement. *PloS one* 6, e19680.
- Igney, F. H., and Krammer, P. H. (2005). Tumor counterattack: fact or fiction? *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 54, 1127-1136.
- Irvine, D. J., Purbhoo, M. A., Krogsgaard, M., and Davis, M. M. (2002). Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature* 419, 845-849.
- Ithychanda, S. S., Das, M., Ma, Y. Q., Ding, K., Wang, X., Gupta, S., Wu, C., Plow, E. F., and Qin, J. (2009). Migfilin, a molecular switch in regulation of integrin activation. *The Journal of biological chemistry* 284, 4713-4722.
- Iwasaki, T., Nakata, A., Mukai, M., Shinkai, K., Yano, H., Sabe, H., Schaefer, E., Tatsuta, M., Tsujimura, T., Terada, N., *et al.* (2002). Involvement of phosphorylation of Tyr-31 and Tyr-118 of paxillin in MM1 cancer cell migration. *International journal of cancer* 97, 330-335.
- Izquierdo, J. H., Bonilla-Abadia, F., Canas, C. A., and Tobon, G. J. (2014). Calcium, channels, intracellular signaling and autoimmunity. *Reumatol Clin* 10, 43-47.
- Jaensson, E., Uronen-Hansson, H., Pabst, O., Eksteen, B., Tian, J., Coombes, J. L., Berg, P. L., Davidsson, T., Powrie, F., Johansson-Lindbom, B., and Agace, W. W. (2008). Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *The Journal of experimental medicine* 205, 2139-2149.
- Janssen, E., Tohme, M., Hedayat, M., Leick, M., Kumari, S., Ramesh, N., Massaad, M. J., Ullas, S., Azcutia, V., Goodnow, C. C., *et al.* (2016). A DOCK8-WIP-WASp complex links T cell receptors to the actin cytoskeleton. *The Journal of clinical investigation* 126, 3837-3851.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61, 69-90.
- Jenkinson, S. E., Whawell, S. A., Swales, B. M., Corps, E. M., Kilshaw, P. J., and Farthing, P. M. (2011). The alphaE(CD103)beta7 integrin interacts with oral and skin keratinocytes in an E-cadherin-independent manner*. *Immunology* 132, 188-196.
- Jiang, X., Clark, R. A., Liu, L., Wagers, A. J., Fuhlbrigge, R. C., and Kupper, T. S. (2012). Skin infection generates non-migratory memory CD8+ T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature* 483, 227-231.
- Kabouridis, P. S. (2006). Lipid rafts in T cell receptor signalling. *Molecular membrane biology* 23, 49-57.
- Kaech, S. M., Hemby, S., Kersh, E., and Ahmed, R. (2002). Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* 111, 837-851.
- Kaiser, A., Donnadieu, E., Abastado, J. P., Trautmann, A., and Nardin, A. (2005). CC chemokine ligand 19 secreted by mature dendritic cells increases naive T cell scanning behavior and their response to rare cognate antigen. *J Immunol* 175, 2349-2356.

- Kaizuka, Y., Douglass, A. D., Varma, R., Dustin, M. L., and Vale, R. D. (2007). Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 20296-20301.
- Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 7556-7561.
- Karin, M., and Delhase, M. (2000). The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Seminars in immunology* *12*, 85-98.
- Katagiri, K., Shimonaka, M., and Kinashi, T. (2004). Rap1-mediated lymphocyte function-associated antigen-1 activation by the T cell antigen receptor is dependent on phospholipase C-gamma1. *The Journal of biological chemistry* *279*, 11875-11881.
- Khazen, R., Muller, S., Gaudenzio, N., Espinosa, E., Puissegur, M. P., and Valitutti, S. (2016). Melanoma cell lysosome secretory burst neutralizes the CTL-mediated cytotoxicity at the lytic synapse. *Nature communications* *7*, 10823.
- Khong, H. T., and Restifo, N. P. (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nature immunology* *3*, 999-1005.
- Kiema, T., Lad, Y., Jiang, P., Oxley, C. L., Baldassarre, M., Wegener, K. L., Campbell, I. D., Ylanne, J., and Calderwood, D. A. (2006). The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Molecular cell* *21*, 337-347.
- Kilic, A., Landreneau, R. J., Luketich, J. D., Pennathur, A., and Schuchert, M. J. (2011). Density of tumor-infiltrating lymphocytes correlates with disease recurrence and survival in patients with large non-small-cell lung cancer tumors. *J Surg Res* *167*, 207-210.
- Kilshaw, P. J. (1999). Alpha E beta 7. *Molecular pathology : MP* *52*, 203-207.
- Kilshaw, P. J., and Baker, K. C. (1988). A unique surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the mouse. *Immunology letters* *18*, 149-154.
- Kim, M., Carman, C. V., and Springer, T. A. (2003). Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science (New York, NY)* *301*, 1720-1725.
- Klapholz, B., Herbert, S. L., Wellmann, J., Johnson, R., Parsons, M., and Brown, N. H. (2015). Alternative mechanisms for talin to mediate integrin function. *Current biology : CB* *25*, 847-857.
- Kuhn, J. R., and Poenie, M. (2002). Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing. *Immunity* *16*, 111-121.
- Kuhne, M. R., Lin, J., Yablonski, D., Mollenauer, M. N., Ehrlich, L. I., Huppa, J., Davis, M. M., and Weiss, A. (2003). Linker for activation of T cells, zeta-associated protein-70, and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein-76 are required for TCR-induced microtubule-organizing center polarization. *J Immunol* *171*, 860-866.
- Kumari, S., Depoil, D., Martinelli, R., Judokusumo, E., Carmona, G., Gertler, F. B., Kam, L. C., Carman, C. V., Burkhardt, J. K., Irvine, D. J., and Dustin, M. L. (2015). Actin foci facilitate activation of the phospholipase C-gamma in primary T lymphocytes via the WASP pathway. *eLife* *4*.
- Kupfer, A., and Dennert, G. (1984). Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. *J Immunol* *133*, 2762-2766.
- Kupfer, A., Dennert, G., and Singer, S. J. (1983). Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center within cloned natural killer cells bound to their targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *80*, 7224-7228.

- Kupfer, A., Swain, S. L., and Singer, S. J. (1987). The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. II. Reorientation of the microtubule organizing center and reorganization of the membrane-associated cytoskeleton inside the bound helper T cells. *The Journal of experimental medicine* *165*, 1565-1580.
- Kurioka, K., Wato, M., Iseki, T., Tanaka, A., and Morita, S. (2016). Differential expression of the epithelial mesenchymal transition factors Snail, Slug, Twist, TGF-beta, and E-cadherin in ameloblastoma. *Medical molecular morphology*.
- Lagarrigue, F., Kim, C., and Ginsberg, M. H. (2016). The Rap1-RIAM-talin axis of integrin activation and blood cell function. *Blood* *128*, 479-487.
- Laidlaw, B. J., Zhang, N., Marshall, H. D., Staron, M. M., Guan, T., Hu, Y., Cauley, L. S., Craft, J., and Kaech, S. M. (2014). CD4+ T cell help guides formation of CD103+ lung-resident memory CD8+ T cells during influenza viral infection. *Immunity* *41*, 633-645.
- Lammermann, T., Bader, B. L., Monkley, S. J., Worbs, T., Wedlich-Soldner, R., Hirsch, K., Keller, M., Forster, R., Critchley, D. R., Fassler, R., and Sixt, M. (2008). Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* *453*, 51-55.
- Lange, A., Wickstrom, S. A., Jakobson, M., Zent, R., Sainio, K., and Fassler, R. (2009). Integrin-linked kinase is an adaptor with essential functions during mouse development. *Nature* *461*, 1002-1006.
- Larson, R. S., Corbi, A. L., Berman, L., and Springer, T. (1989). Primary structure of the leukocyte function-associated molecule-1 alpha subunit: an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily. *The Journal of cell biology* *108*, 703-712.
- Laudanna, C., Kim, J. Y., Constantin, G., and Butcher, E. (2002). Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunological reviews* *186*, 37-46.
- Lawson, C., and Schlaepfer, D. D. (2012). Integrin adhesions: who's on first? What's on second? Connections between FAK and talin. *Cell adhesion & migration* *6*, 302-306.
- Le Floch, A., Jalil, A., Franciszkiewicz, K., Validire, P., Vergnon, I., and Mami-Chouaib, F. (2011). Minimal engagement of CD103 on cytotoxic T lymphocytes with an E-cadherin-Fc molecule triggers lytic granule polarization via a phospholipase Cgamma-dependent pathway. *Cancer research* *71*, 328-338.
- Le Floch, A., Jalil, A., Vergnon, I., Le Maux Chansac, B., Lazar, V., Bismuth, G., Chouaib, S., and Mami-Chouaib, F. (2007). Alpha E beta 7 integrin interaction with E-cadherin promotes antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis. *The Journal of experimental medicine* *204*, 559-570.
- Lee, H. S., Lim, C. J., Puzon-McLaughlin, W., Shattil, S. J., and Ginsberg, M. H. (2009). RIAM activates integrins by linking talin to ras GTPase membrane-targeting sequences. *The Journal of biological chemistry* *284*, 5119-5127.
- Lee, K. H., Dinner, A. R., Tu, C., Campi, G., Raychaudhuri, S., Varma, R., Sims, T. N., Burack, W. R., Wu, H., Wang, J., *et al.* (2003). The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science (New York, NY)* *302*, 1218-1222.
- Lee, K. H., Holdorf, A. D., Dustin, M. L., Chan, A. C., Allen, P. M., and Shaw, A. S. (2002). T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science (New York, NY)* *295*, 1539-1542.
- Lee, M. K., Pardoux, C., Hall, M. C., Lee, P. S., Warburton, D., Qing, J., Smith, S. M., and Derynck, R. (2007). TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *The EMBO journal* *26*, 3957-3967.
- Lee, Y. C., Chang, A. Y., Lin-Feng, M. H., Tsou, W. I., Chiang, I. H., and Lai, M. Z. (2012). Paxillin phosphorylation by JNK and p38 is required for NFAT activation. *European journal of immunology* *42*, 2165-2175.
- Legate, K. R., Wickstrom, S. A., and Fassler, R. (2009). Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev* *23*, 397-418.

- Lehmann, J., Huehn, J., de la Rosa, M., Maszyzna, F., Kretschmer, U., Krenn, V., Brunner, M., Scheffold, A., and Hamann, A. (2002). Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25⁺ as well as CD25⁻ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 13031-13036.
- Lek, H. S., Morrison, V. L., Conneely, M., Campbell, P. A., McGloin, D., Kliche, S., Watts, C., Prescott, A., and Fagerholm, S. C. (2013). The spontaneously adhesive leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) integrin in effector T cells mediates rapid actin- and calmodulin-dependent adhesion strengthening to ligand under shear flow. *The Journal of biological chemistry* *288*, 14698-14708.
- Lev, S., Moreno, H., Martinez, R., Canoll, P., Peles, E., Musacchio, J. M., Plowman, G. D., Rudy, B., and Schlessinger, J. (1995). Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* *376*, 737-745.
- Lewis, R. S. (2001). Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annual review of immunology* *19*, 497-521.
- Li, C., Jiao, S., Wang, G., Gao, Y., Liu, C., He, X., Zhang, C., Xiao, J., Li, W., Zhang, G., *et al.* (2015). The Immune Adaptor ADAP Regulates Reciprocal TGF-beta1-Integrin Crosstalk to Protect from Influenza Virus Infection. *PLoS pathogens* *11*, e1004824.
- Li, D., Molldrem, J. J., and Ma, Q. (2009). LFA-1 regulates CD8⁺ T cell activation via T cell receptor-mediated and LFA-1-mediated Erk1/2 signal pathways. *The Journal of biological chemistry* *284*, 21001-21010.
- Li, R., Mitra, N., Gratkowski, H., Vilaire, G., Litvinov, R., Nagasami, C., Weisel, J. W., Lear, J. D., DeGrado, W. F., and Bennett, J. S. (2003). Activation of integrin alphaIIb beta3 by modulation of transmembrane helix associations. *Science (New York, NY)* *300*, 795-798.
- Liddington, R. C., and Ginsberg, M. H. (2002). Integrin activation takes shape. *The Journal of cell biology* *158*, 833-839.
- Lieberman, J., and Fan, Z. (2003). Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Current opinion in immunology* *15*, 553-559.
- Lietha, D., Cai, X., Ceccarelli, D. F., Li, Y., Schaller, M. D., and Eck, M. J. (2007). Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell* *129*, 1177-1187.
- Liu, J., Wang, Z., Thinn, A. M., Ma, Y. Q., and Zhu, J. (2015). The dual structural roles of the membrane distal region of the alpha-integrin cytoplasmic tail during integrin inside-out activation. *Journal of cell science* *128*, 1718-1731.
- Liu, K., Anthony, B. A., Yearsly, M. M., Hamadani, M., Gaughan, A., Wang, J. J., Devine, S. M., and Hadley, G. A. (2011). CD103 deficiency prevents graft-versus-host disease but spares graft-versus-tumor effects mediated by alloreactive CD8 T cells. *PloS one* *6*, e21968.
- Liu, S., and Ginsberg, M. H. (2000). Paxillin binding to a conserved sequence motif in the alpha 4 integrin cytoplasmic domain. *The Journal of biological chemistry* *275*, 22736-22742.
- Liu, S., Thomas, S. M., Woodside, D. G., Rose, D. M., Kiosses, W. B., Pfaff, M., and Ginsberg, M. H. (1999). Binding of paxillin to alpha4 integrins modifies integrin-dependent biological responses. *Nature* *402*, 676-681.
- Lobert, V. H., and Stenmark, H. (2012). The ESCRT machinery mediates polarization of fibroblasts through regulation of myosin light chain. *Journal of cell science* *125*, 29-36.
- Lou, Y., Vitalis, T. Z., Basha, G., Cai, B., Chen, S. S., Choi, K. B., Jeffries, A. P., Elliott, W. M., Atkins, D., Seliger, B., and Jefferies, W. A. (2005). Restoration of the expression of transporters associated with antigen processing in lung carcinoma increases tumor-specific immune responses and survival. *Cancer research* *65*, 7926-7933.
- Lu, C. F., and Springer, T. A. (1997). The alpha subunit cytoplasmic domain regulates the assembly and adhesiveness of integrin lymphocyte function-associated antigen-1. *J Immunol* *159*, 268-278.

- Luo, B. H., Carman, C. V., and Springer, T. A. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annual review of immunology* 25, 619-647.
- Luo, B. H., and Springer, T. A. (2006). Integrin structures and conformational signaling. *Current opinion in cell biology* 18, 579-586.
- Luo, K. (2017). Signaling Cross Talk between TGF-beta/Smad and Other Signaling Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9.
- Luster, A. D., and Leder, P. (1993). IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo. *The Journal of experimental medicine* 178, 1057-1065.
- Ma, J. S., Monu, N., Shen, D. T., Mecklenbrauker, I., Radoja, N., Haydar, T. F., Leitges, M., Frey, A. B., Vukmanovic, S., and Radoja, S. (2007). Protein kinase Cdelta regulates antigen receptor-induced lytic granule polarization in mouse CD8+ CTL. *J Immunol* 178, 7814-7821.
- Ma, Y. Q., Qin, J., Wu, C., and Plow, E. F. (2008). Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of beta3 integrins. *The Journal of cell biology* 181, 439-446.
- Mace, E. M., Zhang, J., Siminovitch, K. A., and Takei, F. (2010). Elucidation of the integrin LFA-1-mediated signaling pathway of actin polarization in natural killer cells. *Blood* 116, 1272-1279.
- Mackay, L. K., Minnich, M., Kragten, N. A., Liao, Y., Nota, B., Seillet, C., Zaid, A., Man, K., Preston, S., Freestone, D., *et al.* (2016). Hobit and Blimp1 instruct a universal transcriptional program of tissue residency in lymphocytes. *Science (New York, NY)* 352, 459-463.
- Mackay, L. K., Stock, A. T., Ma, J. Z., Jones, C. M., Kent, S. J., Mueller, S. N., Heath, W. R., Carbone, F. R., and Gebhardt, T. (2012). Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 7037-7042.
- Mackay, L. K., Wynne-Jones, E., Freestone, D., Pellicci, D. G., Mielke, L. A., Newman, D. M., Braun, A., Masson, F., Kallies, A., Belz, G. T., and Carbone, F. R. (2015). T-box Transcription Factors Combine with the Cytokines TGF-beta and IL-15 to Control Tissue-Resident Memory T Cell Fate. *Immunity* 43, 1101-1111.
- Maleckar, J. R., and Sherman, L. A. (1987). The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice. *J Immunol* 138, 3873-3876.
- March, M. E., and Long, E. O. (2011). beta2 integrin induces TCRzeta-Syk-phospholipase C-gamma phosphorylation and paxillin-dependent granule polarization in human NK cells. *J Immunol* 186, 2998-3005.
- Maric, M., and Liu, Y. (1999). Strong cytotoxic T lymphocyte responses to a macrophage inflammatory protein 1alpha-expressing tumor: linkage between inflammation and specific immunity. *Cancer research* 59, 5549-5553.
- Marshall, M. R., Pattu, V., Halimani, M., Maier-Peuschel, M., Muller, M. L., Becherer, U., Hong, W., Hoth, M., Tschernig, T., Bryceson, Y. T., and Rettig, J. (2015). VAMP8-dependent fusion of recycling endosomes with the plasma membrane facilitates T lymphocyte cytotoxicity. *The Journal of cell biology* 210, 135-151.
- Marsland, B. J., Soos, T. J., Spath, G., Littman, D. R., and Kopf, M. (2004). Protein kinase C theta is critical for the development of in vivo T helper (Th)2 cell but not Th1 cell responses. *The Journal of experimental medicine* 200, 181-189.
- Martin-Cofreces, N. B., Sancho, D., Fernandez, E., Vicente-Manzanares, M., Gordon-Alonso, M., Montoya, M. C., Michel, F., Acuto, O., Alarcon, B., and Sanchez-Madrid, F. (2006). Role of Fyn in the rearrangement of tubulin cytoskeleton induced through TCR. *J Immunol* 176, 4201-4207.
- Martinez-Lostao, L., Anel, A., and Pardo, J. (2015). How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21, 5047-5056.

- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology* 12, 991-1045.
- Mazaki, Y., Hashimoto, S., and Sabe, H. (1997). Monocyte cells and cancer cells express novel paxillin isoforms with different binding properties to focal adhesion proteins. *The Journal of biological chemistry* 272, 7437-7444.
- Mazerolles, F., Barbat, C., Hivroz, C., and Fischer, A. (1996). Phosphatidylinositol 3-kinase participates in p56(lck)/CD4-dependent down-regulation of LFA-1-mediated T cell adhesion. *J Immunol* 157, 4844-4854.
- McDonald, P. C., Oloumi, A., Mills, J., Dobрева, I., Maidan, M., Gray, V., Wederell, E. D., Bally, M. B., Foster, L. J., and Dedhar, S. (2008). Rictor and integrin-linked kinase interact and regulate Akt phosphorylation and cancer cell survival. *Cancer research* 68, 1618-1624.
- McGavern, D. B., Christen, U., and Oldstone, M. B. (2002). Molecular anatomy of antigen-specific CD8(+) T cell engagement and synapse formation in vivo. *Nature immunology* 3, 918-925.
- Mehrbod, M., and Mofrad, M. R. (2013). Localized lipid packing of transmembrane domains impedes integrin clustering. *PLoS computational biology* 9, e1002948.
- Mempel, T. R., Henrickson, S. E., and Von Andrian, U. H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427, 154-159.
- Menasche, G., Kliche, S., Chen, E. J., Stradal, T. E., Schraven, B., and Koretzky, G. (2007). RIAM links the ADAP/SKAP-55 signaling module to Rap1, facilitating T-cell-receptor-mediated integrin activation. *Molecular and cellular biology* 27, 4070-4081.
- Menasche, G., Menager, M. M., Lefebvre, J. M., Deutsch, E., Athman, R., Lambert, N., Mahlaoui, N., Court, M., Garin, J., Fischer, A., and de Saint Basile, G. (2008). A newly identified isoform of Slp2a associates with Rab27a in cytotoxic T cells and participates to cytotoxic granule secretion. *Blood* 112, 5052-5062.
- Metkar, S. S., Wang, B., Aguilar-Santelises, M., Raja, S. M., Uhlin-Hansen, L., Podack, E., Trapani, J. A., and Froelich, C. J. (2002). Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity* 16, 417-428.
- Michael, K. E., Dumbauld, D. W., Burns, K. L., Hanks, S. K., and Garcia, A. J. (2009). Focal adhesion kinase modulates cell adhesion strengthening via integrin activation. *Molecular biology of the cell* 20, 2508-2519.
- Mitra, S. K., Hanson, D. A., and Schlaepfer, D. D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature reviews Molecular cell biology* 6, 56-68.
- Moingeon, P. E., Lucich, J. L., Stebbins, C. C., Recny, M. A., Wallner, B. P., Koyasu, S., and Reinherz, E. L. (1991). Complementary roles for CD2 and LFA-1 adhesion pathways during T cell activation. *European journal of immunology* 21, 605-610.
- Mokrani, M., Klibi, J., Bluteau, D., Bismuth, G., and Mami-Chouaib, F. (2014). Smad and NFAT pathways cooperate to induce CD103 expression in human CD8 T lymphocytes. *J Immunol* 192, 2471-2479.
- Molon, B., Gri, G., Bettella, M., Gomez-Mouton, C., Lanzavecchia, A., Martinez, A. C., Manes, S., and Viola, A. (2005). T cell costimulation by chemokine receptors. *Nature immunology* 6, 465-471.
- Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82-86.
- Monks, C. R., Kupfer, H., Tamir, I., Barlow, A., and Kupfer, A. (1997). Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation. *Nature* 385, 83-86.
- Mory, A., Feigelson, S. W., Yarali, N., Kilic, S. S., Bayhan, G. I., Gershoni-Baruch, R., Etzioni, A., and Alon, R. (2008). Kindlin-3: a new gene involved in the pathogenesis of LAD-III. *Blood* 112, 2591.

- Mrass, P., Takano, H., Ng, L. G., Daxini, S., Lasaro, M. O., Iparraguirre, A., Cavanagh, L. L., von Andrian, U. H., Ertl, H. C., Haydon, P. G., and Weninger, W. (2006). Random migration precedes stable target cell interactions of tumor-infiltrating T cells. *The Journal of experimental medicine* *203*, 2749-2761.
- Mueller, S. N., and Mackay, L. K. (2016). Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nature reviews Immunology* *16*, 79-89.
- Mule, J. J., Custer, M., Averbook, B., Yang, J. C., Weber, J. S., Goeddel, D. V., Rosenberg, S. A., and Schall, T. J. (1996). RANTES secretion by gene-modified tumor cells results in loss of tumorigenicity in vivo: role of immune cell subpopulations. *Human gene therapy* *7*, 1545-1553.
- Murali-Krishna, K., Altman, J. D., Suresh, M., Sourdive, D. J., Zajac, A. J., Miller, J. D., Slansky, J., and Ahmed, R. (1998). Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* *8*, 177-187.
- Neumann, E., Khawaja, K., and Muller-Ladner, U. (2014). G protein-coupled receptors in rheumatology. *Nature reviews Rheumatology* *10*, 429-436.
- Ng, L. G., Mrass, P., Kinjyo, I., Reiner, S. L., and Weninger, W. (2008). Two-photon imaging of effector T-cell behavior: lessons from a tumor model. *Immunological reviews* *221*, 147-162.
- Nikolopoulos, S. N., and Turner, C. E. (2000). Actopaxin, a new focal adhesion protein that binds paxillin LD motifs and actin and regulates cell adhesion. *The Journal of cell biology* *151*, 1435-1448.
- Nikolopoulos, S. N., and Turner, C. E. (2001). Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions. *The Journal of biological chemistry* *276*, 23499-23505.
- Nirschl, C. J., and Drake, C. G. (2013). Molecular pathways: coexpression of immune checkpoint molecules: signaling pathways and implications for cancer immunotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *19*, 4917-4924.
- Nohara, L. L., Stanwood, S. R., Omilusik, K. D., and Jefferies, W. A. (2015). Tweeters, Woofers and Horns: The Complex Orchestration of Calcium Currents in T Lymphocytes. *Frontiers in immunology* *6*, 234.
- Norcross, M. A. (1984). A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Annales d'immunologie* *135D*, 113-134.
- Nordenfelt, P., Elliott, H. L., and Springer, T. A. (2016). Coordinated integrin activation by actin-dependent force during T-cell migration. *Nature communications* *7*, 13119.
- O'Connor, P. (2007). Natalizumab and the role of alpha 4-integrin antagonism in the treatment of multiple sclerosis. *Expert opinion on biological therapy* *7*, 123-136.
- O'Keefe, J. P., Blaine, K., Alegre, M. L., and Gajewski, T. F. (2004). Formation of a central supramolecular activation cluster is not required for activation of naive CD8+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 9351-9356.
- O'Toole, T. E., Katagiri, Y., Faull, R. J., Peter, K., Tamura, R., Quaranta, V., Loftus, J. C., Shattil, S. J., and Ginsberg, M. H. (1994). Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *The Journal of cell biology* *124*, 1047-1059.
- O'Toole, T. E., Mandelman, D., Forsyth, J., Shattil, S. J., Plow, E. F., and Ginsberg, M. H. (1991). Modulation of the affinity of integrin alpha IIb beta 3 (GPIIb-IIIa) by the cytoplasmic domain of alpha IIb. *Science (New York, NY)* *254*, 845-847.
- Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V. J., Richardson, A. L., and Weinberg, R. A. (2005). Stromal fibroblasts present in

- invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121, 335-348.
- Oshitani, N., Watanabe, K., Maeda, K., Fujiwara, Y., Higuchi, K., Matsumoto, T., and Arakawa, T. (2003). Differential expression of homing receptor CD103 on lamina propria lymphocytes and association of CD103 with epithelial adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *International journal of molecular medicine* 12, 715-719.
- Ott, P. A., Hodi, F. S., and Robert, C. (2013). CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19, 5300-5309.
- Overstreet, M. G., Gaylo, A., Angermann, B. R., Hughson, A., Hyun, Y. M., Lambert, K., Acharya, M., Billroth-Maclurg, A. C., Rosenberg, A. F., Topham, D. J., *et al.* (2013). Inflammation-induced interstitial migration of effector CD4(+) T cells is dependent on integrin alphaV. *Nature immunology* 14, 949-958.
- Oxley, C. L., Anthis, N. J., Lowe, E. D., Vakonakis, I., Campbell, I. D., and Wegener, K. L. (2008). An integrin phosphorylation switch: the effect of beta3 integrin tail phosphorylation on Dok1 and talin binding. *The Journal of biological chemistry* 283, 5420-5426.
- Pages, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M. C., Tartour, E., Sautes-Fridman, C., and Fridman, W. H. (2010). Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 29, 1093-1102.
- Pan, L., Zhao, Y., Yuan, Z., and Qin, G. (2016). Research advances on structure and biological functions of integrins. *SpringerPlus* 5, 1094.
- Pandiyani, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., and Lenardo, M. J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature immunology* 8, 1353-1362.
- Parker, C. M., Cepek, K. L., Russell, G. J., Shaw, S. K., Posnett, D. N., Schwarting, R., and Brenner, M. B. (1992). A family of beta 7 integrins on human mucosal lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 1924-1928.
- Passlick, B., Pantel, K., Kubuschok, B., Angstwurm, M., Neher, A., Thetter, O., Schweiberer, L., and Izbicki, J. R. (1996). Expression of MHC molecules and ICAM-1 on non-small cell lung carcinomas: association with early lymphatic spread of tumour cells. *Eur J Cancer* 32A, 141-145.
- Perl, A. K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., and Christofori, G. (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 392, 190-193.
- Petit, V., Boyer, B., Lentz, D., Turner, C. E., Thiery, J. P., and Valles, A. M. (2000). Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells. *The Journal of cell biology* 148, 957-970.
- Pfaff, M., Liu, S., Erle, D. J., and Ginsberg, M. H. (1998). Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins. *The Journal of biological chemistry* 273, 6104-6109.
- Piet, B., de Bree, G. J., Smids-Dierdorp, B. S., van der Loos, C. M., Remmerswaal, E. B., von der Thusen, J. H., van Haarst, J. M., Eerenberg, J. P., ten Brinke, A., van der Bij, W., *et al.* (2011). CD8(+) T cells with an intraepithelial phenotype upregulate cytotoxic function upon influenza infection in human lung. *The Journal of clinical investigation* 121, 2254-2263.
- Playford, M. P., and Schaller, M. D. (2004). The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* 23, 7928-7946.
- Porter, J. C., Bracke, M., Smith, A., Davies, D., and Hogg, N. (2002). Signaling through integrin LFA-1 leads to filamentous actin polymerization and remodeling, resulting in enhanced T cell adhesion. *J Immunol* 168, 6330-6335.

- Potter, T. A., Grebe, K., Freiberg, B., and Kupfer, A. (2001). Formation of supramolecular activation clusters on fresh ex vivo CD8+ T cells after engagement of the T cell antigen receptor and CD8 by antigen-presenting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 12624-12629.
- Pribila, J. T., Quale, A. C., Mueller, K. L., and Shimizu, Y. (2004). Integrins and T cell-mediated immunity. *Annual review of immunology* 22, 157-180.
- Pu, S., Qin, B., He, H., Zhan, J., Wu, Q., Zhang, X., Yang, L., Qu, C., and Zhou, Z. (2016). Identification of early myeloid progenitors as immunosuppressive cells. *Scientific reports* 6, 23115.
- Purbhoo, M. A., Irvine, D. J., Huppa, J. B., and Davis, M. M. (2004). T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nature immunology* 5, 524-530.
- Qadota, H., Moerman, D. G., and Benian, G. M. (2012). A molecular mechanism for the requirement of PAT-4 (integrin-linked kinase (ILK)) for the localization of UNC-112 (Kindlin) to integrin adhesion sites. *The Journal of biological chemistry* 287, 28537-28551.
- Qin, A., Coffey, D. G., Warren, E. H., and Ramnath, N. (2016). Mechanisms of immune evasion and current status of checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer. *Cancer medicine*.
- Quann, E. J., Liu, X., Altan-Bonnet, G., and Huse, M. (2011). A cascade of protein kinase C isozymes promotes cytoskeletal polarization in T cells. *Nature immunology* 12, 647-654.
- Quinn, E., Hawkins, N., Yip, Y. L., Suter, C., and Ward, R. (2003). CD103+ intraepithelial lymphocytes--a unique population in microsatellite unstable sporadic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 39, 469-475.
- Randriamampita, C., and Lellouch, A. C. (2014). Imaging early signaling events in T lymphocytes with fluorescent biosensors. *Biotechnology journal* 9, 203-212.
- Randriamampita, C., and Trautmann, A. (2004). Ca²⁺ signals and T lymphocytes; "New mechanisms and functions in Ca²⁺ signalling". *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 96, 69-78.
- Reck, M., Rodriguez-Abreu, D., Robinson, A. G., Hui, R., Csoszi, T., Fulop, A., Gottfried, M., Peled, N., Tafreshi, A., Cuffe, S., *et al.* (2016). Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 375, 1823-1833.
- Rees, D. J., Ades, S. E., Singer, S. J., and Hynes, R. O. (1990). Sequence and domain structure of talin. *Nature* 347, 685-689.
- Ren, X., Ye, F., Jiang, Z., Chu, Y., Xiong, S., and Wang, Y. (2007). Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Cell death and differentiation* 14, 2076-2084.
- Revy, P., Sospedra, M., Barbour, B., and Trautmann, A. (2001). Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nature immunology* 2, 925-931.
- Richie, L. I., Ebert, P. J., Wu, L. C., Krummel, M. F., Owen, J. J., and Davis, M. M. (2002). Imaging synapse formation during thymocyte selection: inability of CD3zeta to form a stable central accumulation during negative selection. *Immunity* 16, 595-606.
- Rietzler, M., Bittner, M., Kolanus, W., Schuster, A., and Holzmann, B. (1998). The human WD repeat protein WAIT-1 specifically interacts with the cytoplasmic tails of beta7-integrins. *The Journal of biological chemistry* 273, 27459-27466.
- Robertson, L. K., and Ostergaard, H. L. (2011). Paxillin associates with the microtubule cytoskeleton and the immunological synapse of CTL through its leucine-aspartic acid domains and contributes to microtubule organizing center reorientation. *J Immunol* 187, 5824-5833.

- Robinson, P. W., Green, S. J., Carter, C., Coadwell, J., and Kilshaw, P. J. (2001). Studies on transcriptional regulation of the mucosal T-cell integrin alphaEbeta7 (CD103). *Immunology* *103*, 146-154.
- Roca-Cusachs, P., del Rio, A., Puklin-Faucher, E., Gauthier, N. C., Biais, N., and Sheetz, M. P. (2013). Integrin-dependent force transmission to the extracellular matrix by alpha-actinin triggers adhesion maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, E1361-1370.
- Romanova, L. Y., and Mushinski, J. F. (2011). Central role of paxillin phosphorylation in regulation of LFA-1 integrins activity and lymphocyte migration. *Cell adhesion & migration* *5*, 457-462.
- Rose, D. M., Liu, S., Woodside, D. G., Han, J., Schlaepfer, D. D., and Ginsberg, M. H. (2003). Paxillin Binding to the 4 Integrin Subunit Stimulates LFA-1 (Integrin L2)-Dependent T Cell Migration by Augmenting the Activation of Focal Adhesion Kinase/Proline-Rich Tyrosine Kinase-2. *The Journal of Immunology* *170*, 5912-5918.
- Rosette, C., Roth, R. B., Oeth, P., Braun, A., Kammerer, S., Ekblom, J., and Denissenko, M. F. (2005). Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* *26*, 943-950.
- Ruffini, E., Asioli, S., Filosso, P. L., Lyberis, P., Bruna, M. C., Macri, L., Daniele, L., and Oliaro, A. (2009). Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in lung neoplasms. *Ann Thorac Surg* *87*, 365-371; discussion 371-362.
- Rumsey, L. M., Teague, R. M., Benedict, S. H., and Chan, M. A. (2001). MIP-1alpha induces activation of phosphatidylinositol-3 kinase that associates with Pyk-2 and is necessary for B-cell migration. *Exp Cell Res* *268*, 77-83.
- Rygaard, J., and Povlsen, C. O. (1974). Is immunological surveillance not a cell-mediated immune function? *Transplantation* *17*, 135-136.
- Sakaguchi, S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology* *6*, 345-352.
- Salazar-Fontana, L. I., Barr, V., Samelson, L. E., and Bierer, B. E. (2003). CD28 engagement promotes actin polymerization through the activation of the small Rho GTPase Cdc42 in human T cells. *J Immunol* *171*, 2225-2232.
- Salerno, E. P., Olson, W. C., McSkimming, C., Shea, S., and Slingluff, C. L., Jr. (2014). T cells in the human metastatic melanoma microenvironment express site-specific homing receptors and retention integrins. *International journal of cancer* *134*, 563-574.
- Salgia, R., Pisick, E., Sattler, M., Li, J. L., Uemura, N., Wong, W. K., Burky, S. A., Hirai, H., Chen, L. B., and Griffin, J. D. (1996). p130CAS forms a signaling complex with the adapter protein CRKL in hematopoietic cells transformed by the BCR/ABL oncogene. *The Journal of biological chemistry* *271*, 25198-25203.
- Sallusto, F., Palermo, B., Lenig, D., Miettinen, M., Matikainen, S., Julkunen, I., Forster, R., Burgstahler, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *European journal of immunology* *29*, 1617-1625.
- Salmon, H., Franciszkiewicz, K., Damotte, D., Dieu-Nosjean, M. C., Validire, P., Trautmann, A., Mami-Chouaib, F., and Donnadieu, E. (2012). Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *The Journal of clinical investigation* *122*, 899-910.
- Saltel, F., Mortier, E., Hytonen, V. P., Jacquier, M. C., Zimmermann, P., Vogel, V., Liu, W., and Wehrle-Haller, B. (2009). New PI(4,5)P2- and membrane proximal integrin-binding motifs in the talin head control beta3-integrin clustering. *The Journal of cell biology* *187*, 715-731.

- Scaffidi, A. K., Petrovic, N., Moodley, Y. P., Fogel-Petrovic, M., Kroeger, K. M., Seeber, R. M., Eidne, K. A., Thompson, P. J., and Knight, D. A. (2004). $\alpha(v)\beta(3)$ Integrin interacts with the transforming growth factor beta (TGF β) type II receptor to potentiate the proliferative effects of TGF β 1 in living human lung fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 279, 37726-37733.
- Schaffner-Reckinger, E., Gouon, V., Melchior, C., Plancon, S., and Kieffer, N. (1998). Distinct involvement of $\beta(3)$ integrin cytoplasmic domain tyrosine residues 747 and 759 in integrin-mediated cytoskeletal assembly and phosphotyrosine signaling. *The Journal of biological chemistry* 273, 12623-12632.
- Schaller, M. D. (2010). Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *Journal of cell science* 123, 1007-1013.
- Schaller, M. D., Otey, C. A., Hildebrand, J. D., and Parsons, J. T. (1995). Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking β integrin cytoplasmic domains. *The Journal of cell biology* 130, 1181-1187.
- Schaller, M. D., and Schaefer, E. M. (2001). Multiple stimuli induce tyrosine phosphorylation of the Crk-binding sites of paxillin. *The Biochemical journal* 360, 57-66.
- Schamel, W. W., Arechaga, I., Risueno, R. M., van Santen, H. M., Cabezas, P., Risco, C., Valpuesta, J. M., and Alarcon, B. (2005). Coexistence of multivalent and monovalent TCRs explains high sensitivity and wide range of response. *The Journal of experimental medicine* 202, 493-503.
- Schlickum, S., Sennefelder, H., Friedrich, M., Harms, G., Lohse, M. J., Kilshaw, P., and Schon, M. P. (2008). Integrin αE (CD103) $\beta 7$ influences cellular shape and motility in a ligand-dependent fashion. *Blood* 112, 619-625.
- Schmidt, S., and Friedl, P. (2010). Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell and tissue research* 339, 83-92.
- Scholer, A., Hugues, S., Boissonnas, A., Fetler, L., and Amigorena, S. (2008). Intercellular adhesion molecule-1-dependent stable interactions between T cells and dendritic cells determine CD8 $^+$ T cell memory. *Immunity* 28, 258-270.
- Schon, M. P., Arya, A., Murphy, E. A., Adams, C. M., Strauch, U. G., Agace, W. W., Marsal, J., Donohue, J. P., Her, H., Beier, D. R., *et al.* (1999). Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin αE (CD103)-deficient mice. *J Immunol* 162, 6641-6649.
- Schreiber, R. D., Old, L. J., and Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science (New York, NY)* 331, 1565-1570.
- Schwartz, M. A., Schaller, M. D., and Ginsberg, M. H. (1995). Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annual review of cell and developmental biology* 11, 549-599.
- Sedda, S., Marafini, I., Dinallo, V., Di Fusco, D., and Monteleone, G. (2015). The TGF- β /Smad System in IBD Pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis* 21, 2921-2925.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-1111.
- Sharifi, M. N., Mowers, E. E., Drake, L. E., Collier, C., Chen, H., Zamora, M., Mui, S., and Macleod, K. F. (2016). Autophagy Promotes Focal Adhesion Disassembly and Cell Motility of Metastatic Tumor Cells through the Direct Interaction of Paxillin with LC3. *Cell reports* 15, 1660-1672.
- Sharma, R., Sung, S. S., Abaya, C. E., Ju, A. C., Fu, S. M., and Ju, S. T. (2009). IL-2 regulates CD103 expression on CD4 $^+$ T cells in Scurfy mice that display both CD103-dependent and independent inflammation. *J Immunol* 183, 1065-1073.

- Shaw, S., Luce, G. E., Quinones, R., Gress, R. E., Springer, T. A., and Sanders, M. E. (1986). Two antigen-independent adhesion pathways used by human cytotoxic T-cell clones. *Nature* *323*, 262-264.
- Shen, D. T., Ma, J. S., Mather, J., Vukmanovic, S., and Radoja, S. (2006). Activation of primary T lymphocytes results in lysosome development and polarized granule exocytosis in CD4⁺ and CD8⁺ subsets, whereas expression of lytic molecules confers cytotoxicity to CD8⁺ T cells. *J Leukoc Biol* *80*, 827-837.
- Sheppard, K. A., Fitz, L. J., Lee, J. M., Benander, C., George, J. A., Wooters, J., Qiu, Y., Jussif, J. M., Carter, L. L., Wood, C. R., and Chaudhary, D. (2004). PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC θ . *FEBS letters* *574*, 37-41.
- Sherman, E., Barr, V., Manley, S., Patterson, G., Balagopalan, L., Akpan, I., Regan, C. K., Merrill, R. K., Sommers, C. L., Lippincott-Schwartz, J., and Samelson, L. E. (2011). Functional nanoscale organization of signaling molecules downstream of the T cell antigen receptor. *Immunity* *35*, 705-720.
- Shi, Y., and Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* *113*, 685-700.
- Shortrede, J. E., Uzair, I. D., Neira, F. J., Flamini, M. I., and Sanchez, A. M. (2016). Paxillin, a novel controller in the signaling of estrogen to FAK/N-WASP/Arp2/3 complex in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* *430*, 56-67.
- Siddiqui, K. R., and Powrie, F. (2008). CD103⁺ GALT DCs promote Foxp3⁺ regulatory T cells. *Mucosal immunology* *1 Suppl 1*, S34-38.
- Smyth, L. J., Kirby, J. A., and Cunningham, A. C. (2007). Role of the mucosal integrin α (E)(CD103) β (7) in tissue-restricted cytotoxicity. *Clinical and experimental immunology* *149*, 162-170.
- Stein, J. V., Rot, A., Luo, Y., Narasimhaswamy, M., Nakano, H., Gunn, M. D., Matsuzawa, A., Quackenbush, E. J., Dorf, M. E., and von Andrian, U. H. (2000). The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (TCA-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6CKine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling T lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules. *The Journal of experimental medicine* *191*, 61-76.
- Steinman, R. M. (2003). The control of immunity and tolerance by dendritic cell. *Pathologie-biologie* *51*, 59-60.
- Stevens, J. M., Jordan, P. A., Sage, T., and Gibbins, J. M. (2004). The regulation of integrin-linked kinase in human platelets: evidence for involvement in the regulation of integrin α 2 β 1. *J Thromb Haemost* *2*, 1443-1452.
- Stewart, M. P., McDowall, A., and Hogg, N. (1998). LFA-1-mediated adhesion is regulated by cytoskeletal restraint and by a Ca²⁺-dependent protease, calpain. *The Journal of cell biology* *140*, 699-707.
- Stinchcombe, J. C., Barral, D. C., Mules, E. H., Booth, S., Hume, A. N., Machesky, L. M., Seabra, M. C., and Griffiths, G. M. (2001). Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of cell biology* *152*, 825-834.
- Strauch, U. G., Mueller, R. C., Li, X. Y., Cernadas, M., Higgins, J. M., Binion, D. G., and Parker, C. M. (2001). Integrin α E(CD103) β 7 mediates adhesion to intestinal microvascular endothelial cell lines via an E-cadherin-independent interaction. *J Immunol* *166*, 3506-3514.
- Street, S. E., Cretney, E., and Smyth, M. J. (2001). Perforin and interferon- γ activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* *97*, 192-197.
- Stutman, O. (1974). Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science (New York, NY)* *183*, 534-536.

- Su, W., Wynne, J., Pinheiro, E. M., Strazza, M., Mor, A., Montenont, E., Berger, J., Paul, D. S., Bergmeier, W., Gertler, F. B., and Philips, M. R. (2015). Rap1 and its effector RIAM are required for lymphocyte trafficking. *Blood* *126*, 2695-2703.
- Suffia, I., Reckling, S. K., Salay, G., and Belkaid, Y. (2005). A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of *Leishmania major* infection. *J Immunol* *174*, 5444-5455.
- Sui, X., Ma, J., Han, W., Wang, X., Fang, Y., Li, D., Pan, H., and Zhang, L. (2015). The anticancer immune response of anti-PD-1/PD-L1 and the genetic determinants of response to anti-PD-1/PD-L1 antibodies in cancer patients. *Oncotarget* *6*, 19393-19404.
- Sulzmaier, F. J., Jean, C., and Schlaepfer, D. D. (2014). FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nature reviews Cancer* *14*, 598-610.
- Suzuki, R., Nakao, A., Kanamaru, Y., Okumura, K., Ogawa, H., and Ra, C. (2002). Localization of intestinal intraepithelial T lymphocytes involves regulation of alphaEbeta7 expression by transforming growth factor-beta. *International immunology* *14*, 339-345.
- Tachimori, A., Yamada, N., Sakate, Y., Yashiro, M., Maeda, K., Ohira, M., Nishino, H., and Hirakawa, K. (2005). Up regulation of ICAM-1 gene expression inhibits tumour growth and liver metastasis in colorectal carcinoma. *Eur J Cancer* *41*, 1802-1810.
- Takagi, J., DeBottis, D. P., Erickson, H. P., and Springer, T. A. (2002). The role of the specificity-determining loop of the integrin beta subunit I-like domain in autonomous expression, association with the alpha subunit, and ligand binding. *Biochemistry* *41*, 4339-4347.
- Takeya, M., and Komohara, Y. (2016). Role of tumor-associated macrophages in human malignancies: friend or foe? *Pathol Int* *66*, 491-505.
- Tamkun, J. W., DeSimone, D. W., Fonda, D., Patel, R. S., Buck, C., Horwitz, A. F., and Hynes, R. O. (1986). Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* *46*, 271-282.
- Tanaka, T., Yamaguchi, R., Sabe, H., Sekiguchi, K., and Healy, J. M. (1996). Paxillin association in vitro with integrin cytoplasmic domain peptides. *FEBS letters* *399*, 53-58.
- Taunk, J., Roberts, A. I., and Ebert, E. C. (1992). Spontaneous cytotoxicity of human intraepithelial lymphocytes against epithelial cell tumors. *Gastroenterology* *102*, 69-75.
- Tavano, R., Contento, R. L., Baranda, S. J., Soligo, M., Tuosto, L., Manes, S., and Viola, A. (2006). CD28 interaction with filamin-A controls lipid raft accumulation at the T-cell immunological synapse. *Nature cell biology* *8*, 1270-1276.
- Teraki, Y., and Shiohara, T. (2002). Preferential expression of alphaEbeta7 integrin (CD103) on CD8+ T cells in the psoriatic epidermis: regulation by interleukins 4 and 12 and transforming growth factor-beta. *The British journal of dermatology* *147*, 1118-1126.
- Theodosiou, M., Widmaier, M., Bottcher, R. T., Rognoni, E., Veelders, M., Bharadwaj, M., Lambacher, A., Austen, K., Muller, D. J., Zent, R., and Fassler, R. (2016). Kindlin-2 cooperates with talin to activate integrins and induces cell spreading by directly binding paxillin. *eLife* *5*, e10130.
- Tiemessen, M. M., Jagger, A. L., Evans, H. G., van Herwijnen, M. J., John, S., and Taams, L. S. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 19446-19451.
- Travis, M. A., Reizis, B., Melton, A. C., Masteller, E., Tang, Q., Proctor, J. M., Wang, Y., Bernstein, X., Huang, X., Reichardt, L. F., *et al.* (2007). Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature* *449*, 361-365.
- Travis, M. A., van der Flier, A., Kammerer, R. A., Mould, A. P., Sonnenberg, A., and Humphries, M. J. (2004). Interaction of filamin A with the integrin beta 7 cytoplasmic domain: role of alternative splicing and phosphorylation. *FEBS letters* *569*, 185-190.

- Tsubouchi, A., Sakakura, J., Yagi, R., Mazaki, Y., Schaefer, E., Yano, H., and Sabe, H. (2002). Localized suppression of RhoA activity by Tyr31/118-phosphorylated paxillin in cell adhesion and migration. *The Journal of cell biology* *159*, 673-683.
- Turner, D. L., and Farber, D. L. (2014). Mucosal resident memory CD4 T cells in protection and immunopathology. *Frontiers in immunology* *5*, 331.
- Underhill, D. M., Bassetti, M., Rudensky, A., and Aderem, A. (1999). Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation. *The Journal of experimental medicine* *190*, 1909-1914.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B. J., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Immunol* *178*, 2617-2621.
- Varga, G., Nippe, N., Balkow, S., Peters, T., Wild, M. K., Seeliger, S., Beissert, S., Krummen, M., Roth, J., Sunderkotter, C., and Grabbe, S. (2010). LFA-1 contributes to signal I of T-cell activation and to the production of T(h)1 cytokines. *The Journal of investigative dermatology* *130*, 1005-1012.
- Varma, R., Campi, G., Yokosuka, T., Saito, T., and Dustin, M. L. (2006). T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity* *25*, 117-127.
- Vestweber, D. (2015). How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nature reviews Immunology* *15*, 692-704.
- Vicari, A. P., and Caux, C. (2002). Chemokines in cancer. *Cytokine & growth factor reviews* *13*, 143-154.
- Vicente-Manzanares, M., and Sanchez-Madrid, F. (2004). Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nature reviews Immunology* *4*, 110-122.
- Vignali, D. A., Collison, L. W., and Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nature reviews Immunology* *8*, 523-532.
- Vinogradova, O., Haas, T., Plow, E. F., and Qin, J. (2000). A structural basis for integrin activation by the cytoplasmic tail of the alpha IIb-subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 1450-1455.
- Wang, G. Q., Wieckowski, E., Goldstein, L. A., Gastman, B. R., Rabinovitz, A., Gambotto, A., Li, S., Fang, B., Yin, X. M., and Rabinowich, H. (2001). Resistance to granzyme B-mediated cytochrome c release in Bak-deficient cells. *The Journal of experimental medicine* *194*, 1325-1337.
- Wang, L., Learoyd, J., Duan, Y., Leff, A. R., and Zhu, X. (2010). Hematopoietic Pyk2 regulates migration of differentiated HL-60 cells. *J Inflamm (Lond)* *7*, 26.
- Wang, W., Zhu, J., Springer, T. A., and Luo, B. H. (2011). Tests of integrin transmembrane domain homo-oligomerization during integrin ligand binding and signaling. *The Journal of biological chemistry* *286*, 1860-1867.
- Wang, Z. Q., Milne, K., Derocher, H., Webb, J. R., Nelson, B. H., and Watson, P. H. (2016). CD103 and Intratumoral Immune Response in Breast Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*.
- Webb, J. R., Milne, K., and Nelson, B. H. (2015). PD-1 and CD103 Are Widely Coexpressed on Prognostically Favorable Intraepithelial CD8 T Cells in Human Ovarian Cancer. *Cancer immunology research* *3*, 926-935.
- Webb, J. R., Milne, K., Watson, P., Deleeuw, R. J., and Nelson, B. H. (2014). Tumor-infiltrating lymphocytes expressing the tissue resident memory marker CD103 are associated with increased survival in high-grade serous ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *20*, 434-444.
- Wiedemann, A., Depoil, D., Faroudi, M., and Valitutti, S. (2006). Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory

- synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 10985-10990.
- Wilkinson, S., Paterson, H. F., and Marshall, C. J. (2005). Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nature cell biology* *7*, 255-261.
- Wohlleber, D., Kashkar, H., Gartner, K., Frings, M. K., Odenthal, M., Hegenbarth, S., Borner, C., Arnold, B., Hammerling, G., Nieswandt, B., *et al.* (2012). TNF-induced target cell killing by CTL activated through cross-presentation. *Cell reports* *2*, 478-487.
- Workel, H. H., Komdeur, F. L., Wouters, M. C., Plat, A., Klip, H. G., Eggink, F. A., Wisman, G. B., Arts, H. J., Oonk, M. H., Mourits, M. J., *et al.* (2016). CD103 defines intraepithelial CD8+ PD1+ tumour-infiltrating lymphocytes of prognostic significance in endometrial adenocarcinoma. *Eur J Cancer* *60*, 1-11.
- Worthington, J. J., Czajkowska, B. I., Melton, A. C., and Travis, M. A. (2011). Intestinal dendritic cells specialize to activate transforming growth factor-beta and induce Foxp3+ regulatory T cells via integrin alphavbeta8. *Gastroenterology* *141*, 1802-1812.
- Worthington, J. J., Kelly, A., Smedley, C., Bauche, D., Campbell, S., Marie, J. C., and Travis, M. A. (2015). Integrin alphavbeta8-Mediated TGF-beta Activation by Effector Regulatory T Cells Is Essential for Suppression of T-Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* *42*, 903-915.
- Wu, Y., Span, L. M., Nygren, P., Zhu, H., Moore, D. T., Cheng, H., Roder, H., DeGrado, W. F., and Bennett, J. S. (2015). The Tyrosine Kinase c-Src Specifically Binds to the Active Integrin alphaIIbbeta3 to Initiate Outside-in Signaling in Platelets. *The Journal of biological chemistry* *290*, 15825-15834.
- Ye, F., Petrich, B. G., Anekal, P., Lefort, C. T., Kasirer-Friede, A., Shattil, S. J., Ruppert, R., Moser, M., Fassler, R., and Ginsberg, M. H. (2013). The mechanism of kindlin-mediated activation of integrin alphaIIbbeta3. *Current biology : CB* *23*, 2288-2295.
- Yokosuka, T., and Saito, T. (2010). The immunological synapse, TCR microclusters, and T cell activation. *Current topics in microbiology and immunology* *340*, 81-107.
- Zaidel-Bar, R., Milo, R., Kam, Z., and Geiger, B. (2007). A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. *Journal of cell science* *120*, 137-148.
- Zhang, M., March, M. E., Lane, W. S., and Long, E. O. (2014). A signaling network stimulated by beta2 integrin promotes the polarization of lytic granules in cytotoxic cells. *Sci Signal* *7*, ra96.
- Zhang, N., and Bevan, M. J. (2013). Transforming growth factor-beta signaling controls the formation and maintenance of gut-resident memory T cells by regulating migration and retention. *Immunity* *39*, 687-696.
- Zhang, X. A., Bontrager, A. L., Stipp, C. S., Kraeft, S. K., Bazzoni, G., Chen, L. B., and Hemler, M. E. (2001). Phosphorylation of a conserved integrin alpha 3 QPSXXE motif regulates signaling, motility, and cytoskeletal engagement. *Molecular biology of the cell* *12*, 351-365.
- Zhang, Y., and Wang, H. (2012). Integrin signalling and function in immune cells. *Immunology* *135*, 268-275.
- Zhao, M., Finlay, D., Zharkikh, I., and Vuori, K. (2016). Novel Role of Src in Priming Pyk2 Phosphorylation. *PloS one* *11*, e0149231.
- Zhu, J., Luo, B. H., Xiao, T., Zhang, C., Nishida, N., and Springer, T. A. (2008a). Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces. *Molecular cell* *32*, 849-861.
- Zhu, X., Boetticher, E., Wang, L., Duan, Y., Learoyd, J., and Leff, A. R. (2008b). Proline-rich tyrosine kinase 2 regulates spreading and migration of eosinophils after beta2-integrin adhesion. *American journal of respiratory cell and molecular biology* *39*, 263-269.

ANNEXES

1. Publication collaborative n°1 :

« Synaptic release of CCL5 storage vesicles triggers CXCR4 surface expression promoting CTL migration in response to CXCL12 »

Franciszkiewicz K, Boutet M, Gauthier L, Vergnon I, Peeters K, Duc O, Besse B, de Saint Basile G, Chouaib S, Mami-Chouaib F.

Journal of Immunology, 2014

Synaptic Release of CCL5 Storage Vesicles Triggers CXCR4 Surface Expression Promoting CTL Migration in Response to CXCL12

Katarzyna Franciszkiewicz,^{*,†,‡,1} Marie Boutet,^{*,†,‡} Ludiane Gauthier,^{*,†,‡}
 Isabelle Vergnon,^{*,†,‡} Kelly Peeters,^{*,†,‡} Olivier Duc,^{*,†,‡} Benjamin Besse,[§]
 Geneviève de Saint Basile,^{¶,||} Salem Chouaib,^{*,†,‡} and Fathia Mami-Chouaib^{*,†,‡}

The lytic function of CTL relies on the polarized release of cytotoxic granules (CG) at the immune synapse (IS) with target cells. CTL also contain CCL5 in cytoplasmic storage vesicles (CCL5V) distinct from CG, the role of which, in regulating T cell effector functions, is not understood. Using human CD8⁺ T cells specific to a lung tumor-associated Ag, we show in this article that CTL release both secretory compartments into the immune synapse with autologous tumor cells. Moreover, we demonstrate that disorganization of the T cell microtubule cytoskeleton and defects in hMunc13-4 or Rab27a abrogate CG exocytosis and synaptic secretion of the chemokine. Mechanistically, synaptic release of CCL5 cytoplasmic storage vesicles likely occurs upon their coalescence with the Rab27a-hMunc13-4 compartment and results in autocrine, CCR5-dependent induction of CXCR4 cell surface expression, thereby promoting T cell migration in response to CXCL12. We propose that CCL5 polarized delivery represents a mechanism by which CTL control immune synapse duration. *The Journal of Immunology*, 2014, 193: 4952–4961.

CD8⁺ T lymphocytes are a key component of the adaptive immune response to tumors and viral infections. Ag-specific CTL exhibit a wide range of functions, including migration to inflammatory sites, TCR-mediated target cell recognition, production of effector cytokines and chemokines, exocytosis of cytotoxic granules (CG), and thereby killing of target cells. Poor or inadequate CD8⁺ T cell immunity is, at least in part, responsible for tumor progression and persistent chronic infection. The CD8⁺ T lymphocyte response is initiated by the interaction of TCR with peptide–MHC class I (pMHC-I) complexes, resulting in rearrangement of surface receptors and signaling components to the contact zone between the T cell and target cell, referred to as an immune synapse (IS). Formation of a cytotoxic IS (cIS) is associated with polarization of the T cell microtubule-organizing center (MTOC) toward the cell–cell interface, which enables the directional delivery of CG, specialized secretory lysosomes that contain perforin and granzymes, toward the target and maintains specificity of the T lymphocyte cytolytic function. Indeed, release of CG content is confined to secretory

clefts that provide a limited space in which cytotoxic agents are kept concentrated for target cell killing without any bystander effect (1–3). Rab27a and hMunc13-4 trafficking proteins are essential for the polarized exocytosis of CG by driving their docking at and fusion with the plasma membrane (4, 5). They are localized on vesicular structures distinct from CG, and both types of granules coalesce together near the plasma membrane to finally deliver the “lethal hit” (6).

Dynamic interactions of T cells with APC are important for the onset of immune responses (7–9). The migratory behavior of T lymphocytes is under the control of the chemokine–chemokine receptor network that regulates their spatiotemporal distribution within lymphoid tissues and recruitment within inflammatory areas and the tumor microenvironment (10, 11). In this context, CCL5 was one of the first chemokines implicated in regulating antitumor immune responses (12). Local production of CCR5 ligands CCL5 and CCL3 was shown to induce mobilization of CD8⁺ T cells and CTL-dependent tumor growth suppression (13). Moreover, recruitment of CCR5 at the IS between tumor-infiltrating lymphocytes and malignant cells contributes to T cell retention at the tumor site by inhibiting T cell responsiveness to CCL5 (14). In addition to their chemotactic properties, chemokines have been suggested to directly regulate T cell development, priming, and effector functions (15). CCL5 has been reported to induce T cell proliferation and lymphokine production and to enhance CTL-mediated cytotoxicity (16–18). Chemokines have also been implicated in T cell costimulation, through engagement of CCR5 and CXCR4 at the IS (19, 20). However, the potential contribution of chemokines to fine-tuning specific cytotoxic immune responses has not been systematically addressed. In this study, we provide further evidence that CTL store CCL5 in cytoplasmic vesicles (CCL5V) distinct from CG (21), and we show that their probable coalescence with the Rab27a-hMunc13-4 compartment at the IS with target cells, triggers, concomitantly with CG exocytosis, synaptic secretion of the chemokine. Remarkably, synaptic, but not multidirectional, secretion of CCL5 induces CXCR4 expression on the T cell surface, thereby pro-

*Unité U753, INSERM, Villejuif 94805, France; [†]Institut de Cancérologie Gustave Roussy, Villejuif 94805, France; [‡]Université Paris-Sud, Orsay 91400, France; [§]Département de Médecine, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, Villejuif 94805, France; [¶]Unité U768, INSERM, Hôpital Necker Enfants-Malades, Paris 75015, France; and ^{||}Université Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité, Institut Imagine, Paris 75015, France

¹Current address: Laboratoire d'Immunologie, U932, Institut Curie, Paris, France.

Received for publication May 9, 2014. Accepted for publication September 8, 2014.

This work was supported by grants from INSERM, the Association pour la Recherche sur le Cancer, and the Institut National du Cancer.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Fathia Mami-Chouaib, INSERM U753, Team 1: Tumor Antigens and T-Cell Reactivity, 114 Rue Édouard Vaillant, Villejuif 94805, France. E-mail address: fathia.mami-chouaib@gustaveroussy.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: CCL5V, CCL5 storage vesicle; CG, cytotoxic granule; cIS, cytotoxic immune synapse; HD, healthy donor; IS, immune synapse; MFI, mean fluorescence intensity; MTOC, microtubule-organizing center; pMHC-I, peptide–MHC class I.

Copyright © 2014 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/14/\$16.00

moting CTL detachment from target cells and migration in response to CXCL12. These results emphasize a mechanism regulating IS resolution by CTL following successful tumor cell killing. They are compatible with a model of CTL serial encounter and conjugation with multiple targets.

Materials and Methods

Tumor cell lines and CD8⁺ T cell clones and blasts

Tumor cell line IGR-Heu and autologous T cell clone Heu171, recognizing a mutated α -actinin-4 (actn-4) tumor Ag, were established as described (22).

CD8⁺ T cell blasts were generated from PBMC of two healthy donors (HD1 and HD2) and two patients displaying genetic deficiencies in either *UNC13D* (hMunc13-4^{-/-}) or *RAB27A* (Rab27a^{-/-}). Briefly, CD8⁺ T cells were selected using Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) and cultured on irradiated allogeneic feeder cells in the presence of IL-2 (100 U/ml) and 3% conditioned medium from PHA-activated PBMC (22).

CD8⁺ T cells were freshly isolated from two additional HD (HD3 and HD4) and were transiently transfected with pEGFP-C1-Rab27a-GFP plasmid (23) in an Amaxa system using V solution and the X-001 program (Lonza).

The human HLA-A2-transfected Ger1-A2 melanoma cell line (kindly provided by Pierre Coulie, University of Louvain, Brussels, Belgium) and the murine Fc γ R-expressing P815 mastocytoma cell line were used as APC. SEB superAg was purchased from Toxin Technologies.

Flow cytometry and functional assays

T cell phenotypic analysis was performed by flow cytometry (24) using anti-CD8 (Immunotech), anti-granzyme B (Caltag Laboratories), anti-CCR5, and anti-CXCR4 (R&D Systems) mAb. For the degranulation assay, T cells were stimulated in flat-bottom 96-well plates precoated with 5 μ g/ml anti-CD3 mAb (UCHT1) in the presence of anti-CD107a mAb (Becton-Dickinson), as described (25). The time-course of CG and chemokine release was assessed in T cells stimulated with plastic-bound anti-CD3 mAb (10 μ g/ml) in the absence or presence of 3 μ M brefeldin A, 10 nM monensin or 10 μ g/ml nocodazole (Sigma-Aldrich). Cells were fixed with 2% paraformaldehyde, permeabilized with 0.2% saponin, and then stained with anti-granzyme B, anti-CCL3, anti-CCL4 (R&D Systems), or anti-CCL5 (BD Biosciences) mAb (22). CCL5 secretion in cell culture supernatants was analyzed by ELISA (eBioscience). The induction of CXCR4 expression was assessed on T cells stimulated with plastic-bound anti-CD3 mAb, pretreated or not with 10 μ g/ml nocodazole (Sigma-Aldrich), in the absence or presence of 100 nM human rCCL5 (PeproTech), using anti-CXCR4 biotinylated mAb (R&D Systems) followed by streptavidin-PE-labeled secondary mAb (Molecular Probes). For inhibition of CXCR4 expression, T cells were incubated for 30 min with 1 μ M of the CCR5 antagonist maraviroc (kindly provided by Serge Adnot, Créteil, France).

Chemotaxis assay

T cells were seeded alone or with tumor cells at a 1:5 E:T ratio in the upper chambers of Transwell plates, as described (14). After 30 min to 2 h of incubation, 50 nM human rCXCL12 was added to the lower chambers to trigger T cell migration. After an additional 2 h, the number of cells that had migrated into the lower chambers was counted by flow cytometry. Results were expressed as chemotaxis index (14). Chemokine receptor activity was inhibited by preincubating T cells in the upper chambers with anti-CXCR4 blocking mAb or maraviroc.

Confocal microscopy

Tumor cells and T cells, untreated or pretreated with nocodazole, were plated on poly-(L-lysine)-coated coverslips at a 2:1 E:T ratio, as described (24). Staining was performed using rabbit anti-CCL5 (PeproTech) and mouse anti-granzyme B (Invitrogen), anti- α -tubulin (Sigma-Aldrich), anti-CXCR4, or anti-CCR5 mAb followed by a secondary mAb coupled to antimouse-Alexa Fluor 488 or anti-rabbit-Alexa Fluor 546 (Molecular Probes). Coverslips were then mounted with Fluoromount-G (Southern Biotech) and analyzed by a confocal microscope (LSM-510; Carl Zeiss Microimaging) with a \times 63 lens. Polarization of CCL5V and CG was defined by the accumulation of CCL5 and granzyme B staining, respectively, at the contact area between effector and tumor cells, which was defined by a tight junction, characterized by \geq 10 Z stacks. For each stack, the optimal Z interval was calculated by LSM Image Examiner software (Zeiss). A minimal fraction of three-fourths of CCL5 and granzyme B

staining needed to be localized at the IS to be considered polarized. The colocalization of CCL5 and granzyme B and/or Rab27a was evaluated by the Manders coefficients determined by IMARIS software, which estimate the degree of colocalization of fluorescence A in fluorescence B within the region of interest. The microtubule network and MTOC were visualized by α -tubulin staining. Z-projection of slices was performed using LSM Image Examiner software (Zeiss).

For CCL5V relocalization in TCR-engaged T cells, poly-L-lysine slides were precoated with anti-CD3 (10 μ g/ml) or anti-CD3 mAb (5 μ g/ml) plus rE-cadherin-Fc or rICAM-1-Fc (5 μ g/ml) overnight at 4°C. T cells were either left untreated or treated with nocodazole and plated on precoated slides for 30 min at 37°C. Cells were then fixed, permeabilized as described above, and stained with rabbit anti-CCL5 mAb followed by a secondary anti-rabbit-Alexa Fluor 488 Ab to monitor relocalization of the chemokine. Polymerized F-actin was visualized with rhodamine phalloidin (Molecular Probes).

Directional secretion assay

The FluoroSpot assay was adapted from Ref. 26. T cells were plated on plastic slides coated with anti-CD3 mAb for T cell activation and anti-CCL5 mAb (7 μ g/ml, R&D Systems) for chemokine capture. After 45 min incubation at 37°C, T cells were washed with PBS Tween 20 (0.05%) and stained with biotinylated anti-CCL5 mAb (144 ng/ml) for 2 h at room temperature, followed by streptavidin-Alexa 488. Slides were mounted and analyzed the following day using the confocal microscope. The areas and mean fluorescence intensities (MFI) of chemokine spots were quantified with ImageJ software (Fiji program).

Statistical analysis

Data were compared using the unpaired two-tailed Student *t* test. Two groups were considered significantly different if $p < 0.05$.

Results

Activated CD8⁺ T cells contain CCL5 in cytoplasmic vesicles that are recruited at the IS

CTL exert their lytic function through exocytosis of perforin- and granzyme-containing CG during interaction with the specific target. CTL possess cytoplasmic stores of CCL5, but whether these vesicles are distinct from CG remains controversial (21, 27). Experiments were therefore performed to assess the intracellular distribution of CCL5V and CG in CTL clone Heu171, unconjugated or conjugated with autologous IGR-Heu tumor cells. Confocal microscopy analysis indicated that the majority of T cells contain CCL5 in cytoplasmic compartments distinct from CG (Fig. 1A). Moreover, both types of granules are rapidly recruited at the contact area with target cells with high degree of colocalization (Fig. 1B, 1C). Similar results were obtained with conjugates between HD1 or HD2 T cell blasts and anti-CD3-coated P815 targets (Supplemental Fig. 1A). Notably, blocking of de novo protein synthesis with cycloheximide had only a marginal effect on CCL5 and granzyme B relocalization in T cells engaged in synapse-like interactions when plated on plastic slides coated with anti-CD3 mAb. Moreover, quantitative RT-PCR analysis did not reveal any significant increase in CCL5 mRNA expression levels at 30- and 60-min T cell stimulation with anti-CD3 mAb (data not shown).

We then followed the kinetics of CCL5 and granzyme B release by CTL activated with anti-CD3 mAb. High amounts of both proteins were initially observed in the T cell clone cytoplasm and rapidly decreased starting 15 min after TCR triggering (Fig. 2A), which correlated with chemokine secretion (Fig. 2B). In contrast, low levels of the two other CCR5 ligands, CCL3 and CCL4, were detected in the T cell cytoplasm and increased progressively after lymphocyte stimulation in the presence of brefeldin A, suggesting de novo synthesis (Fig. 2C). This was further confirmed by confocal microscopy showing accumulation of both chemokines (Fig. 2D). Notably, blockage of chemokine secretion with brefeldin A had no effect on CCL5 expression levels

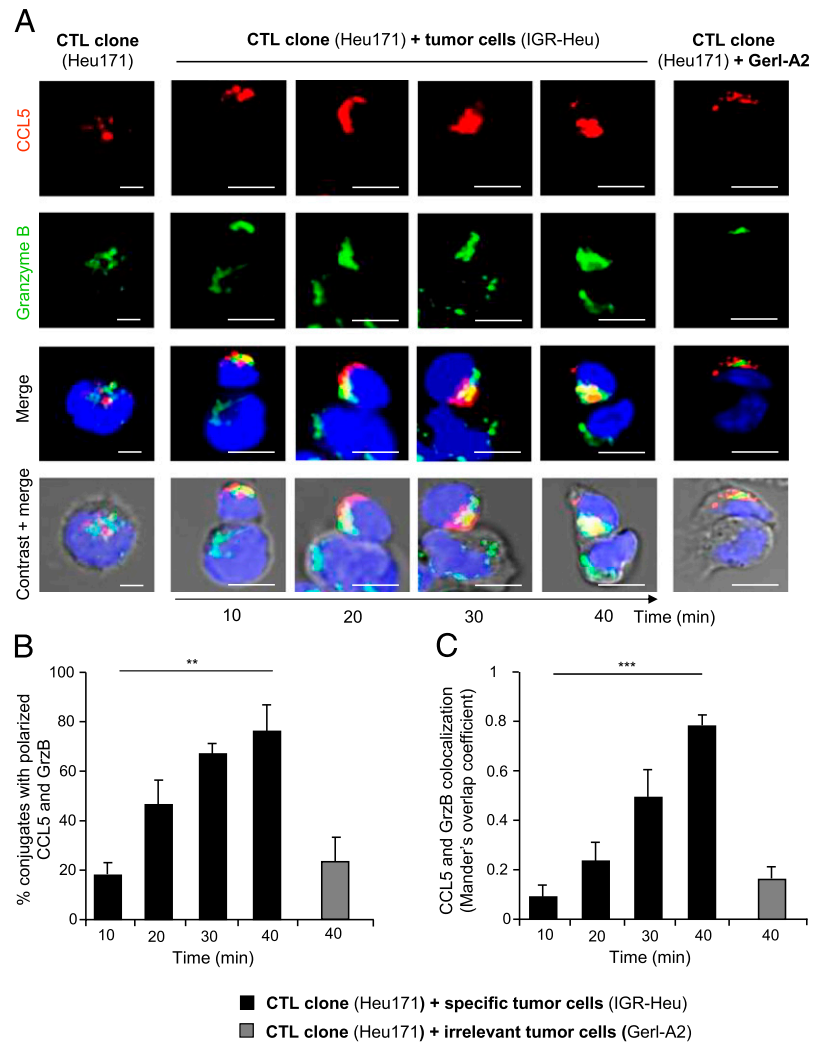


FIGURE 1. CCL5 and granzyme B are localized in distinct T cell cytoplasmic compartments that are both rapidly recruited at the IS. **(A)** CTL clone Heu171 alone (left panels) and conjugates with autologous IGR-Heu (middle panels) or irrelevant Gerl-A2 (right panels) tumor cells were analyzed by confocal microscopy at the indicated time points. Nuclei were stained with TO-PRO-3 iodide (blue). Scale bars, 5 μ m. **(B)** Percentages of CTL displaying polarization of both CCL5V and granzyme B-containing granules. Numbers of conjugates analyzed per time point ($n = 45$). **(C)** Colocalization of CCL5 and granzyme B in the contact area between CTL and tumor cells. The Manders coefficients indicate overlaps of the signals between CCL5 and granzyme B. Error bars represent SD from one representative experiment of three. ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

(Fig. 2A). Similar results were obtained with HD1 and HD2 CD8⁺ T cell blasts treated with brefeldin A or monensin, another inhibitor of intracellular protein transport (Supplemental Fig. 1B, 1C). These data demonstrate that CCL5 is stored in cytoplasmic compartments of effector CD8⁺ T cells. Despite being distinct from CG, CCL5V relocalized at the IS and were released after TCR triggering.

CTL MTOC polarization drags CCL5V to the T cell–tumor cell interface

MTOC polarization has been functionally associated with T cell synaptic secretion of CG (3, 28, 29). To determine whether MTOC polarization is required for CCL5V recruitment at the IS, we treated Heu171 lymphocytes with nocodazole, a microtubule-depolymerizing drug that does not affect IS formation. Nocodazole also had no side effects on T cell viability and activation, as certified by the low percentages of annexin V⁺/propidium iodide⁻ apoptotic cells after lymphocyte treatment with the drug and unaffected Ca²⁺ response to stimulation with anti-CD3 mAb (data not shown). CCL5V remained associated with the MTOC of untreated cells and were transported to the synaptic region close to the T cell membrane (Fig. 3A). In contrast, treatment of the CTL clone with nocodazole inhibited relocalization of CCL5V and CG at the IS with IGR-Heu target cells (Fig. 3A, 3B).

Next, we monitored CCL5V polarization in TCR-engaged lymphocytes plated on coverslips coated with anti-CD3 plus rE-cadherin-Fc, the ligand of integrin CD103 (24). Results revealed

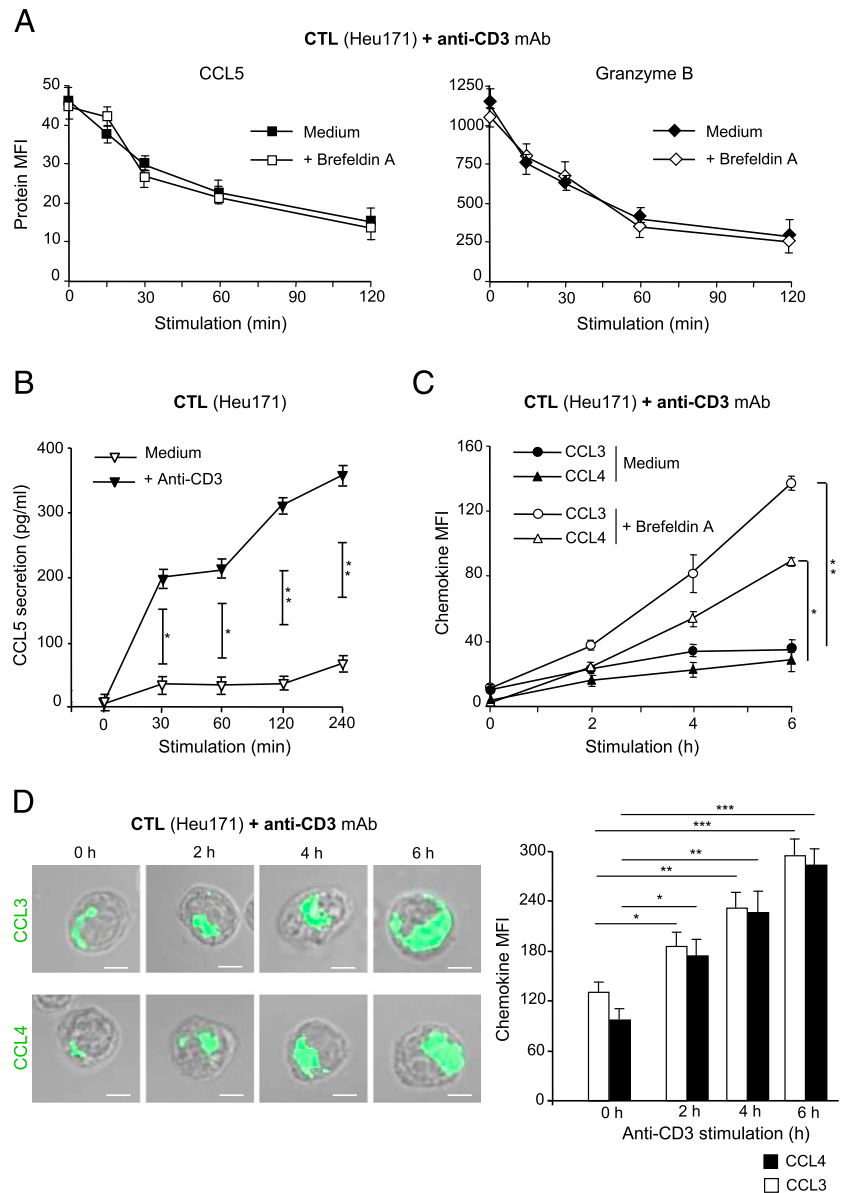
recruitment of CCL5V into the central region of the cell surrounded by an actin ring in the proximity of the cell-support contact surface. In contrast, in T cells treated with nocodazole, CCL5V remained dispersed in the cytoplasm (Fig. 3C, 3D). MTOC polarization was also required for directional mobilization of CCL5V at the IS between HD1 or HD2 CD8⁺ T cell blasts and anti-CD3-coated P815 targets (Supplemental Fig. 2A). These data demonstrate that polarization of CCL5V is dependent on MTOC.

CCL5 is released at the IS

Recruitment of CCL5V into the IS raised the question of the polarity of chemokine secretion. We therefore evaluated CCL5 and granzyme B contents in CTL, untreated or pretreated with nocodazole, stimulated with plastic-bound anti-CD3 mAb. Intracytoplasmic staining indicated that both proteins were released from untreated Heu171 CTL, but even though nocodazole completely inhibited release of granzyme B, it had no effect on CCL5 secretion, as revealed by intracytoplasmic immunofluorescence analyses (Fig. 4A) and ELISA (Supplemental Fig. 2B). This result suggests that, contrary to CG, CCL5 release is not restricted to the IS.

We thus assessed CCL5 secretion polarity using a chemokine capture (FluoroSpot) assay adapted from a previously described procedure (26). Results showed that CCL5 accumulates on outlined spots smaller than the average of the T cell contact area, suggesting polarized secretion (Fig. 4B). In contrast, treatment of the Heu171 clone with nocodazole resulted in multifocal localization of the

FIGURE 2. Kinetics of granzyme B and CCR5 ligand expression by CTL. **(A)** CCL5 and granzyme B intracellular content. CCL5 (*left*) and granzyme B (*right*) MFI in the Heu171 clone, stimulated with anti-CD3 mAb in the absence or presence of brefeldin A, was determined by flow cytometry at the indicated time points. Data shown correspond to MFI \pm SD from duplicate samples of one representative experiment of three. **(B)** CCL5 secretion by the CTL clone. Heu171 T cells were unstimulated (medium) or stimulated with anti-CD3 mAb. At the indicated time points, culture media were harvested and CCL5 concentrations were measured by ELISA. Data shown are means \pm SD from duplicate samples of one representative experiment of two. **(C)** CCL3 and CCL4 intracellular content. Protein MFI in Heu171 CTL, stimulated with anti-CD3 in the absence or presence of brefeldin A, was determined by flow cytometry at the indicated time points. Data shown correspond to MFI \pm SD from duplicate samples of one representative experiment of three. **(D)** Confocal microscopy analysis of CCL3 and CCL4 expression. *Left panel*, Heu171 CTL, stimulated at indicated time points with anti-CD3 in the presence of brefeldin A, were analyzed for the accumulation of CCL3 and CCL4. *Right panel*, Quantification of chemokine MFI performed by ImageJ software ($n = 35$). Error bars represent SD from one representative experiment of three. Scale bars, 5 μm . * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

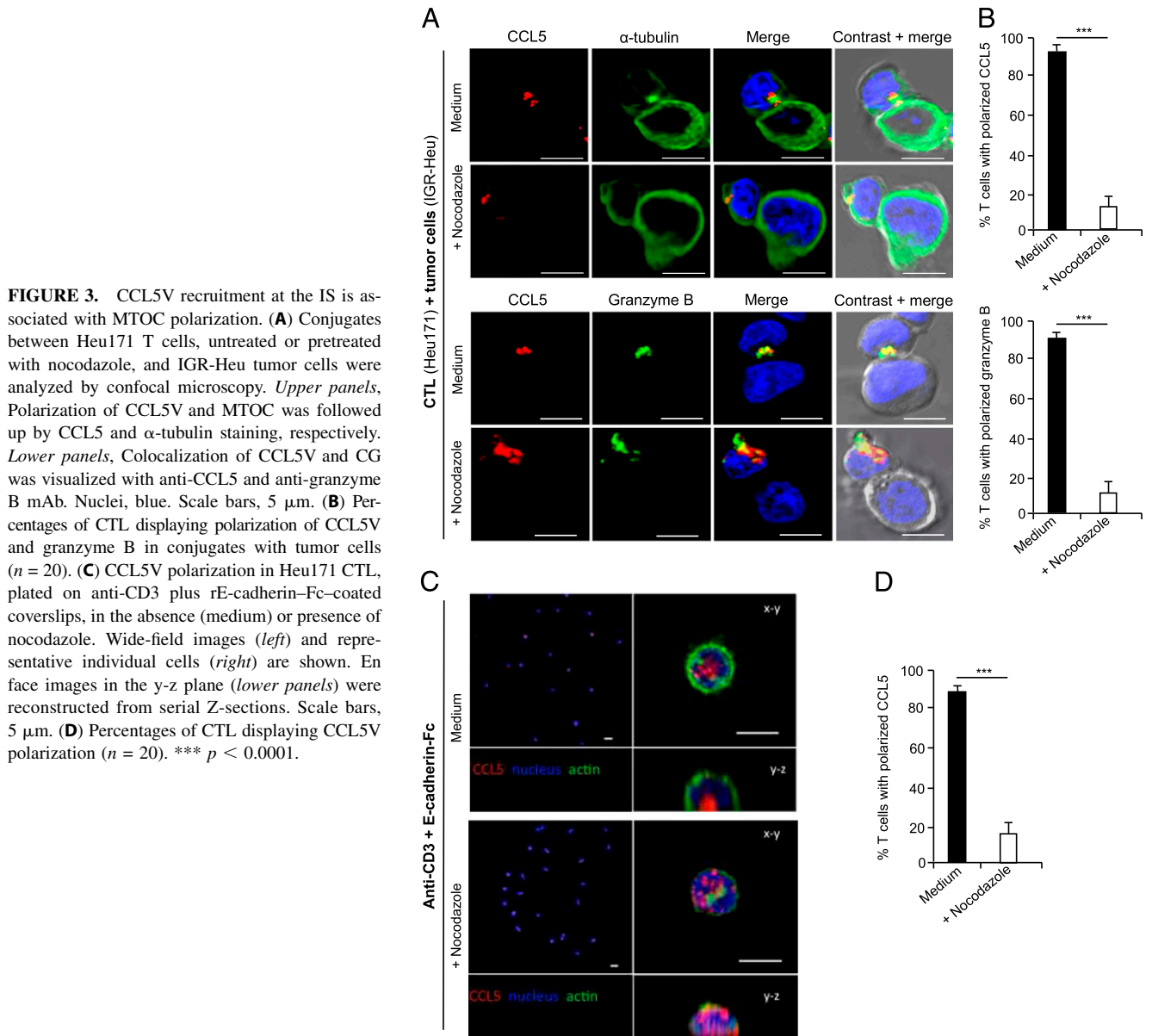


chemokine, indicating multidirectional release. This was further confirmed by quantification of the spot median surface and MFI of CCL5 (Fig. 4C), which were, respectively, $9 \mu\text{m}^2 \pm 1$ and 215 ± 4 in untreated cells and reached $47 \mu\text{m}^2 \pm 6$ and 70 ± 5 in nocodazole-treated lymphocytes. These data support the conclusion that CCL5 is released at the IS when microtubule integrity is preserved.

Synaptic release of CCL5V is concomitant with Rab27a-hMunc13-4-dependent CG exocytosis

We then tested whether, in situations in which MTOC polarization is preserved but CG exocytosis is abrogated, CCL5 focal release will be re-established. For this purpose, we generated CD8⁺ T cell blasts from two patients displaying genetic deficiencies in the hMunc13-4-Rab27a complex, and we tested their ability to secrete CCL5 in a polarized manner. Initial experiments confirmed that, as opposed to HD1 and HD2 T cells stimulated with anti-CD3 mAb, T cells generated from an Rab27a^{-/-} patient and an hMunc13-4^{-/-} patient displayed a defect in CD107a surface expression and CG release (Supplemental Fig. 3A, 3B). In contrast, CCL5 was secreted by both mutation-bearing lymphocytes upon TCR triggering (Fig. 4D, Supplemental Fig. 3B). We then ana-

lyzed the CCL5 cytoplasmic localization in conjugates between Rab27a^{-/-} or hMunc13-4^{-/-} CD8⁺ T cells and anti-CD3-coated P815. Confocal microscopy studies indicated that both CCL5- and granzyme B-containing granules are recruited at the IS (Supplemental Fig. 3C, 3D). Concordant results were obtained with Rab27a^{-/-} and hMunc13-4^{-/-} mutation-bearing donor T cells plated on coverslips coated with the anti-CD3 mAb and rICAM-1-Fc molecule (Supplemental Fig. 4A, 4B). To evaluate the relationship between CG exocytosis and the CCL5 secretion pattern, we applied the FluoroSpot assay to T cells from patients. Results indicated that contrary to HD1 and HD2, hMunc13-4^{-/-} and Rab27a^{-/-} T cell blasts displayed a multidirectional secretion of CCL5 (Fig. 4B, 4C). This was further confirmed by quantification of median surfaces of the FluoroSpot assays, displaying average sizes of $129 \pm 13 \mu\text{m}^2$ and $163 \pm 26 \mu\text{m}^2$ for hMunc13-4^{-/-} and Rab27a^{-/-} T cells, respectively, and only $31 \pm 4 \mu\text{m}^2$ and $29 \pm 5 \mu\text{m}^2$ for HD1 and HD2 T cells (Fig. 4C, *left panel*). CCL5 MFI of the FluoroSpot assays corresponded to 88 ± 5 and 73 ± 5 for hMunc13-4^{-/-} and Rab27a^{-/-} T lymphocytes, respectively, and 216 ± 5 and 205 ± 6 for HD1 and HD2 lymphocytes, respectively (Fig. 4C, *right panel*). These data suggest that, similarly to CG



exocytosis, polarized release of CCL5V requires a functional hMunc13-4-Rab27a complex.

We therefore tested whether CCL5V are localized in the same compartment as the Rab27a-hMunc13-4 complex by transfecting HD3 and HD4 CD8⁺ T cell blasts with a plasmid encoding a rRab27a-GFP molecule and staining of CCL5V with specific mAb. Anti-granzyme B mAb were included as controls. Results indicated that the three proteins are located in distinct types of granules (Fig. 5A). However, stimulation of Rab27a-GFP-transfected T cells with anti-CD3 plus rICAM-1-Fc resulted in rapid polarization and likely coalescence of Rab27a and CCL5V at cell-plastic contact zones (Fig. 5B, 5C). These data suggest that CCL5V release at the IS uses the same mechanism as CG exocytosis, resulting in focal chemokine secretion concomitant with target cell lysis.

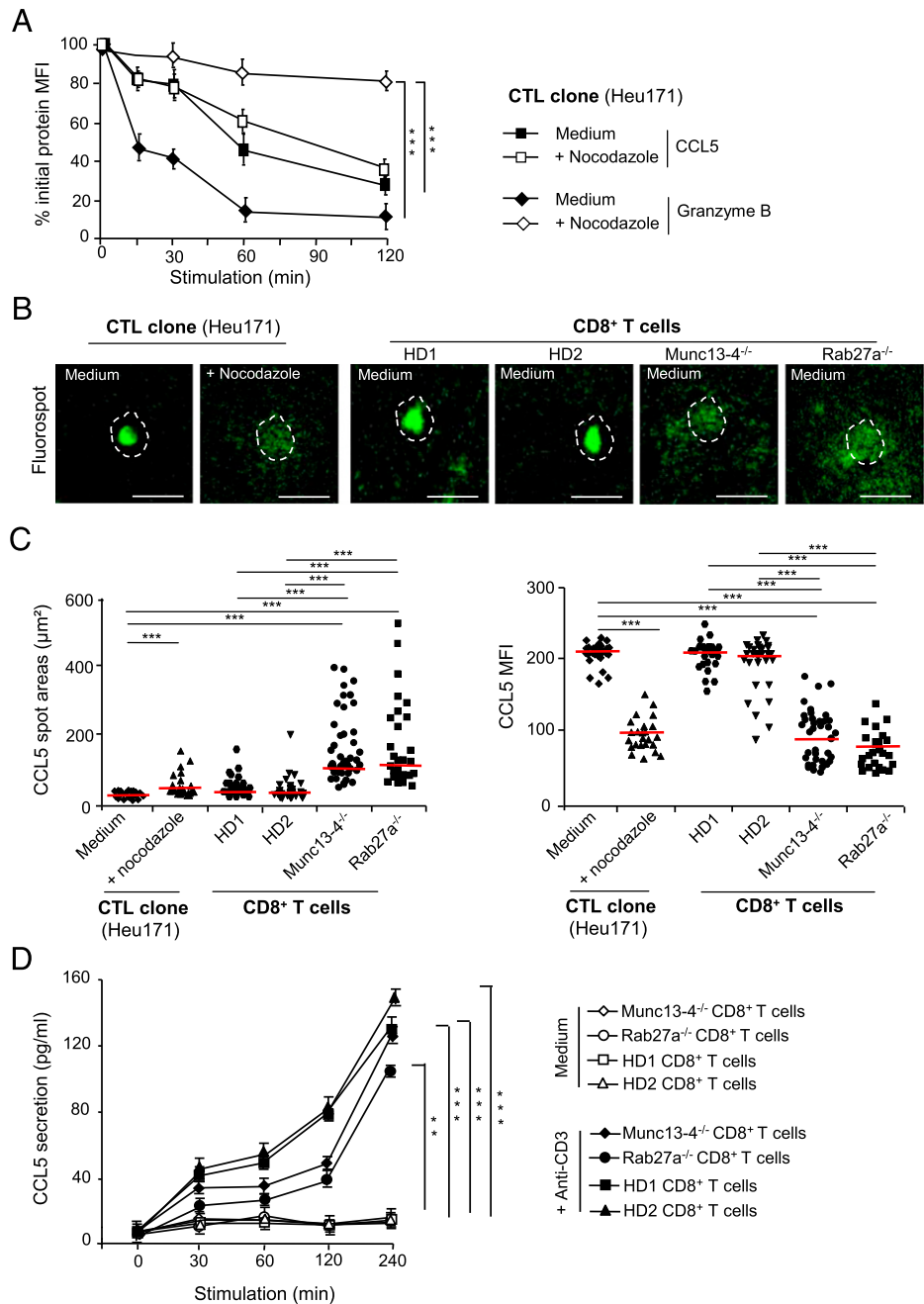
Synaptic release of CCL5V triggers CXCR4 surface expression and T cell migration toward CXCL12

Next, we investigated the consequence of polarized release of CCL5 on the chemokine receptor expression profile. Heu171 CTL stimulated with anti-CD3 displayed increased surface expression of

CXCR4 that was abrogated by nocodazole and re-established with high concentrations of rCCL5 (Fig. 6A). Moreover, induction of CXCR4 by rCCL5 was inhibited by the CCR5 antagonist maraviroc (Fig. 6B). These results suggest that CXCR4 upregulation is dependent on high local levels of CCL5 provided upon synaptic release of the chemokine. Accordingly, Rab27a- and hMunc13-4-deficient CD8⁺ T cells stimulated with anti-CD3 mAb failed to express CXCR4 unless exogenous rCCL5 was added (Fig. 6C, Supplemental Fig. 4C). In contrast, anti-CD3-stimulated HD1 and HD2 T cells displayed a high expression level of CXCR4, which was further upregulated with rCCL5 (Fig. 6C).

We then evaluated the capacity of Heu171 T cells conjugated with IGR-Heu tumor cells to respond to CXCR4 ligand CXCL12 in an in vitro transmigration assay. Previous confocal microscopy analysis indicated that, in contrast to CCR5, which is engaged at the IS, CXCR4 is uniformly expressed on T cells but is excluded from the IS with target cells (Fig. 7A). Results indicated that CTL engaged with either autologous (Fig. 7B) or peptide-pulsed GerlA2 (Fig. 7C) target cells are able to detach and migrate in response to CXCL12 more efficiently than are unconjugated T cells. Moreover, anti-CXCR4 neutralizing mAb (Fig. 7B) or CCR5

FIGURE 4. (A) Microtubule disorganization inhibits CG release, but not CCL5V secretion. Release of CCL5V and CG by Heu171 CTL, untreated or treated with nocodazole and stimulated with plastic-bound anti-CD3, was followed up by intracytoplasmic staining using anti-CCL5 and anti-granzyme B. Values correspond to percentages of initial MFI \pm SD from duplicate samples of one representative experiment of three. **(B)** Polarized CCL5 secretion is impaired by microtubule disorganization or Rab27a or hMunc13-4 deficiency. Heu171, untreated or treated with nocodazole, HD1, HD2, hMunc13-4^{-/-}, and Rab27a^{-/-} CD8⁺ T cells were plated on slides precoated with anti-CD3 and anti-CCL5 for CCL5 release triggering and capture, respectively. Spots of immobilized CCL5 (green) were revealed with anti-CCL5 detection mAb. Representative images of captured spots are shown. Scale bars, 5 μ m. T cell perimeters (27 μ m) are shown by dotted white lines. **(C)** Quantification of CCL5 spot areas (left) and MFI (right) were measured by ImageJ software (Fiji program). Error bars represent SD from one representative experiment of three. Medians of analyzed spots are represented by a red dash ($n = 30$), *** $p < 0.0001$. **(D)** CCL5 secretion by CD8⁺ T cells. hMunc13-4^{-/-}, Rab27a^{-/-}, HD1, and HD2 lymphocytes were unstimulated (medium) or stimulated with anti-CD3 mAb. At the indicated time points, chemokine concentration was measured by ELISA. Data are means \pm SD from duplicate samples of one representative experiment of three. ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

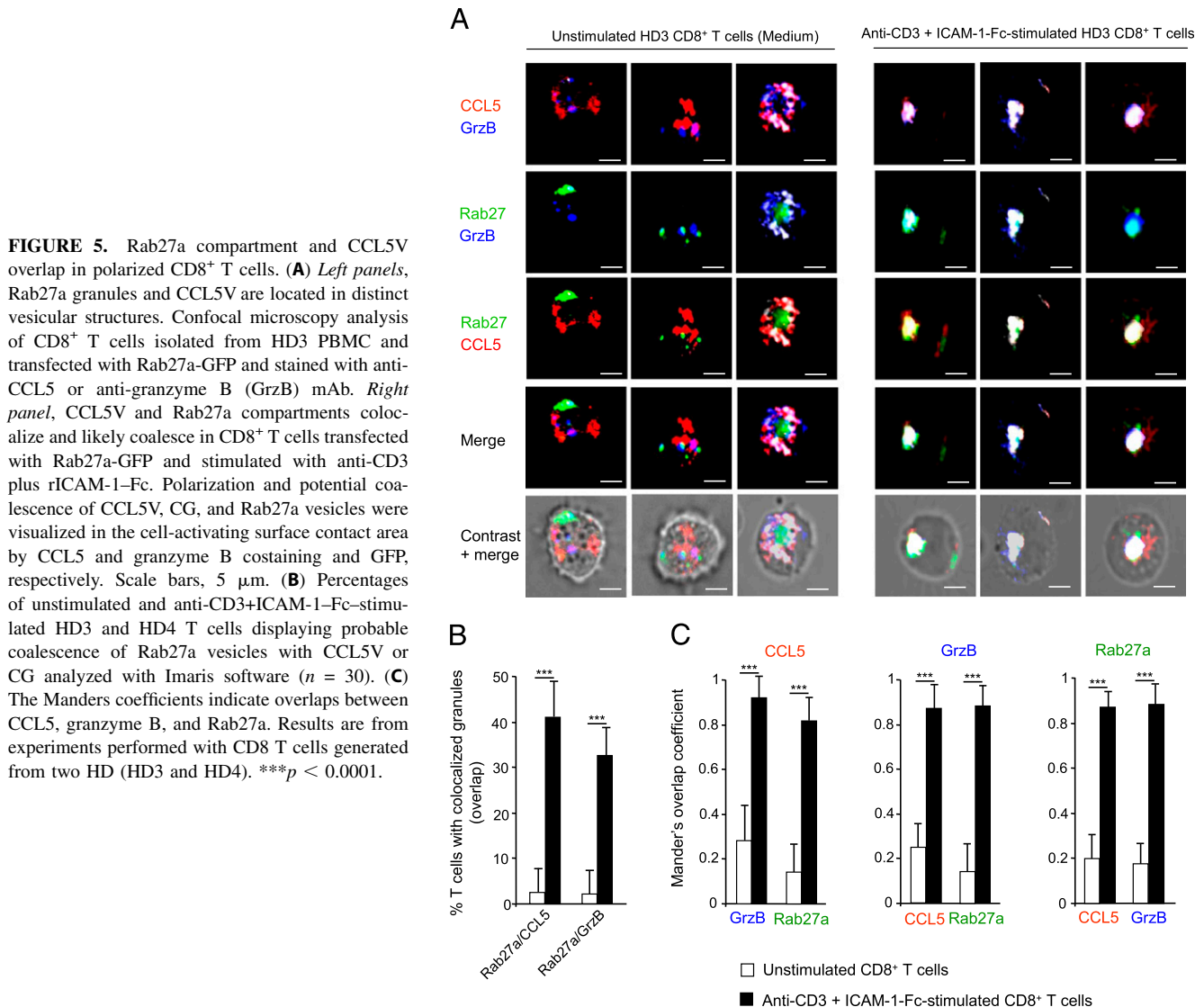


antagonist (Fig. 7D, Supplemental Fig. 4D) inhibited lymphocyte migration. Notably, only a marginal migration of unconjugated or conjugated targets was observed (data not shown). With regard to Rab27a^{-/-} or hMunc13-4^{-/-} T cell blasts, conjugated with GerLA2 unpulsed or pulsed with SEB superantigen and exposed to CXCL12, they migrated less efficiently than HD1 T cells conjugated with the same target (Fig. 7E). Similar results were obtained with T cells conjugated with anti-CD3 plus rICAM-1-Fc-coated beads (Supplemental Fig. 4E). These data strongly suggest that synaptic release of CCL5V triggers T cell surface expression of CXCR4, which regulates IS duration by controlling T cell detachment and migration toward a novel CXCL12-producing target.

Discussion

In the current study, we demonstrate that activated CTL secrete CCL5 into the IS with target cells, resulting in autocrine induction of CXCR4. This function leads to enhanced responsiveness of

T cells to CXCL12 and represents a mechanism regulating the duration of the T cell–target cell interaction during effective killing. TCR-mediated activation of CTL triggers secretion of effector cytokines and chemokines, including CCR5 ligands CCL3, CCL4, and CCL5. In agreement with previous studies (21), we show that CCL3 and CCL4 are synthesized and promptly secreted after effector CD8⁺ T cell stimulation. In contrast, CCL5 is stored in post-Golgi vesicles and released after TCR triggering by a secretory pathway typical of CG exocytosis (30). Indeed, our results indicate that, as with CG, CCL5 secretion occurs minutes after T cell activation and is not affected by Golgi-dependent protein transport inhibitors. Our results are also in good agreement with previous studies showing that CCL5V are distinct from granzyme B-containing granules (21), but both are released with similar kinetics. Notably, our results revealed that CCL5V and CG are localized close to each other even when away from the IS. Although the functional relevance of this finding is not clear, this



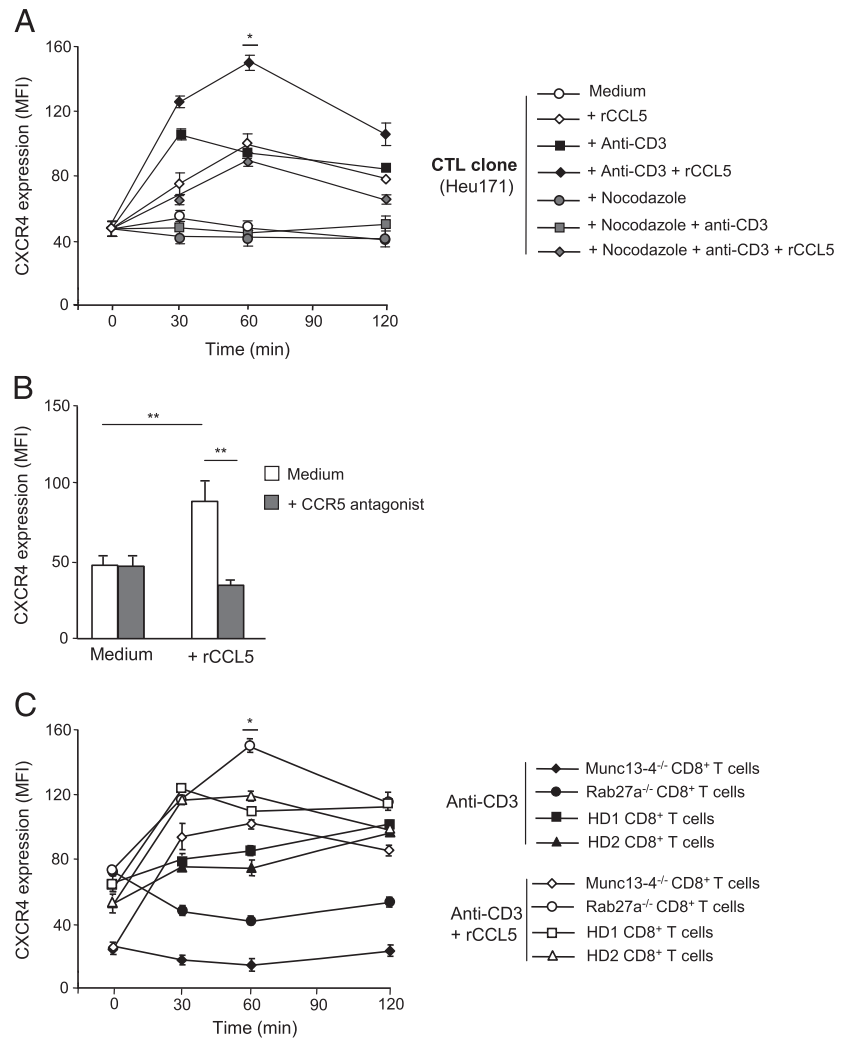
tethering of CCL5V and CG may facilitate synaptic release of the chemokine. A Vti1b-dependent tethering of CG and CD3-containing endosomes has been previously reported to determine efficient lytic granule secretion at the IS (31). Munc13-4-mediated cooperation of CG and Rab11⁺ endosomal “exocytic vesicles” has also been reported to be required for the cytotoxic function of CTL (6). Our data suggest a functional relationship between cytotoxicity and CCL5 secretion, most likely for regulating CTL effector functions rapidly after recognition and killing of specific targets. In contrast, protracted secretion of CCL3 and CCL4 may further shape the tumor microenvironment by recruiting multiple effectors to sites of lymphocyte activation (32).

Synaptic secretion of some cytokines is thought to provide a mechanism for Ag specificity of effector T cell functions (33). It has been reported that CD4⁺ T cells secrete IFN γ and IL-2 through the IS, whereas CCL3 and CCL5 are secreted multidirectionally (26). In contrast, CD8⁺ T cells contain CCL5V that polarize rapidly in response to TCR engagement (21). This discrepancy might be due to the analysis in the first study (26) of newly synthesized CCL5 in helper T cells, whereas in the latter (21) and present studies we focused on CCL5 present in CTL cytoplasmic vesicles. We show in this article that, similarly to CG, CCL5V are rapidly recruited at the IS and require T cell MTOC polarization. Indeed, CCL5 was enriched around the

MTOC after TCR triggering, whereas disorganization of the microtubule network altered polarization of both CCL5V and CG. Remarkably, whereas T cell microtubule depolymerization abrogated CG exocytosis, it did not inhibit CCL5 secretion. However, instead of being released into the IS, CCL5 was secreted multidirectionally. The ability of T cells to use both multidirectional and synaptic pathways to secrete CCL5 may reflect different context-dependent functions. For instance, multidirectional secretion may permit recruiting effector cells to sites where Ag was recognized but CG exocytosis had not yet been achieved whereas synaptic secretion may act locally upon effective target cell killing.

Rab27a and hMunc13-4 proteins interact directly and are essential effectors of CG exocytosis (6, 34, 35). Although defects in either of the two proteins do not affect CG polarization, they dramatically impair exocytosis-dependent target cell lysis (4, 36). Likewise, we show that loss of functions of Rab27a or hMunc13-4 does not affect CCL5V polarization but inhibits synaptic release of the chemokine. We also show that Rab27a and hMunc13-4 endosomal exocytic vesicles are likely distinct from CCL5V, and that both types of granules strongly colocalize and potentially fuse at the IS in a manner similar to that with CG. Moreover, our results indicate that Rab27a and hMunc13-4 deficiencies lead to multifocal secretion of CCL5,

FIGURE 6. CXCR4 induction on the activated CD8⁺ T cell surface. **(A)** Heu171 CTL were unstimulated (medium) or stimulated with anti-CD3 in the absence or presence of rCCL5 and/or nocodazole. CXCR4 expression was measured by flow cytometry at the indicated time points. Data correspond to MFI ± SD from duplicate samples of one representative experiment of four. **p* < 0.02 calculated between untreated and nocodazole-treated lymphocytes. **(B)** Heu171 CTL were unstimulated (medium) or stimulated with rCCL5 in the absence or presence of the CCR5 antagonist maraviroc, and then CXCR4 expression was measured. Data correspond to MFI ± SD from duplicate samples of one representative experiment of two. ***p* < 0.001. **(C)** Flow cytometry analysis of CXCR4 surface expression by CD8⁺ T cells from HD1, HD2, hMunc13-4^{-/-}, and Rab27a^{-/-} donors stimulated the indicated time points with anti-CD3 in the absence or presence of rCCL5. Data correspond to MFI ± SD from duplicate samples of one representative experiment of three. **p* < 0.02 calculated between anti-CD3- and anti-CD3+rCCL5-stimulated cells.



most likely in a piecemeal manner by shuttling the chemokine, through a pool of smaller secretory vesicles, from CCL5V throughout the T cell surface (37, 38). These data suggest that CCL5V and CG use the same Rab27a-hMunc13-4-dependent mechanism for their synaptic release, resulting in a high local concentration of the chemokine, concomitant with target cell killing.

The duration of adhesive contacts between CTL and target cells determines the outcome of T cell responses and is critical for eliminating all malignant cells. Tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes display random migration and a transient Ag-independent interaction with transformed cells until they encounter specific pMHC-I-expressing targets to arrest their movements and establish stable contacts (39). Subsequent binding of integrin LFA-1 or CD103 on T cells to their respective ligands ICAM-1 or E-cadherin on tumor cells results in maturation of the cIS and promotes polarized exocytosis of CG leading to target cell death (24, 40, 41). Once transformed cells are cleared, CTL resume motility to further search for new targets (42). In this report, we show that polarized release of CCL5V at the IS induces expression of T cell surface-distributed CXCR4, promoting CTL detachment from target cells and migration in response to CXCL12. CXCR4 induction is dramatically compromised by microtubule cytoskeleton disorganization and loss of Rab27a or hMunc13-4 function, and is re-established in the presence of high concentrations of exogenous rCCL5. Moreover, neutralizing CCR5, which is relocalized at the IS with target cells, inhibited

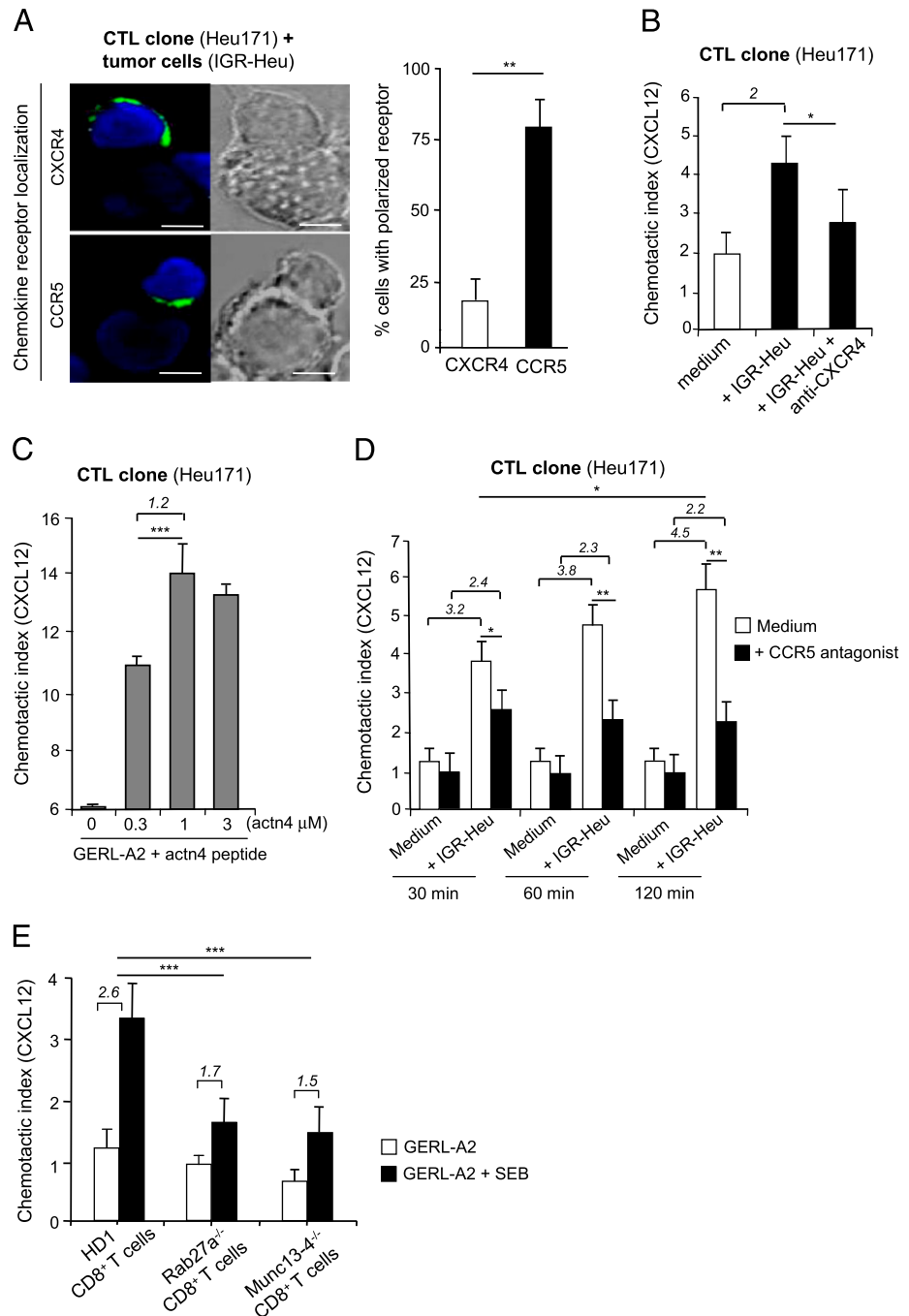
expression of CXCR4 on T cell surface. These results suggest that only synaptic release of CCL5V, most likely through increased local concentration of the chemokine, and then binding to CCR5 at the IS induces CXCR4 expression.

Crosstalk between CCR5 ligands and CXCL12 provides a mechanism that underlies the movement of hematopoietic cells (43). CXCL12, produced in lymphoid organs and in many tumors, induces T lymphocyte migration that is arrested upon TCR engagement (44). In this article, we show that synaptic release of CCL5V triggers CXCR4 expression in an autocrine manner, thereby promoting CD8⁺ T cell migration in response to CXCL12. It is tempting to speculate that successful engagement of a target cell results in synaptic release of CCL5 that, through triggering of polarized CCR5 (14), induces CXCR4 surface expression and thus promotes T cell detachment in a CXCL12-rich tumor microenvironment. These data are compatible with a model of CTL serial conjugation and killing of multiple targets (45) and suggest that CTL can regulate cIS duration through rapid synaptic release of CCL5V concomitant with exocytosis of CG.

The concept of serial killing has been primarily based on in vitro studies (45). Imaging of IS between live CTL and specific target cells revealed the accumulation of CG within minutes after initial cell-cell contact and rapid target cell death (2). Studies on intact lymph nodes have also shown that CTL-mediated killing of specific APC and subsequent T cell detachment requires <25 min (46). In contrast, two-photon imaging of murine tumors revealed a long-lasting interaction

FIGURE 7. Productive IS formation enhances T lymphocyte responsiveness to CXCL12 in a CCR5-dependent manner.

(A) Distribution of CXCR4 and CCR5 on T cells conjugated with target cells. *Left*, Conjugates between Heu171 CTL and IGR-Heu tumor cells were analyzed by confocal microscopy using anti-CXCR4 or anti-CCR5 mAb. Nuclei, blue. Scale bars, 5 μ m. Percentages of CTL displaying polarization of CXCR4 or CCR5 ($n = 50$). Fifty conjugates were randomly selected (= 100%), the number of lymphocytes displaying chemokine receptor polarization was determined, and then the percentage was calculated. Quantification was performed from one independent experiment of three. **(B)** Heu171 CTL were precultured in the upper chambers of Transwell plates in medium alone or with autologous tumor cells, in the absence or presence of neutralizing anti-CXCR4 mAb. T cells were then exposed to CXCL12 loaded into the lower chambers, and transminating cells were counted. **(C)** Heu171 T cells were preincubated in the upper chambers alone or with Gerl-A2 APC, unpulsed or pulsed with increasing concentrations of actn4 peptide. Conjugates were exposed to CXCL12, and transminating cells were then counted. **(D)** Heu171 lymphocytes were preincubated in the upper chambers of Transwells alone or with autologous tumor cells in the absence or presence of maraviroc. After indicated time points conjugates were exposed to CXCL12 loaded into the lower chambers, and transminating cells were counted. **(E)** hMunc13-4^{-/-}, Rab27a^{-/-}, and HD1 CD8⁺ lymphocytes were preincubated in the upper chambers alone or with Gerl-A2, unpulsed or pulsed with SEB (1 μ M). Conjugates were then exposed to CXCL12, and transminating cells were counted. Results are mean chemotaxis index \pm SD of triplicate samples from one representative experiment of three. Italic numbers represent migration fold increase. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.



between CTL and target cells (47). One possible explanation for these unexpected results, apart from the impact of the tumor microenvironment, as suggested by the authors, is abnormal non-physiological overstimulation of CTL. The present study relies on a cancer patient-derived tumor cell-specific CTL couple model. We had also defined a threshold concentration of the antigenic peptide above which, when presented by the MHC-I-overexpressing Gerl-A2 APC, CXCL12 was no longer able to override the TCR-mediated stop signal. Importantly, this threshold was never reached with autologous tumor cells, which express low levels of specific pMHC-I complexes. Further analyses of more relevant human tumors or xenografts expressing physiological tumor Ag, and that are infiltrated by specific effector T cells often bearing low-affinity TCR, are required to shed more light on

in vivo dynamics of malignant cell destruction by CTL and the role of synaptic release of CCL5.

In conclusion, our data reveal a mechanism of control of cIS duration through synaptic secretion of CCL5. A better understanding of the dynamics of antitumor CTL functions may offer new opportunities for optimizing the design of cancer immunotherapy strategies.

Acknowledgments

We thank Sophie Salomé-Desmoulez and Emmanuel Bourrin for help with confocal microscopy.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Griffiths, G. M., A. Tsun, and J. C. Stinchcombe. 2010. The immunological synapse: a focal point for endocytosis and exocytosis. *J. Cell Biol.* 189: 399–406.
- Stinchcombe, J. C., G. Bossi, S. Booth, and G. M. Griffiths. 2001. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15: 751–761.
- Stinchcombe, J. C., E. Majorovits, G. Bossi, S. Fuller, and G. M. Griffiths. 2006. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* 443: 462–465.
- Feldmann, J., I. Callebaut, G. Raposo, S. Certain, D. Bacq, C. Dumont, N. Lambert, M. Ouachée-Chardin, G. Chedeville, H. Tamary, et al. 2003. Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* 115: 461–473.
- Stinchcombe, J. C., D. C. Barral, E. H. Mules, S. Booth, A. N. Hume, L. M. Machesky, M. C. Seabra, and G. M. Griffiths. 2001. Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *J. Cell Biol.* 152: 825–834.
- Ménager, M. M., G. Ménasché, M. Romao, P. Knapnougél, C. H. Ho, M. Garfa, G. Raposo, J. Feldmann, A. Fischer, and G. de Saint Basile. 2007. Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nat. Immunol.* 8: 257–267.
- Shakhar, G., R. L. Lindquist, D. Skokos, D. Dudziak, J. H. Huang, M. C. Nussenzweig, and M. L. Dustin. 2005. Stable T cell-dendritic cell interactions precede the development of both tolerance and immunity in vivo. *Nat. Immunol.* 6: 707–714.
- Scholer, A., S. Hugues, A. Boissonnas, L. Fetler, and S. Amigorena. 2008. Intercellular adhesion molecule-1-dependent stable interactions between T cells and dendritic cells determine CD8+ T cell memory. *Immunity* 28: 258–270.
- Hugues, S., L. Fetler, L. Bonifaz, J. Helft, F. Amblard, and S. Amigorena. 2004. Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat. Immunol.* 5: 1235–1242.
- Franciszkiwicz, K., A. Boissonnas, M. Boutet, C. Combadière, and F. Mami-Chouaib. 2012. Role of chemokines and chemokine receptors in shaping the effector phase of the antitumor immune response. *Cancer Res.* 72: 6325–6332.
- Zlotnik, A., and O. Yoshie. 2012. The chemokine superfamily revisited. *Immunity* 36: 705–716.
- Mulé, J. J., M. Custer, B. Averbook, J. C. Yang, J. S. Weber, D. V. Goeddel, S. A. Rosenberg, and T. J. Schall. 1996. RANTES secretion by gene-modified tumor cells results in loss of tumorigenicity in vivo: role of immune cell subpopulations. *Hum. Gene Ther.* 7: 1545–1553.
- Jöhner, K., L. Pleyer, A. Olivier, E. Maizner, C. Zelle-Rieser, and R. Greil. 2008. Tumour-immune cell interactions modulated by chemokines. *Expert Opin. Biol. Ther.* 8: 269–290.
- Franciszkiwicz, K., A. Le Floch, A. Jalil, F. Vigant, T. Robert, I. Vergnon, A. Mackiewicz, K. Benihoud, P. Validire, S. Chouaib, et al. 2009. Intratumoral induction of CD103 triggers tumor-specific CTL function and CCR5-dependent T-cell retention. *Cancer Res.* 69: 6249–6255.
- Viola, A., A. Sarukhan, V. Bronte, and B. Molon. 2012. The pros and cons of chemokines in tumor immunology. *Trends Immunol.* 33: 496–504.
- Taub, D. D., S. M. Turcovski-Corralles, M. L. Key, D. L. Longo, and W. J. Murphy. 1996. Chemokines and T lymphocyte activation: I. Beta chemokines costimulate human T lymphocyte activation in vitro. *J. Immunol.* 156: 2095–2103.
- Taub, D. D., J. R. Ortaldo, S. M. Turcovski-Corralles, M. L. Key, D. L. Longo, and W. J. Murphy. 1996. Beta chemokines costimulate lymphocyte cytotoxicity, proliferation, and lymphokine production. *J. Leukoc. Biol.* 59: 81–89.
- Crawford, A., J. M. Angelosanto, K. L. Nadwodny, S. D. Blackburn, and E. J. Wherry. 2011. A role for the chemokine RANTES in regulating CD8 T cell responses during chronic viral infection. *PLoS Pathog.* 7: e1002098.
- Molon, B., G. Gri, M. Bettella, C. Gómez-Moutón, A. Lanzavecchia, C. Martínez-A, S. Mañes, and A. Viola. 2005. T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat. Immunol.* 6: 465–471.
- Contento, R. L., B. Molon, C. Boularan, T. Pozzan, S. Manes, S. Marullo, and A. Viola. 2008. CXCR4-CCR5: a couple modulating T cell functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 10101–10106.
- Catalfamo, M., T. Karpova, J. McNally, S. V. Costes, S. J. Lockett, E. Bos, P. J. Peters, and P. A. Henkart. 2004. Human CD8+ T cells store RANTES in a unique secretory compartment and release it rapidly after TcR stimulation. *Immunity* 20: 219–230.
- Dorothee, G., I. Vergnon, F. El Hage, B. Le Maux Chansac, V. Ferrand, Y. Lécluse, P. Opolon, S. Chouaib, G. Bismuth, and F. Mami-Chouaib. 2005. In situ sensory adaptation of tumor-infiltrating T lymphocytes to peptide-MHC levels elicits strong antitumor reactivity. *J. Immunol.* 174: 6888–6897.
- Ménasché, G., E. Pastural, J. Feldmann, S. Certain, F. Ersoy, S. Dupuis, N. Wulffraat, D. Bianchi, A. Fischer, F. Le Deist, and G. de Saint Basile. 2000. Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat. Genet.* 25: 173–176.
- Le Floch, A., A. Jalil, I. Vergnon, B. Le Maux Chansac, V. Lazar, G. Bismuth, S. Chouaib, and F. Mami-Chouaib. 2007. Alpha E beta 7 integrin interaction with E-cadherin promotes antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis. *J. Exp. Med.* 204: 559–570.
- Eskelinen, E. L., Y. Tanaka, and P. Saftig. 2003. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* 13: 137–145.
- Huse, M., B. F. Lillemeier, M. S. Kuhns, D. S. Chen, and M. M. Davis. 2006. T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion. *Nat. Immunol.* 7: 247–255.
- Wagner, L., O. O. Yang, E. A. Garcia-Zepeda, Y. Ge, S. A. Kalams, B. D. Walker, M. S. Pasternack, and A. D. Luster. 1998. Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature* 391: 908–911.
- Stinchcombe, J. C., and G. M. Griffiths. 2003. The role of the secretory immunological synapse in killing by CD8+ CTL. *Semin. Immunol.* 15: 301–305.
- Stinchcombe, J. C., M. Salio, V. Cerundolo, D. Pende, M. Arico, and G. M. Griffiths. 2011. Centriole polarisation at the immunological synapse directs secretion from cytolytic cells of both the innate and adaptive immune systems. *BMC Biol.* 9: 45.
- Stinchcombe, J. C., and G. M. Griffiths. 1999. Regulated secretion from hemopoietic cells. *J. Cell Biol.* 147: 1–6.
- Qu, B., V. Pattu, C. Junker, E. C. Schwarz, S. S. Bhat, C. Kummerow, M. Marshall, U. Matti, F. Neumann, M. Pfreundschuh, et al. 2011. Docking of lytic granules at the immunological synapse in human CTL requires Vti1b-dependent pairing with CD3 endosomes. *J. Immunol.* 186: 6894–6904.
- Balkwill, F. 2004. Cancer and the chemokine network. *Nat. Rev. Cancer* 4: 540–550.
- Huse, M., E. J. Quann, and M. M. Davis. 2008. Shouts, whispers and the kiss of death: directional secretion in T cells. *Nat. Immunol.* 9: 1105–1111.
- Elstak, E. D., M. Neeft, N. T. Nehme, J. Voortman, M. Cheung, M. Goodarzifard, H. C. Gerritsen, P. M. van Bergen En Henegouwen, I. Callebaut, G. de Saint Basile, and P. van der Sluijs. 2011. The munc13-4-rab27 complex is specifically required for tethering secretory lysosomes at the plasma membrane. *Blood* 118: 1570–1578.
- Deneka, M., M. Neeft, and P. van der Sluijs. 2003. Regulation of membrane transport by rab GTPases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 38: 121–142.
- Haddad, E. K., X. Wu, J. A. Hammer III, and P. A. Henkart. 2001. Defective granule exocytosis in Rab27a-deficient lymphocytes from Ashen mice. *J. Cell Biol.* 152: 835–842.
- Lacy, P., S. Mahmudi-Azer, B. Bablitz, S. C. Hagen, J. R. Velazquez, S. F. Man, and R. Moqbel. 1999. Rapid mobilization of intracellularly stored RANTES in response to interferon-gamma in human eosinophils. *Blood* 94: 23–32.
- Lacy, P., and J. L. Stow. 2011. Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. *Blood* 118: 9–18.
- Mrass, P., H. Takano, L. G. Ng, S. Daxini, M. O. Lasaro, A. Iparraguirre, L. L. Cavanagh, U. H. von Andrian, H. C. Ertl, P. G. Haydon, and W. Weninger. 2006. Random migration precedes stable target cell interactions of tumor-infiltrating T cells. *J. Exp. Med.* 203: 2749–2761.
- Anikeeva, N., K. Somersalo, T. N. Sims, V. K. Thomas, M. L. Dustin, and Y. Sykulev. 2005. Distinct role of lymphocyte function-associated antigen-1 in mediating effective cytolytic activity by cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 6437–6442.
- Franciszkiwicz, K., A. Le Floch, M. Boutet, I. Vergnon, A. Schmitt, and F. Mami-Chouaib. 2013. CD103 or LFA-1 engagement at the immune synapse between cytotoxic T cells and tumor cells promotes maturation and regulates T-cell effector functions. *Cancer Res.* 73: 617–628.
- Boissonnas, A., L. Fetler, I. S. Zeelenberg, S. Hugues, and S. Amigorena. 2007. In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. *J. Exp. Med.* 204: 345–356.
- Basu, S., and H. E. Broxmeyer. 2009. CCR5 ligands modulate CXCL12-induced chemotaxis, adhesion, and Akt phosphorylation of human cord blood CD34+ cells. *J. Immunol.* 183: 7478–7488.
- Bromley, S. K., D. A. Peterson, M. D. Gunn, and M. L. Dustin. 2000. Cutting edge: hierarchy of chemokine receptor and TCR signals regulating T cell migration and proliferation. *J. Immunol.* 165: 15–19.
- Bossi, G., C. Trambas, S. Booth, R. Clark, J. Stinchcombe, and G. M. Griffiths. 2002. The secretory synapse: the secrets of a serial killer. *Immunity. Rev.* 189: 152–160.
- Mempel, T. R., M. J. Pittet, K. Khazaie, W. Weninger, R. Weissleder, H. von Boehmer, and U. H. von Adrian. 2006. Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. *Immunity* 25: 129–141.
- Breart, B., F. Lemaître, S. Celli, and P. Bousso. 2008. Two-photon imaging of intratumoral CD8+ T cell cytotoxic activity during adoptive T cell therapy in mice. *J. Clin. Invest.* 118: 1390–1397.

2. Publication collaborative n°2 :

« TGF- β Signaling Intersects with CD103 Integrin Signaling to Promote T-Lymphocyte Accumulation and Antitumor Activity in the Lung Tumor Microenvironment »

Boutet M, Gauthier L, Leclerc M, Gros G, de Montpreville V, Théret N, Donnadiou E, Mami-Chouaib F.

Cancer Research, 2016

TGF β Signaling Intersects with CD103 Integrin Signaling to Promote T-Lymphocyte Accumulation and Antitumor Activity in the Lung Tumor Microenvironment

Marie Boutet^{1,2}, Ludiane Gauthier^{1,2}, Marine Leclerc^{1,2}, Gwendoline Gros^{1,2}, Vincent de Montpreville^{1,3}, Nathalie Th  ret⁴, Emmanuel Donnadieu^{5,6,7}, and Fathia Mami-Chouaib^{1,2}

Abstract

Homing of CD8⁺ T lymphocytes to the tumor microenvironment is an important step for mounting a robust antitumor immune response. TGF β is responsible for CD103 ($\alpha_E\beta_7$) integrin induction in activated intraepithelial CD8⁺ T lymphocytes. However, the interplay between TGF β and CD103 and their contribution to T-cell infiltration and antitumor activity remain unknown. Here, we used viable human lung tumor slices and autologous tumor antigen-specific T-lymphocyte clones to provide evidence that CD103 is directly involved in T-lymphocyte recruitment within epithelial tumor islets and intratumoral early T-cell signaling. Moreover, TGF β enhanced CD103-dependent T-cell adhesion and signaling, whereas it inhibited leukocyte func-

tion-associated antigen (LFA)-1 ($\alpha_L\beta_2$) integrin expression and LFA-1-mediated T-lymphocyte functions. Mechanistic investigations revealed that TGF β bound to its receptors (TGFBR), which promoted the recruitment and phosphorylation of integrin-linked kinase (ILK) by TGFBR1. We further show that ILK interacted with the CD103 intracellular domain, resulting in protein kinase B (PKB)/AKT activation, thereby initiating integrin inside-out signaling. Collectively, our findings suggest that the abundance of TGF β in the tumor microenvironment may in fact engage with integrin signaling pathways to promote T-lymphocyte antitumor functions, with potential implications for T-cell-based immunotherapies for cancer. *Cancer Res*; 76(7); 1757-69.   2016 AACR.

Introduction

Adequate positioning of tumor antigen-specific T cells into tumor tissues plays a central role in an effective antitumor immune response. Hence, the number of CD8⁺ T cells found in contact with tumor cells is usually associated with good outcome in cancer patients (1). Recruitment of T lymphocytes within the tumor involves multiple sequential steps regulated by molecular interactions with several stromal cell types and coordinated by chemotactic agents, cell surface adhesion molecules, and extracellular matrix (ECM) proteins. Integrins are one of the major families of adhesion molecules that mediate cell-ECM and cell-

cell interactions (2). Adhesion of T cells to ECM proteins or cellular integrin ligands is fundamental for lymphocyte development, migration, extravasation, and activation (3, 4). Among the integrin family members, LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18) is essential for lymphocyte homing in lymphoid and nonlymphoid tissues, transmigration, and antigen-specific T-cell responses (3). On naive T lymphocytes, LFA-1 has weak affinity for its ligands, the intercellular adhesion molecules (ICAM). However, T-cell stimulation through T-cell receptor (TCR) or chemokine receptors triggers an "inside-out" signal that results in LFA-1 activation by inducing integrin-extended conformation and clustering, thereby increasing its affinity for its ligands (5). Firm adhesion of LFA-1 to ICAM-1 (CD54) initiates an "outside-in" signal that has costimulatory functions in TCR signaling, thus contributing to T-cell stimulation, spreading, and cytotoxicity (6, 7).

The $\alpha_E(\text{CD103})\beta_7$ integrin, hereafter referred to as CD103, plays a crucial role in TCR-mediated cytokine secretion and cytotoxic activity toward epithelial tumors by interacting with its ligand, epithelial cell marker E-cadherin, on target cells (8, 9). This integrin is essential in controlling CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) activities, not only by promoting effector T-cell adhesion to tumor cells, but also by triggering intracellular signaling events that costimulate TCR signals (10). A role for CD103 in T-cell homing into epithelia has been suggested (11, 12); however, accumulating evidence indicates a role for CD103 in retention of T-lymphocyte subpopulations in epithelial tissues (13). Consistently, CD103 mediates arrest of T lymphocytes by interacting with E-cadherin on epithelial tumors (9) and recruiting CCR5 at the immune synapse (IS) with cancer cells (14). Moreover, an enhanced CD103⁺ TIL subset correlates with

¹INSERM (Institut National de la Sant   et de la Recherche M  dicale) UMR1186, Laboratory Integrative Tumor Immunology and Genetic Oncology, France. ²INSERM, Gustave Roussy, Univ. Paris-Sud, Universit   Paris-Saclay, Villejuif, France. ³Centre Chirurgial Marie-Lannelongue, Service d'Anatomie Pathologique, LePlessis-Robinson, France. ⁴INSERM UMR1085, IRSET, Universit   de Rennes 1, Rennes, France. ⁵INSERM U1016, Institut Cochin, Paris, France. ⁶CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) UMR8104, Paris, France. ⁷Universit   Paris Descartes, Paris, France.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

M. Leclerc and G. Gros contributed equally to this article.

Corresponding Author: Fathia Mami-Chouaib, Gustave Roussy, 114, Rue Edouard Vaillant, Villejuif 94805, France. Phone: 0033142114965; Fax: 0033142115288; E-mail: fathia.mami-chouaib@gustaveroussy.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1545

  2016 American Association for Cancer Research.

Boutet et al.

improved patient survival in ovarian (15) and lung (16) carcinomas and increased intraepithelial lymphocyte infiltration, suggesting that CD103 promotes recruitment of TIL within epithelial tumor islets. However, the true contribution of CD103 to promoting T-cell infiltration into tumor regions, and the influence of TGF β , abundant within the tumor microenvironment and responsible for *ITGAE* gene expression in TCR-engaged CD8⁺ T lymphocytes (8, 17, 18), on integrin functions remain poorly understood. Using viable human tumor slices (19) and autologous tumor antigen-specific CTL clones, we show here that CD103 promotes T-cell recruitment within epithelial tumor regions and enhances intratumoral T-cell early signaling. We also show that TGF β upregulates CD103-dependent T-cell effector functions by triggering TGFBR1 (activin receptor-like kinase-5, ALK5)-mediated phosphorylation of ILK and its subsequent binding to CD103, thus initiating inside-out signaling leading to activation of the integrin and strengthening of CD103-E-cadherin adhesion.

Materials and Methods

Tumor cell lines, T-cell clones, and freshly isolated TIL

IGR-Heu and IGR-Heu-ICAM-1 tumor cell lines were derived in one of our laboratories in 1996 as previously described (8). Heu171 (CD103⁺/LFA-1⁺) and H32-22 (CD103⁻/LFA-1⁺) T-cell clones were generated from autologous TIL and peripheral blood lymphocytes (PBL), respectively. Cells were regularly tested and authenticated by immunofluorescence analysis and cytotoxic assay including in this work. Fresh CD8⁺ TIL were isolated using a FACS ARIA cell sorter.

Recombinant molecules, antibodies, and chemical inhibitors

Recombinant (r) E-cadherin-Fc (rE-cadh-Fc), rICAM-1-Fc and rFibronectin-Fc molecules were provided by R&D Systems. rCXCL12 and rTGF β was purchased from PeproTech and Abcys, respectively. Anti-CD103 and anti- β_2 mAb were purchased from Beckman Coulter, and PE-conjugated anti-CD103 from eBiosciences. Anti-CD3 (UCHT1) was provided by Ozyme and anti-CD8 by BioLegend. Anti-ILK and anti-phosphorylated (phospho)-ILK (Ser-246) mAb were purchased from Millipore. Anti-TGFBR1 and secondary mAb were provided by Santa Cruz Biotechnology. Anti-AKT/PKB and anti-phospho-AKT were purchased from Cell-Signaling. Anti-KLRG1 was a gift from H Pircher. TGRBR1 kinase inhibitor SB-431542 (SB) and PI3K inhibitor Wortmannin were supplied by Sigma-Aldrich. Phospho-AKT inhibitor MK-2206 was purchased from Millipore and ILK inhibitor QLT-0267 (QLT) from Quadra Logic Technology.

Confocal microscopy analyses

For T-cell adhesion, poly-L-lysine slices were coated with rE-cadh-Fc, rICAM-1-Fc, or rFibronectin-Fc (5 μ g/mL) overnight at 4°C. T cells, nonstimulated or stimulated with rCXCL12 (100 nmol/L) or rTGF β (2 ng/mL), were incubated on precoated slices as described (8, 9). Cells shape index was calculated as the ratio of the longer to the shorter axis measured via Image J software. For protein polarization, lymphocytes, untreated or pretreated with SB (1 μ mol/L), QLT (20 μ mol/L), or with rTGF β were preincubated with IGR-Heu cells, or rE-cadh-Fc-coupled protein G-Dynabeads, at a 2:1 effector to target cell (E:T) ratio and then plated on poly-(L-lysine)-coated coverslips. Cells were stained with mouse anti-CD103, rabbit anti-phospho-ILK, or goat anti-TGFBR1 mAb, followed by anti-mouse-Alexa Fluor-546, anti-rabbit-Alexa Fluor-647 or anti-goat-Alexa Fluor-488

Ab, respectively. Coverslips were analyzed using a fluorescence microscope with $\times 20$ (adhesion) or $\times 63$ (spreading and protein relocalization) lenses as described (9).

Tumor slices and T-cell recruitment experiments

Xenograft tumor samples were embedded in low-gelling-temperature agarose as reported (19). Lymphocytes were stained with SNARF and added onto the cut surface of each slice. In some experiments, T cells were preincubated with neutralizing anti-CD103 (anti- α_E , 10 μ g/mL), anti- β_2 (10 μ g/mL), or anti-CD3 (1 μ g/mL), or treated with rTGF β . Slices were then stained with anti-E-cadherin mAb followed by a secondary Ab (Alexa Fluor-488). Images were acquired with a $\times 4$ or $\times 10$ (S fluor; Nikon) objective and MetaVue imaging software (Universal Imaging).

Single-cell calcium measurement

The calcium response was measured in the same tumor slice with T cells loaded with 1 μ mol/L Fura-2AM (Molecular Probes). One of the two clones was also labeled with 5-chloromethyl-fluorescein diacetate (CMFDA; 5 nmol/L). Fura-2AM-loaded lymphocytes and infiltrated into tumor slices were alternatively excited every 10 s at 350 and 380 nm on an inverted Eclipse TE300 microscope equipped with a $\times 20$ objective and a Metafluor imaging system. Emissions at 510 nm were used for the analysis of Ca²⁺ responses. Values were represented as a ratio: fluorescence intensity at 350 nm/fluorescence intensity at 380 nm.

Western blot and immunoprecipitation experiments

Lymphocytes, untreated or pretreated with rTGF β , were unstimulated or stimulated with plastic-coated rE-cadh-Fc. Equivalent amounts of protein extracts were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane as described (10). Blots were then probed with rabbit anti-phospho(Ser-246)-ILK, anti-phospho(Ser-473)-AKT/PKB, anti-AKT/PKB or anti- β -actin-peroxidase followed by secondary HRP-conjugated Ab.

For immunoprecipitation, T-cell extracts were incubated for 2 h at 4°C with cross-linked anti-TGFBR1 or anti-CD103 beads, or protein G-Sepharose beads prebound with control goat or mouse IgG. Beads were then washed and eluted with reducing agent at 95°C.

Flow cytometric analysis and cytotoxicity assay

For granule exocytosis, T cells, untreated or pretreated with inhibitors or cultured with rTGF β , were stimulated with a combination of rE-cadh-Fc or rICAM-1-Fc (2.5 μ g/mL) and UCHT1 mAb (0.4 μ g/mL) in the presence of anti-CD107 mAb and monensin A (10). A high concentration of anti-CD3 (10 μ g/mL) was used as a control. Cytotoxicity was evaluated with a conventional ⁵¹Cr-release assay (8).

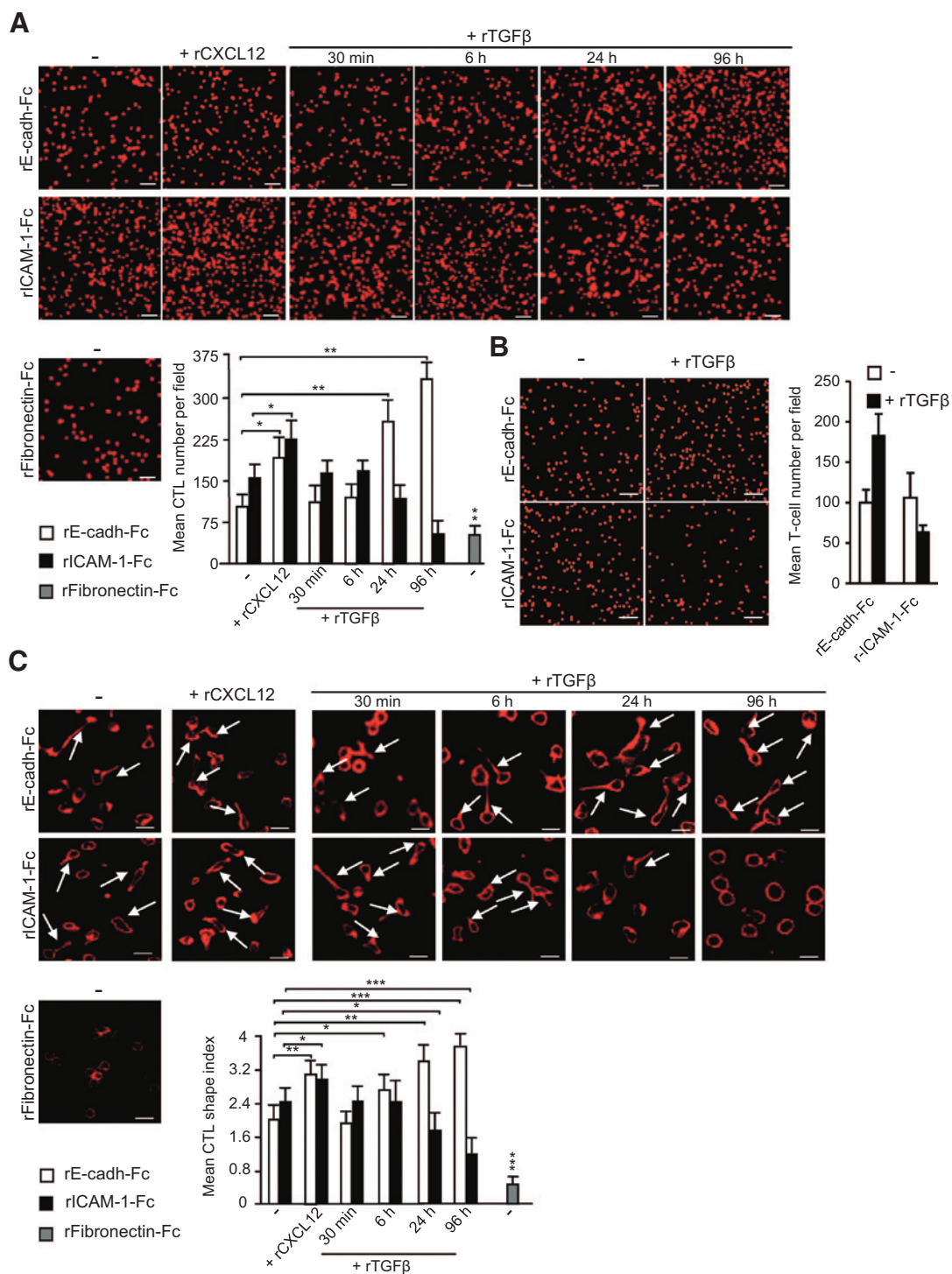
Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the two-tailed Student *t*-test. Two groups were considered as significantly different if *P* < 0.05.

Results

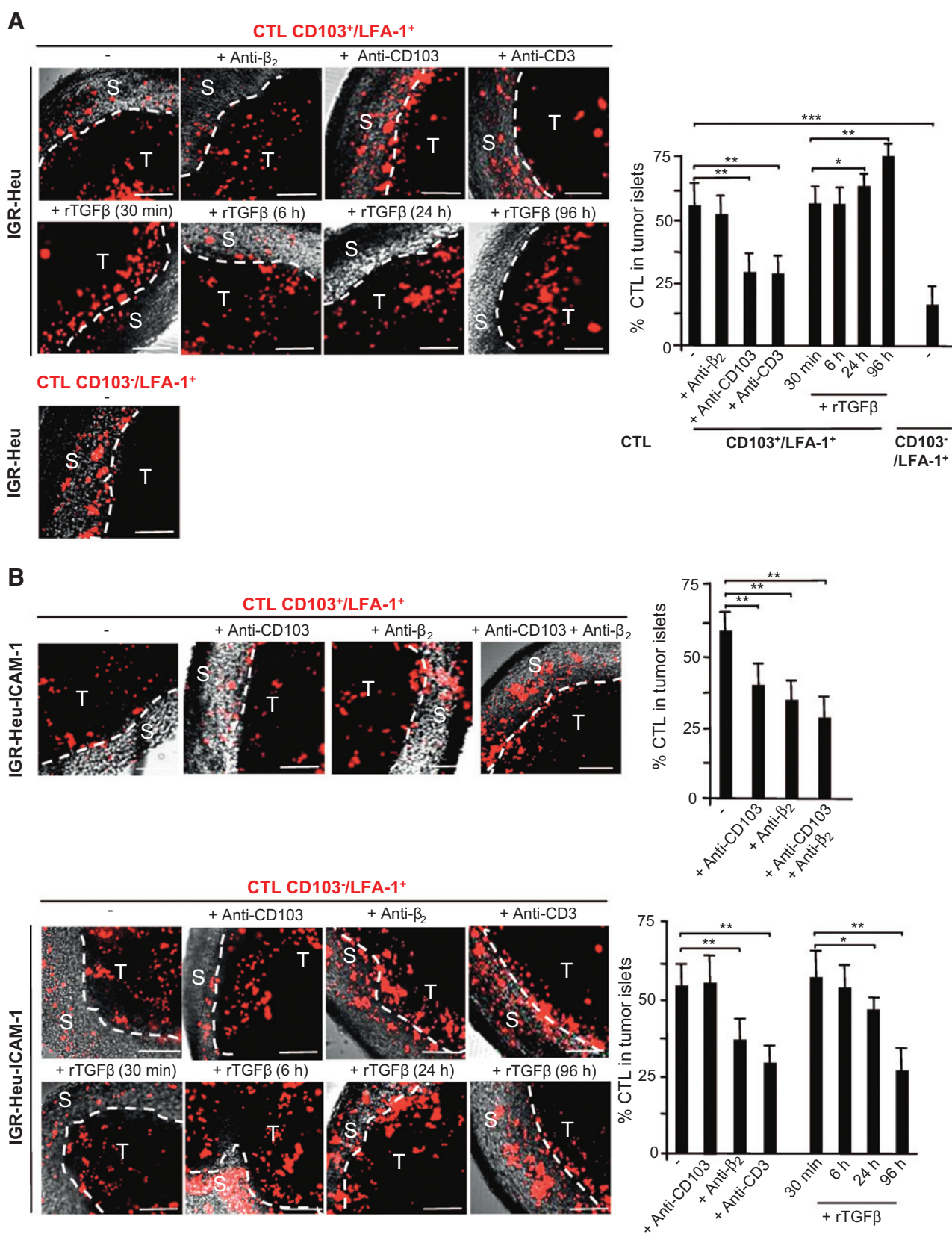
Regulation of CD103-dependent T-cell adhesion and motility by TGF β

Thus far, little is known about the involvement of CD103 in T-cell migration and regulation of integrin activities by TGF β .

**Figure 1.**

Adhesion and filopodia formation are increased following CD103⁺/LFA-1⁺ T-cell stimulation with rCXCL12 or rTGF β . A, adhesion to rE-cadh-Fc or rICAM-1-Fc of the TIL clone, untreated or pretreated with rCXCL12 for 30 min, or with rTGF β for indicated time points, was analyzed by confocal microscopy. rFibronectin-Fc was used as a negative control. Bottom, mean numbers of adherent lymphocytes per field. Adhesion was evaluated by counting adherent lymphocytes stained with TO-PRO-3 iodide. Statistical analyses are from three independent experiments (see Supplementary Table S1). Bars, 100 μ m; *, $P < 0.01$; and **, $P < 0.001$. B, T-cell adhesion was increased following treatment of freshly isolated TIL with rTGF β . Adhesion of CD8⁺ TIL (including up to 60% of CD103⁺ T cells), untreated or pretreated with rTGF β for 96 h, to rE-cadh-Fc or rICAM-1-Fc. Right, mean numbers of adherent cells per field. Results are from one experiment out of three performed with fresh TIL from three different patients. Bars, 500 μ m. C, migratory behavior of CD103⁺/LFA-1⁺ lymphocytes, untreated or pretreated with rCXCL12 or rTGF β , seeded on recombinant molecules. Polymerized F-actin was visualized with rhodamine phalloidin. Arrows, filopodia and/or cell protrusions. Bottom, T-cell shape index. Statistical analyses are from three independent experiments. Bars, 5 μ m; *, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$; and ***, $P < 0.001$.

Boutet et al.



Hence, experiments were performed to compare the effect of TGF β on T-cell adhesion and the migratory behavior of the CD103⁺/LFA-1⁺ TIL clone Heu171 (8) on immobilized human rE-cadh-Fc or rICAM-1-Fc. The rFibronectin-Fc was included as a negative control. rCXCL12, rCCL5, and rCCL20 chemokines, the respective receptors (CXCR4, CCR5, and CCR6), of which are expressed on the T-cell clone surface, were used as positive controls. Indeed, chemokines can trigger integrin-dependent adhesion of lymphocytes by initiating an inside-out signaling leading to integrin activation (20, 21). Results indicated that T lymphocytes stimulated with rCXCL12 (Fig. 1A), rCCL5, or rCCL20 (Supplementary Fig. S1A), adhered more efficiently to both rE-cadh-Fc and rICAM-1-Fc than untreated cells. Of note, incubation of T cells for a short period of time (30 min) with the three chemokines had no effect on LFA-1 and CD103 integrin expression levels (data not shown). Remarkably, treatment of T lymphocytes with rTGF β induced a sharp increase in T-cell adhesion to rE-cadh-Fc starting from 24 h of culture whereas it inhibited lymphocyte adhesion to rICAM-1-Fc (Fig. 1A). Treatment with rTGF β of CD8⁺ TIL freshly isolated from three independent tumors also induced an increase in T-cell adhesion to E-cadherin-Fc whereas it inhibited adhesion to rICAM-1-Fc (Fig. 1B). Opposing effects of TGF β on the adhesion strength of CD103⁺/LFA-1⁺ TIL clone and CD103⁻/LFA-1⁺ PBL counterpart (clone H32-22) to autologous E-cadherin⁺/ICAM-1⁻ (IGR-Heu) and E-cadherin⁺/ICAM-1⁺ (IGR-Heu-ICAM-1) tumor cells, respectively, were also observed under flow conditions (Supplementary Fig. S1B). These results correlated with upregulation of CD103 expression and, in contrast, downregulation of LFA-1 following T-cell incubation with the cytokine (Supplementary Fig. S2A). Notably, T-cell clones, untreated or pretreated with rTGF β , failed to express detectable levels of the E-cadherin inhibitory receptor KLRG1 (data not shown).

Chemokines generate both pro- and anti-adhesive intracellular signaling events, whose equilibrium is relevant to cell movement (21). Therefore, we analyzed morphological changes in CD103⁺/LFA-1⁺ lymphocytes cultured on recombinant molecule-coated surfaces in the absence or presence of rCXCL12, rCCL5, or rCCL20. Compared to untreated T cells, rCXCL12-treated cells overlaid on rE-cadh-Fc or rICAM-1-Fc displayed more active motility behavior characterized by greater polarized cell morphology (Fig. 1C). Indeed, an increase in the percent of cells with larger protrusion sizes was obtained when T lymphocytes were stimulated with rCXCL12 and plated on either of the molecules. Similar results were observed with rCCL5 and rCCL20 (Supplementary Fig. S2B). In contrast, starting from 24 h of treatment, TGF β induced a strong increase in lymphocyte locomotion behavior when T cells were exposed to rE-cadh-Fc, but not to rICAM-1-Fc (Fig. 1C). In addition, live-microscopy imaging revealed that motility was enhanced when T cells were pretreated with rTGF β before culturing them on rE-cadh-Fc, whereas it was compromised when the same pretreated cells were

added onto rICAM-1-Fc (Supplementary Fig. S2C and Movies). These results suggest that TGF β promotes T-cell adhesion and cytoskeleton rearrangement by strengthening the interaction of CD103 with E-cadherin.

TGF β enhances CD103-mediated T-cell recruitment in epithelial tumor islets

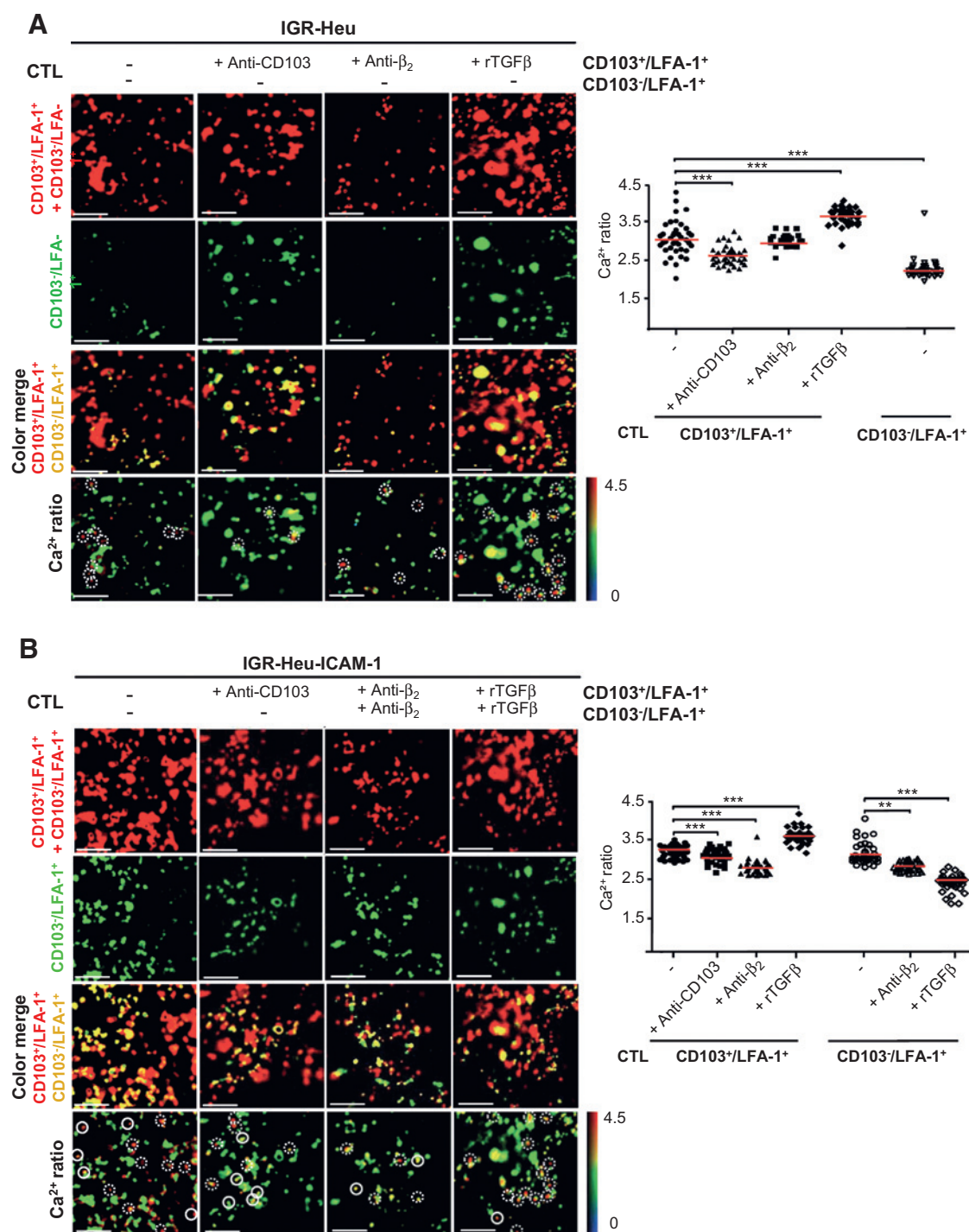
Next, experiments were undertaken to assess the influence of CD103 on T-cell recruitment in tumor regions via our previously described approach using tumor slices (19) obtained from E-cadherin⁺ lung tumor cell line, untransfected or transfected with ICAM-1, engrafted into immunodeficient NOD-SCID mice. Fluorescent-labeled autologous CD103⁺/LFA-1⁺ and CD103⁻/LFA-1⁺ CTL were overlaid onto fresh tumor slices generated from either E-cadherin⁺/ICAM-1⁻ or E-cadherin⁺/ICAM-1⁺ tumors. Slices were stained with anti-E-cadherin mAb to distinguish epithelial from stromal regions (Supplementary Fig. S3A), and then lymphocytes that infiltrated epithelial tumor regions and the stroma were counted. Results indicate that the CD103⁺/LFA-1⁺ TIL clone was much more efficiently recruited within E-cadherin⁺/ICAM-1⁻ tumor islets than the CD103⁻/LFA-1⁺ PBL clone, which was concentrated within stromal regions (Fig. 2A). Moreover, treatment of the CD103⁺/LFA-1⁺ clone with TGF β enhanced T-cell recruitment in tumor regions starting from 24 h of preincubation. In contrast, treatment of the CD103⁻/LFA-1⁺ PBL clone with TGF β alone was unable to induce CD103 expression (8) and thus it had no effect on T-cell recruitment within tumor islets (data not shown). Recruitment of the TIL clone in tumor regions was dependent on CD103 and TCR engagement, because neutralizing anti-CD103 and anti-CD3 mAb dramatically blocked lymphocyte migration by inhibiting T-cell adhesion to E-cadherin⁺ target cells and peptide-MHC-I complex recognition by TCR, respectively. In contrast, neutralizing anti- β 2 mAb, used as a negative control, had no effect on T-cell distribution (Fig. 2A).

We then analyzed the location of both T-cell clones plated on E-cadherin⁺/ICAM-1⁺ tumor slices and the effect of TGF β on this process. Transfection of tumor cells with ICAM-1 only slightly increased recruitment of the CD103⁺/LFA-1⁺ clone in tumor islets, whereas it strongly enhanced CD103⁻/LFA-1⁺ clone migration (Fig. 2B). Moreover, anti- β 2 and anti-CD3 mAb strongly inhibited PBL clone recruitment, whereas anti-CD103, anti- β 2, or a combination of both mAb blocked TIL clone migration toward tumor regions. Notably, pertussis toxin, a bacterial toxin that blocks signaling from G protein-coupled receptors including chemokine receptors had no effect on T-cell distribution (data not shown). In contrast, treatment of the CD103⁻/LFA-1⁺ clone with TGF β resulted in profound inhibition of T-cell recruitment within E-cadherin⁺/ICAM-1⁺ tumor islets, in particular after 96 h of preincubation (Fig. 2B). These results strongly suggest that CD103 is directly involved in T-lymphocyte recruitment in tumor

Figure 2.

Recruitment of CD103⁺/LFA-1⁺ and CD103⁻/LFA-1⁺ lymphocytes within epithelial tumor regions of human lung tumor slices. A, fluorescent-labeled CD103⁺/LFA-1⁺ T cells, untreated or pretreated with neutralizing anti-CD103, anti- β 2, or anti-CD3 mAb, or with rTGF β , were plated on E-cadherin⁺/ICAM-1⁻ tumor (IGR-Heu) slices. Stromal (S) and tumor (T) areas, identified by brightness contrast and confirmed by E-cadherin labeling (see Supplementary Fig. S3A). Lymphocytes were stained with SNARF. Right, percentages of cells inside tumor areas are from three independent experiments. B, CD103⁺/LFA-1⁺ or CD103⁻/LFA-1⁺ lymphocytes, untreated or pretreated with neutralizing anti-CD103, anti-CD3, or anti- β 2 mAb, or with rTGF β , were overlaid onto E-cadherin⁺/ICAM-1⁺ (IGR-Heu-ICAM-1) tumor slices. Right, percentages of T cells inside tumor areas are from three independent experiments out of 6. Bars, 100 μ m; *, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$; and ***, $P < 0.0001$.

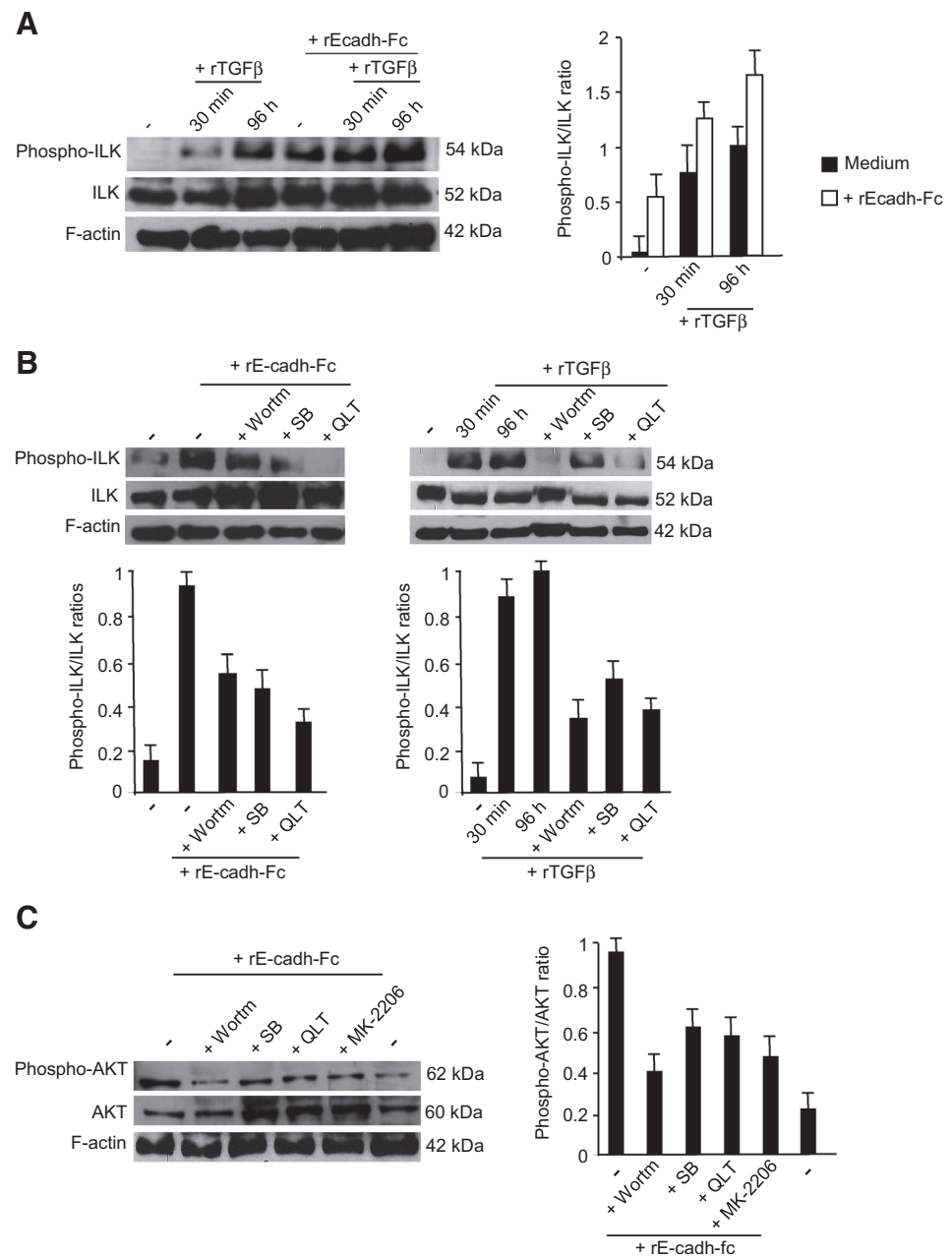
Boutet et al.

**Figure 3.**

Calcium response of T cells within epithelial islets of lung tumor slices. A, CD103⁺/LFA-1⁺ and CD103⁻/LFA-1⁺ CTL were loaded with Fura-2 probe (top, red). CD103⁻/LFA-1⁺ T cells were also labeled with CMFDA (green) to distinguish them from CD103⁺/LFA-1⁺ cells. Thus, CD103⁺/LFA-1⁺ lymphocytes appeared in red, whereas CD103⁻/LFA-1⁺ lymphocytes appeared in yellow (a merge of red and green dyes) in color merge panels. Loaded T cells were added to a tumor slice 1 h before the recording. Calcium response, represented in pseudo-colors (from green, average calcium level to red, strong calcium level), of CD103⁺/LFA-1⁺, untreated or pretreated with neutralizing anti-CD103 or anti- β_2 , or with rTGF β for 96 h, and CD103⁻/LFA-1⁺ lymphocytes within E-cadherin⁺/ICAM-1⁻ (IGR-Heu) tumor areas. White dotted circles correspond to CD103⁺/LFA-1⁺ responding cells. Right, quantification of intracellular Ca²⁺. B, calcium response of CD103⁺/LFA-1⁺ and CD103⁻/LFA-1⁺ lymphocytes, untreated or pretreated with neutralizing anti-CD103 or anti- β_2 mAb, or with rTGF β , in tumor islets of E-cadherin⁺/ICAM-1⁺ (IGR-Heu-ICAM-1) slices. White dotted and full circles correspond to CD103⁺/LFA-1⁺ and CD103⁻/LFA-1⁺ responding lymphocytes, respectively. Right, quantification of intracellular calcium response. Statistical analyses are from three independent experiments. Bars, 100 μ m; **, $P < 0.001$; and ***, $P < 0.0001$.

Figure 4.

Engagement of CD103 on CD103⁺/LFA-1⁺ lymphocytes with rE-cadh-Fc-induced phosphorylation of ILK and AKT. A, engagement of CD103 with rE-cadh-Fc or treatment of the CD103⁺/LFA-1⁺ clone with TGF β -induced phosphorylation of ILK. Lymphocytes, untreated or pretreated with rTGF β for indicated time points, were stimulated with immobilized rE-cadh-Fc and then protein extracts were analyzed by Western blot using anti-phospho-ILK or anti-ILK mAb. F-actin was used as a loading control. Right, normalization of phospho-ILK relative to total ILK. B, Wortmannin (Wortm), SB, and QLT inhibit ILK phosphorylation induced by CD103 engagement with rE-cadh-Fc or rTGF β stimulation. CD103⁺/LFA-1⁺ lymphocytes were pretreated with PI3K, TGFBR1, or ILK inhibitors and then stimulated with immobilized rE-cadh-Fc or with rTGF β . T-cell protein extracts were analyzed by Western blot. Bottom, normalization of phospho-ILK relative to ILK. C, Wortmannin, SB, QLT, and MK-2206 inhibit AKT phosphorylation induced by CD103 engagement with rE-cadh-Fc. CD103⁺/LFA-1⁺ lymphocytes were pretreated for 1 h with either of the inhibitors and then stimulated with immobilized rE-cadh-Fc. Protein extracts were analyzed by Western blot using indicated mAb. Right, normalization of phospho-AKT relative to AKT. Statistical analyses are from three independent experiments.



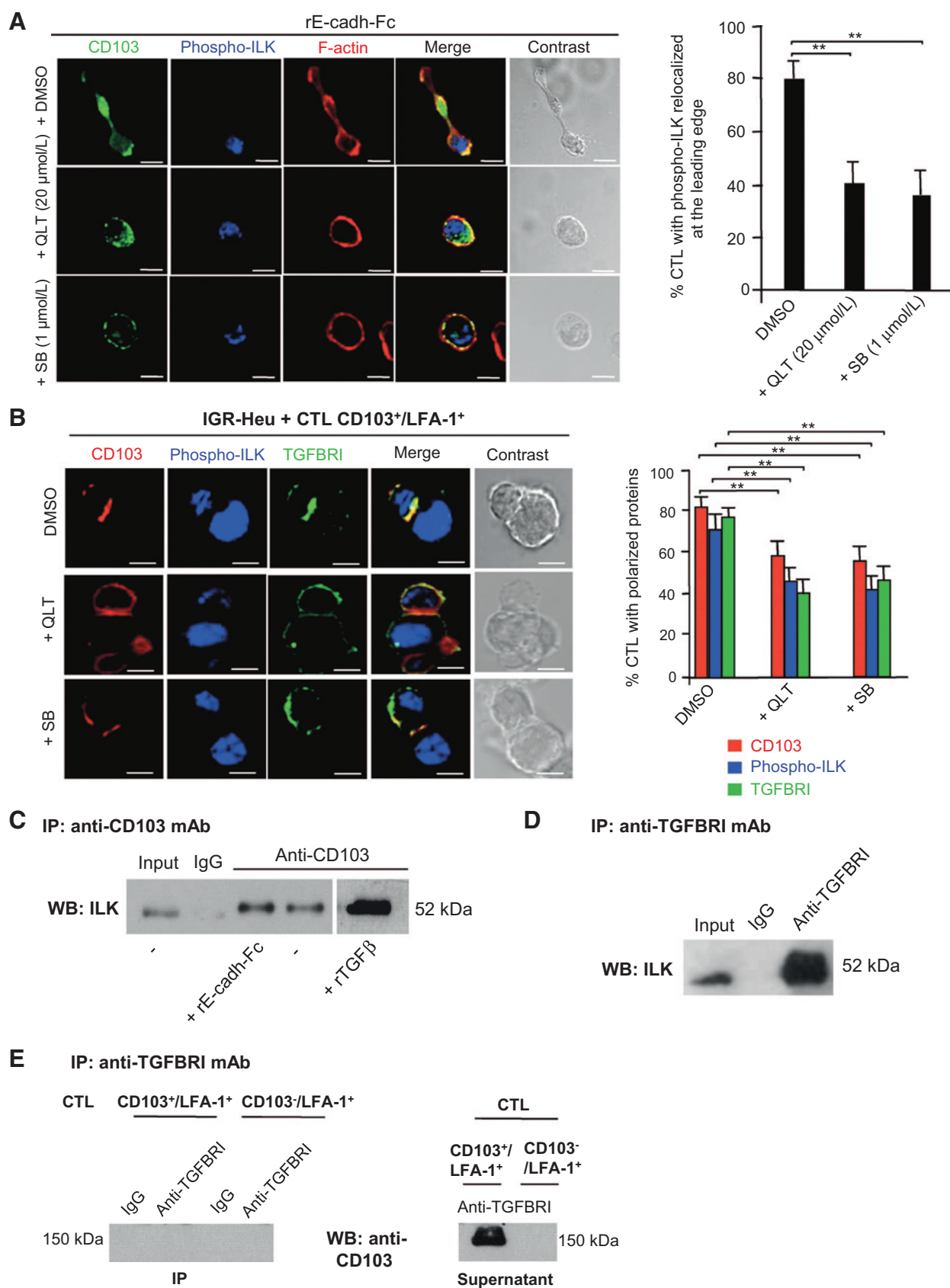
islets and that TGF β upregulates its functions, whereas it has opposing effects on LFA-1.

TGF β potentiates intratumoral early signaling of CD103⁺ lymphocytes

Imaging of the intracellular calcium increase is a powerful means of monitoring the dynamics of T-lymphocyte activation. We therefore evaluated the role of CD103 and the influence of TGF β on the Ca²⁺ response triggered in CTL CD103⁺/LFA-1⁺ and CD103⁻/LFA-1⁺. T-cell clones, untreated or pretreated with rTGF β , were labeled with Fura-2 (red) to monitor calcium response. The CD103⁺/LFA-1⁺ clone was also labeled with CMFDA fluorescent dye (green; thus appearing in yellow) in order to identify each T-cell population on the same slice. The two

clones were then added simultaneously to tumor slices, untransfected or transfected with ICAM-1. Results indicated that CTL CD103⁺/LFA-1⁺, added to the E-cadherin⁺/ICAM-1⁻ slice and recruited within tumor islets, displayed a much stronger calcium response than CTL CD103⁻/LFA-1⁺ (Fig. 3A). Moreover, neutralizing anti-CD103 induced a decrease in the calcium level of the TIL clone, whereas anti- β 2 mAb, used as a negative control, had no effect. Remarkably, treatment of the TIL clone with rTGF β induced a sharp increase in the T-cell calcium response. An increase in CD103⁺/LFA-1⁺ Ca²⁺ response was also observed when the T-cell clone was pretreated with TGF β and plated on a monolayer of E-cadherin⁺/ICAM-1⁻ IGR-Heu tumor cells, which was inhibited when T lymphocytes were preincubated with neutralizing anti-CD103 mAb (Supplementary Fig. S3B). In contrast, treatment of

Boutet et al.



the CD103⁻/LFA-1⁺ PBL clone with TGF β alone failed to induce CD103 expression and thus a marginal calcium response was observed when T cells were added to E-cadherin⁺/ICAM-1⁻ tumor cells (data not shown).

We then monitored Ca²⁺ signaling of both clones plated on E-cadherin⁺/ICAM-1⁺ tumor slices. As expected, a strong calcium response was obtained with the CD103⁺/LFA-1⁺ clone, which was inhibited by both anti-CD103 and anti- β_2 blocking mAb. Transfection of tumor cells with ICAM-1 induced a strong Ca²⁺ increase in the CD103⁻/LFA-1⁺ clone, which was blocked by neutralizing anti- β_2 . Importantly, treatment of the PBL clone with TGF β strongly inhibited early T-cell signaling (Fig. 3B). These results suggest a crucial role of CD103 in regulating TCR-mediated activities within a TGF β -rich tumor ecosystem and that TGF β is involved in the CD103 signaling pathway.

TGF β regulates CD103 activation via ILK phosphorylation

The signaling pathway of CD103 and its contribution to T-cell migration and functions within epithelial tissues are unknown. ILK, a serine/threonine kinase, has been reported to mediate integrin signaling and to play a role in leukocyte recruitment (22) and T-cell chemotaxis (23). Moreover, a role for TGF β in regulating ILK expression and activation has been reported (24). We therefore analyzed the involvement of ILK in CD103 signaling and the effect of TGF β on integrin activation in CD103⁺/LFA-1⁺ CTL. Initial experiments indicated that TGF β upregulated *ILK* gene transcription starting from 6 h of T-cell clone treatment (Supplementary Fig. S3C). Moreover, stimulation of the clone with immobilized rE-cadh-Fc and/or rTGF β triggered phosphorylation of ILK at Ser 246 (Fig. 4A), which was strongly inhibited by the ILK inhibitor QLT, the TGFBR1 inhibitor SB, the PI3K inhibitor Wortmannin (Fig. 4B), and anti-CD103 mAb (Supplementary Fig. S3D). Notably, inhibition of ILK phosphorylation resulted in a marked decrease in CTL adhesion on immobilized rE-cadh-Fc (Supplementary Fig. S3E). Stimulation of the TIL clone with rE-cadh-Fc also induced phosphorylation of the PKB/AKT at Ser-473, which was strongly inhibited by the AKT inhibitor MK-2206 and QLT, SB, and Wortmannin (Fig. 4C). Of note, incubation of lymphocytes for a short period of time (1 h) with all inhibitors had no effect on integrin expression level and T-cell viability, as checked by CD103 and annexin V labeling, respectively (data not shown).

Next, we evaluated the consequences of CD103 engagement with its ligand on ILK localization in CD103⁺/LFA-1⁺ TIL plated on a rE-cadh-Fc-coated slide. Results indicate that the CD103-E-cadherin interaction resulted not only in T-cell spreading, but also

in recruitment of phospho-ILK, together with CD103, at the leading edge of migrating CTL presenting a high actin cytoskeleton rearrangement (Fig. 5A). Moreover, ILK and TGFBR1 inhibitors induced a marked decrease in phospho-ILK recruitment at the leading edge. Together, these results suggested that TGFBR1 serine kinase catalyzed, even in the absence of its ligand, phosphorylation of ILK through a PI3K-dependent pathway and that phospho-ILK and phospho-AKT were involved in CD103 signaling.

ILK recruitment and phosphorylation by TGFBR1 triggers binding to CD103

Because the interaction of ILK with β -integrins is important for intracellular signaling, we first monitored the localization of phospho-ILK and TGFBR1 in conjugates formed between CD103⁺/LFA-1⁺ T cells and E-cadherin⁺/ICAM-1⁻ tumor cells. Results revealed polarization of phospho-ILK, together with CD103 and TGFBR1, at the IS, which was inhibited by QLT and SB (Fig. 5B), as well as siRNA targeting E-cadherin (Supplementary Fig. S4A). Consistently, shRNA targeting ILK also inhibited CD103 polarization (Supplementary Figs. S4B and S4C) and AKT phosphorylation (data not shown). In contrast, treatment of the TIL clone with rTGF β induced an increase in synaptic relocalization of CD103, phospho-ILK, and TGFBR1 (Supplementary Fig. S4D).

To explore a potential link between TGFBR1, phospho-ILK, and CD103, we searched for physical interactions between these proteins. Therefore, we performed immunoprecipitation experiments using anti-CD103 or anti-TGFBR1 mAb and immunoblotting with anti-ILK. Results revealed that ILK bound to CD103 (Fig. 5C) and TGFBR1 (Fig. 5D), and that TGF β , and to a lesser extent rE-cadh-Fc, enhanced ILK linking to CD103. Notably, no direct interaction between CD103 and TGFBR1 was observed, because CD103 was detected only in the supernatant of immunoprecipitation with anti-TGFBR1 (Fig. 5E). These results further support the hypothesis that the interaction of TGF β with its receptors induces recruitment and phosphorylation of ILK by TGFBR1 and its subsequent binding to the CD103 intracellular domain, resulting in AKT phosphorylation and thereby initiating integrin inside-out signaling.

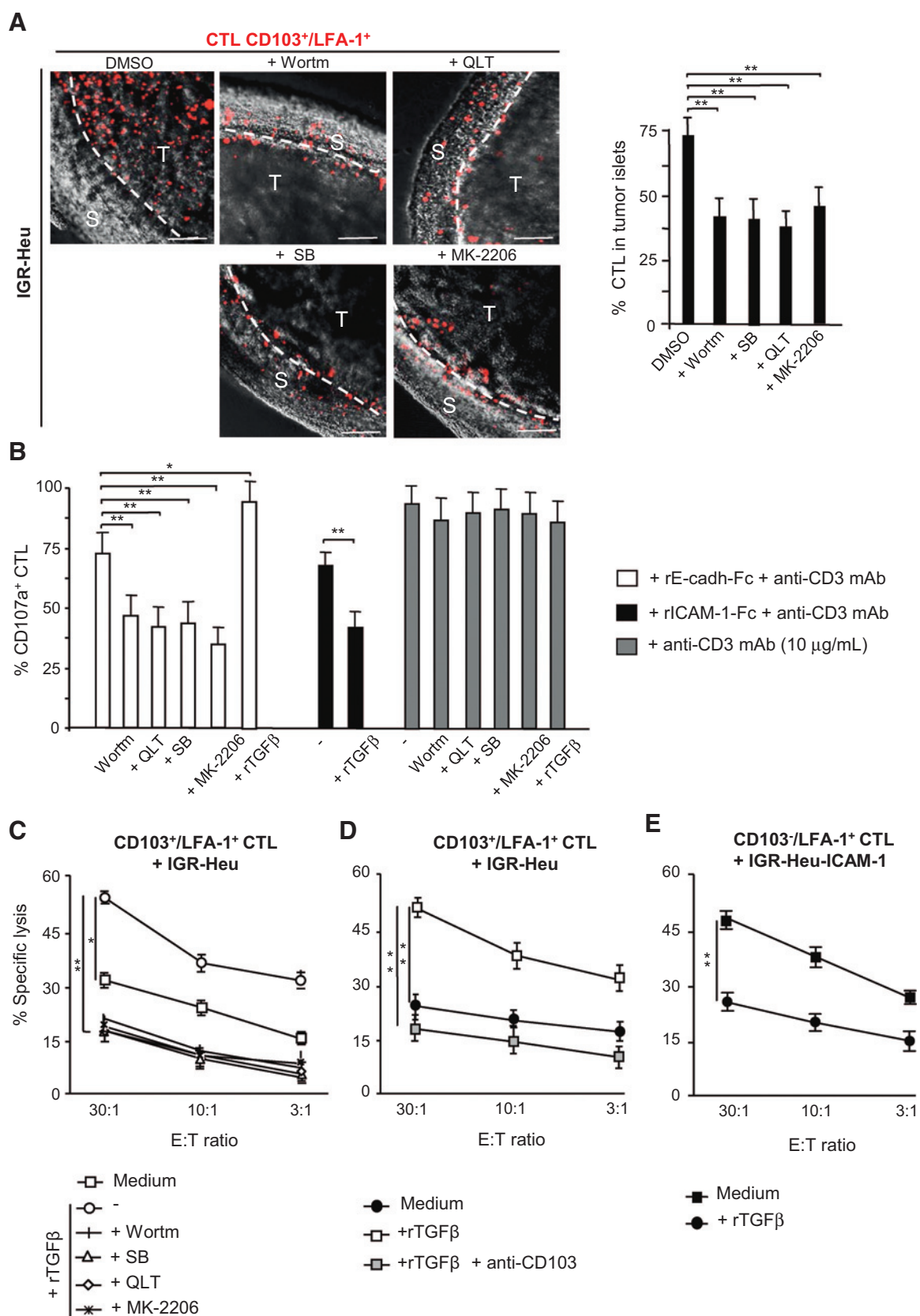
TGF β regulates CD103-dependent CTL activities via PI3K-ILK-AKT pathway

Experiments were then conducted to evaluate the contribution of PI3K-ILK-AKT pathway in CD103-mediated T-cell functions. Using the tumor slice system, results indicated that Wortmannin, SB, QLT, and MK-2206 inhibited T-cell recruitment in epithelial

Figure 5.

Engagement of CD103 on the T-cell surface with E-cadherin resulted in polarization of phospho-ILK and its subsequent binding to CD103. A, engagement of CD103 with immobilized rE-cadh-Fc resulted in polarization of phospho-ILK at the leading edge. CD103⁺/LFA-1⁺ T cells, untreated or pretreated with QLT or SB, were plated on plastic-coated rE-cadh-Fc, and then lymphocytes were analyzed for intracellular protein distribution by confocal microscopy using anti-phospho-ILK, anti-CD103, or anti-F-actin. Right, percentages of T cells displaying polarized phospho-ILK at the leading edge ($n = 40$). B, the CD103-E-cadherin interaction induced recruitment of phospho-ILK at the IS. Conjugates between CD103⁺/LFA-1⁺ CTL, untreated or treated with QLT or SB, and IGR-Heu tumor cells were analyzed for CD103, phospho-ILK, and TGFBR1 polarization. Right, percentages of cells displaying polarized proteins ($n = 35$). Statistical analyses are from one experiment out of three. Bars, 5 μ m. **, $P < 0.001$. C, ILK binds to CD103. Protein extracts from CD103⁺/LFA-1⁺ lymphocytes, stimulated with immobilized rE-cadh-Fc for 30 min or rTGF β for 96 h, were immunoprecipitated (IP) using anti-CD103 mAb and then immunoblotted (WB) with anti-ILK. An IgG negative control was included. D, TGFBR1 binds to ILK. CD103⁺/LFA-1⁺ cells were treated with rTGF β and then protein extracts were immunoprecipitated with anti-TGFBR1, followed by immunoblotting with anti-ILK. Results are from one experiment out of three. E, TGFBR1 does not bind to CD103. Protein extracts from CD103⁺/LFA-1⁺ lymphocytes were immunoprecipitated with anti-TGFBR1 mAb and then immunoblotted with anti-CD103. The CD103⁻/LFA-1⁺ clone and IgG were used as negative controls. Right, CD103 detected in the supernatant of CD103⁺/LFA-1⁺ CTL.

Boutet et al.



tumor islets (Fig. 6A). We then analyzed the effect of all the inhibitors and the influence of TGF β on CD103-dependent T-cell clone degranulation. As shown in Fig. 6B, CD103⁺/LFA-1⁺ T cells cultured with rTGF β and stimulated with a combination of anti-CD3 plus rE-cadh-Fc expressed higher surface levels of CD107a than T cells exposed to a combination of anti-CD3 and rICAM-1-Fc. Moreover, Wortmannin, SB, QLT, and MK-2206 induced a decrease in T-cell degranulation triggered by a combination of anti-CD3 plus rE-cadh-Fc, whereas they had no effect on CD107a expression induced by a high dose of anti-CD3. Consistently, SB and QLT strongly inhibited cytotoxic granule polarization at the contact area between CD103⁺/LFA-1⁺ CTL and rE-cadh-Fc-coupled beads (Supplementary Fig. S5A). In addition, although TGF β inhibited granzyme B polarization at the contact area between the TIL clone and rICAM-1-Fc-coupled beads, it had no effect on serine protease relocalization at the contact zone with rE-cadh-Fc-coated beads.

We then evaluated the effect of TGF β , PI3K, TGFBR1, phospho-ILK, and phospho-AKT inhibitors on T-cell clone-mediated cytotoxicity toward target cells. Incubation of the CD103⁺/LFA-1⁺ clone with rTGF β enhanced E-cadherin⁺/ICAM-1⁻ IGR-Heu tumor cell killing (Fig. 6C), which was inhibited in the presence of neutralizing anti-CD103 (Fig. 6D), whereas Wortmannin, SB, QLT, and MK-2206 inhibited target cell lysis (Fig. 6C). Notably, all inhibitors had no effect on T-cell clone-mediated CD3-redirected cytotoxicity of the P815 target (Supplementary Fig. S5B). In contrast, culture of the CD103⁻/LFA-1⁺ CTL clone in the presence of TGF β dramatically inhibited E-cadherin⁺/ICAM-1⁺ IGR-Heu-ICAM-1 target cell lysis (Fig. 6E). Notably, TGF β had no effect on granzyme B expression levels in both T-cell clones (data not shown). These results further emphasize the role of PI3K, TGFBR1, phospho-ILK, and phospho-AKT/PKB in CD103 signaling and the positive effect of TGF β in antitumor CTL-mediated activities.

Discussion

In this report, we identified CD103 and its ligand E-cadherin as important adhesion molecules stimulating recruitment and effector functions of activated CD8⁺/CD103⁺ TIL inside human lung tumors. In agreement with our previous studies, we also show that CD8⁺/CD103⁻ T cells accumulate preferentially within the tumor stroma and display inefficient antitumor activities (19). Along the same line, it has been reported that mouse CD103^{-/-} T cells failed to infiltrate allograft islets, suggesting that CD103 promotes intragraft migration of CD8⁺ effectors into epithelial islets (25). Our data are consistent with a key role for CD103 in promoting entry of tumor antigen-specific CD8⁺ T cells into epithelial tumor islets and in triggering antitumor T-cell functions. Recognition of tumor antigen by TCR also plays an impor-

tant role, because anti-CD3 mAb inhibited T-cell recruitment into tumor regions. It is possible that CD103 contributes to intratumoral scanning of target cells for cognate antigen recognition.

CD103 and LFA-1 are the predominant integrins expressed by TIL and both are likely involved in T-cell adhesion and migration within and toward epithelial tumors, respectively. Indeed, we show here that LFA-1, through an interaction with ICAM-1, also induced T-cell infiltration within tumor nests. However, tumors often express low levels of ICAM (26) and produce high amounts of TGF β (27), thus altering LFA-1 expression and functions (ref. 28 and this study). Indeed, this cytokine shifted the integrin expression profile of tumor-specific TIL from LFA-1^{high}/CD103^{low} to LFA-1^{low}/CD103^{high}. Thus, CD103 most likely corresponds to an important integrin for adjusting T-cell adhesion and migratory potential in the tumor ecosystem, where TGF β is abundant. Along this line, it has been reported that murine CD103 determines cell shape and motility, and confers the ability to move in an actin-polymerization-dependent manner (29). These results suggest that CD103-mediated cell movement probably involves signaling interactions with components of the cytoskeleton. Likewise, we show here that human CD103 confers the capacity to CD8⁺ T cells to form protrusions/filopodia in an E-cadherin-dependent fashion. Moreover, TGF β strongly optimizes T-cell adhesion and motility by enhancing CD103 expression levels and initiating intracellular signals, resulting in integrin activation.

TGF β is known to inhibit cell growth in benign cells but promotes progression in cancer cells (30). Moreover, TGF β signaling in peripheral T lymphocytes is essential for tolerance and homeostasis by restraining TCR activation-dependent Th1, cytotoxic, and NKT cell differentiation program (31, 32). This cytokine, produced by stromal and tumor cells, is also described as an immunosuppressive factor used by malignant cells to escape from the immune response and to compromise CTL activities (33). Paradoxically, TGF β is involved in promoting antitumor CD8⁺ T-cell effector functions within epithelial tumors by inducing CD103 upon TCR engagement and by adjusting its expression levels. TGF β also plays an essential role in the formation and long-term persistence of tissue-resident memory T cells (T_{RM}), at least in part via induction of CD103 (34). Importantly, our data indicate that TGF β also contributes to T-cell migration toward epithelial tumor islets and subsequent cancer cell destruction. This paradoxical effect of TGF β on T-cell functions is most likely associated with the use in this study of CD103⁺/LFA-1⁺ lymphocytes whereas most of the previous studies were based on peripheral T cells, which generally express a CD103⁻/LFA-1⁺ phenotype. Consistently, we show here that TGF β is responsible for arrest of LFA-1-dependent T-cell migration within stromal regions by preventing integrin expression and functions. It has been reported that TGF β inhibits phosphorylation of Erk and, thereby, LFA-1-mediated

Figure 6.

Phospho-ILK and phospho-AKT are involved in CTL activities. A, recruitment of fluorescent-labeled CD103⁺/LFA-1⁺ lymphocytes, untreated or pretreated with Wortmannin, SB, QLT, or MK-2206 inhibitors, within epithelial tumor regions of lung tumor (IGR-Heu) slices. Stromal (S) and tumor (T) areas were identified by brightness contrast. Right, percentages of T cells inside tumor areas were determined from three independent experiments. Bars, 100 μ m. B, CD103⁺/LFA-1⁺ lymphocytes, untreated or pretreated with rTGF β for 96 h or with indicated inhibitors for 1 h, were incubated with a combination of rE-cadh-Fc plus a suboptimal concentration of anti-CD3 mAb. A combination of a suboptimal concentration of anti-CD3 plus rICAM-1-Fc or a high concentration of anti-CD3 was used as controls. Data correspond to percentages of CD107a⁺ lymphocytes from two independent experiments out of three. C, cytotoxic activity of CD103⁺/LFA-1⁺ CTL, untreated or pretreated with rTGF β and then with indicated inhibitors, toward autologous E-cadherin⁺/ICAM-1⁻ (IGR-Heu) tumor cells. D, cytotoxicity of CD103⁺/LFA-1⁺ CTL, untreated or pretreated with rTGF β and then either left in medium or preincubated with neutralizing anti-CD103 mAb, toward autologous E-cadherin⁺/ICAM-1⁻ tumor cells. E, cytotoxic activity of CD103⁻/LFA-1⁺ CTL, untreated or pretreated with rTGF β , toward autologous E-cadherin⁺/ICAM-1⁺ (IGR-Heu-ICAM-1) tumor cells. *, $P < 0.01$ and **, $P < 0.001$.

T-cell adhesion and chemotaxis (28, 35). In contrast, this cytokine contributes to CD103 signaling by upregulating ILK expression and inducing its phosphorylation. TGF β initiates signaling by binding to TGFBR, leading to formation of a hetero-tetrameric complex composed of TGFBR1 and TGFBR2 dimers, in which TGFBR2 catalyzes phosphorylation of the cytoplasmic domain of TGFBR1 (36). In addition to the Smad pathway, TGF β utilizes multiple non-Smad pathways, including PI3K/AKT pathway, to regulate a wide range of cell functions (37). We show here that TGFBR1 recruits and phosphorylates ILK, which then binds to the α_E subunit of CD103, leading to AKT/PKB phosphorylation and thus initiating integrin inside-out signaling. It has been reported that ILK associates with TGFBR2 and that *ILK* gene inactivation results in a decrease in TGFBR2 signaling (38).

ILK is a serine–threonine kinase that interacts with intracytoplasmic domains of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins and cytoskeletal-associated proteins (39). This kinase is associated with integrin activation and intracellular signaling (40), and has been reported to mediate actin filament rearrangement and tumor cell migration and invasion through PI3K/AKT/Rac1 signaling (41). Indeed, ILK directly binds to AKT/PKB and contributes to its phosphorylation, thereby regulating several signaling pathways including spreading and migration (42). Consistently, our results indicated that ILK is directly involved in CD103 intracellular signaling by promoting phosphorylation of AKT/PKB and that the CD103–E-cadherin interaction induced phosphorylation of ILK and its subsequent polarization at the leading edge of migrating T cells. Implication of ILK in both inside-out and outside-in integrin signaling pathways (43, 44) and in $\beta 2$ integrin-mediated polarization of lytic granules toward the target have also been reported (45). Our data suggest that ILK functions as a key component of a protein complex formed upon CD103 clustering that may connect extracellular ligands with the T-cell intracellular signaling complex. We also show here that TGF β corresponds to an important factor that not only activates α_E (CD103) subunit expression, but also locally regulates integrin activation and signaling via the ILK and AKT/PKB pathway. This leads to strengthening of CD103–E-cadherin interaction, thereby initiating outside-in signaling that promotes CD103-mediated T-cell functions such as T-cell spreading, migration, and cytotoxicity.

Overall, our data expand our knowledge of CD8⁺ T-cell locomotion within epithelial tissues and provide more insight into

mechanisms that promote CD103 signaling within a TGF β -rich tumor microenvironment. Thus, CD103–E-cadherin adhesive interactions regulate multiple local T-cell activities, including adhesion, Ca²⁺ response, and recruitment within epithelial tumor regions. This integrin is also involved in T-lymphocyte proliferation, cytokine secretion, cytotoxic IS maturation, and killing of epithelial target cells (8, 9, 14, 46). These findings are consistent with a general role of CD103 in promoting CD8 T-cell immune responses within epithelial tumors and may contribute to optimizing current T-cell–based cancer immunotherapy strategies.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: M. Boutet, F. Mami-Chouaib

Development of methodology: N. Th  ret, E. Donnadi  u, F. Mami-Chouaib

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): M. Boutet, L. Gauthier, M. Leclerc, G. Gros, V. de Montpreville, E. Donnadi  u, F. Mami-Chouaib

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): M. Boutet, L. Gauthier, E. Donnadi  u, F. Mami-Chouaib

Writing, review, and/or revision of the manuscript: M. Boutet, L. Gauthier, N. Th  ret, F. Mami-Chouaib

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): F. Mami-Chouaib

Study supervision: F. Mami-Chouaib

Acknowledgments

The authors thank S. Salom  -Desmoulez for her help with confocal microscopy.

Grant Support

This work was supported by grants from the INSERM, Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Institut National du Cancer (INCa), and Ligue contre le Cancer. M. Boutet was a recipient of a fellowship from Canc  ropole IDF and Gustave Roussy (SIRIC-SOCRATE).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received June 4, 2015; revised December 18, 2015; accepted January 3, 2016; published OnlineFirst February 26, 2016.

References

- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Page C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313:1960–4.
- Pribila JT, Quale AC, Mueller KL, Shimizu Y. Integrins and T cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 2004;22:157–80.
- Epler JA, Liu R, Shimizu Y. From the ECM to the cytoskeleton and back: how integrins orchestrate T cell action. *Dev Immunol* 2000;7:155–70.
- van Kooyk Y, Figdor CG. Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:542–7.
- Constantin G, Majeed M, Giagulli C, Piccio L, Kim JY, Butcher EC, et al. Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* 2000;13:759–69.
- Dustin ML, Springer TA. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 1989;341:619–24.
- Lek HS, Morrison VL, Conneely M, Campbell PA, McGloin D, Kliche S, et al. The spontaneously adhesive leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) integrin in effector T cells mediates rapid actin- and calmodulin-dependent adhesion strengthening to ligand under shear flow. *J Biol Chem* 2013;288:14698–708.
- Le Floch A, Jalil A, Vergnon I, Le Maux Chansac B, Lazar V, Bismuth G, 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* 2007;204:559–70.
- Franciszkiwicz K, Le Floch A, Boutet M, Vergnon I, Schmitt A, Mami-Chouaib F. CD103 or LFA-1 engagement at the immune synapse between cytotoxic T cells and tumor cells promotes maturation and regulates T-cell effector functions. *Cancer Res* 2013;73:617–28.
- Le Floch A, Jalil A, Franciszkiwicz K, Validire P, Vergnon I, Mami-Chouaib F. Minimal engagement of CD103 on cytotoxic T lymphocytes with an E-cadherin-Fc molecule triggers lytic granule polarization via

- a phospholipase Cgamma-dependent pathway. *Cancer Res* 2011;71:328–38.
11. Wagner N, Lohler J, Kunkel EJ, Ley K, Leung E, Krissansen G, et al. Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. *Nature* 1996;382:366–70.
 12. Lefrançois L, Parker CM, Olson S, Muller W, Wagner N, Schon MP, et al. The role of beta7 integrins in CD8 T cell trafficking during an antiviral immune response. *J Exp Med* 1999;189:1631–8.
 13. Schon MP, Arya A, Murphy EA, Adams CM, Strauch UG, Agace WW, et al. Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice. *J Immunol* 1999;162:6641–9.
 14. Franciszkiwicz K, Le Floch A, Jalil A, Vigant F, Robert T, Vergnon I, et al. Intratumoral induction of CD103 triggers tumor-specific CTL function and CCR5-dependent T-cell retention. *Cancer Res* 2009;69:6249–55.
 15. Webb JR, Milne K, Watson P, Deleew RJ, Nelson BH. Tumor-infiltrating lymphocytes expressing the tissue resident memory marker CD103 are associated with increased survival in high-grade serous ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2014;20:434–44.
 16. Djenidi F, Adam J, Goubar A, Durgeau A, Meurice G, de Montpreville V, 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* 2015;194:3475–86.
 17. Parker CM, Cepek KL, Russell GJ, Shaw SK, Posnett DN, Schwarting R, et al. A family of beta 7 integrins on human mucosal lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:1924–8.
 18. 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* 2014;192:2471–9.
 19. Salmon H, Franciszkiwicz K, Damotte D, Dieu-Nosjean MC, Validire P, Trautmann A, et al. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J Clin Invest* 2012;122:899–910.
 20. Kinashi T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 2005;5:546–59.
 21. Laudanna C, Kim JY, Constantin G, Butcher E. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol Rev* 2002;186:37–46.
 22. Friedrich EB, Sinha S, Li L, Dedhar S, Force T, Rosenzweig A, et al. Role of integrin-linked kinase in leukocyte recruitment. *J Biol Chem* 2002;277:16371–5.
 23. Liu E, Sinha S, Williams C, Cyrille M, Heller E, Snapper SB, et al. Targeted deletion of integrin-linked kinase reveals a role in T-cell chemotaxis and survival. *Mol Cell Biol* 2005;25:11145–55.
 24. Janji B, Melchior C, Gouon V, Vallar L, Kieffer N. Autocrine TGF-beta-regulated expression of adhesion receptors and integrin-linked kinase in HT-144 melanoma cells correlates with their metastatic phenotype. *Int J Cancer* 1999;83:255–62.
 25. Feng Y, Wang D, Yuan R, Parker CM, Farber DL, Hadley GA. CD103 expression is required for destruction of pancreatic islet allografts by CD8 (+) T cells. *J Exp Med* 2002;196:877–86.
 26. Passlick B, Pantel K, Kubuschok B, Angsturm M, Neher A, Thetter O, et al. Expression of MHC molecules and ICAM-1 on non-small cell lung carcinomas: association with early lymphatic spread of tumour cells. *Eur J Cancer* 1996;32A:141–5.
 27. Asselin-Paturel C, Echchakir H, Carayol G, Gay F, Opolon P, Grunenwald D, et al. Quantitative analysis of Th1, Th2 and TGF-beta1 cytokine expression in tumor, TIL and PBL of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer* 1998;77:7–12.
 28. Sela U, Mauermann N, Hershkoviz R, Zinger H, Dayan M, Cahalon L, et al. The inhibition of autoreactive T cell functions by a peptide based on the CDR1 of an anti-DNA autoantibody is via TGF-beta-mediated suppression of LFA-1 and CD44 expression and function. *J Immunol* 2005;175:7255–63.
 29. Schlickum S, Sennefelder H, Friedrich M, Harms G, Lohse MJ, Kilshaw P, et al. Integrin alpha E(CD103)beta 7 influences cellular shape and motility in a ligand-dependent fashion. *Blood* 2008;112:619–25.
 30. Zhang Q, Yu N, Lee C. Mysteries of TGF-beta Paradox in Benign and Malignant Cells. *Front Oncol* 2014;4:94.
 31. Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 2006;25:455–71.
 32. Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* 2006;25:441–54.
 33. Thomas DA, Massague J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 2005;8:369–80.
 34. Gebhardt T, Mackay LK. Local immunity by tissue-resident CD8(+) memory T cells. *Front Immunol* 2012;3:340.
 35. Sela U, Hershkoviz R, Cahalon L, Lider O, Mozes E. Down-regulation of stromal cell-derived factor-1alpha-induced T cell chemotaxis by a peptide based on the complementarity-determining region 1 of an anti-DNA autoantibody via up-regulation of TGF-beta secretion. *J Immunol* 2005;174:302–9.
 36. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113:685–700.
 37. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* 2009;19:128–39.
 38. Vi L, Boo S, Sayedyahosseini S, Singh RK, McLean S, Di Guglielmo GM, et al. Modulation of type II TGF-beta receptor degradation by integrin-linked kinase. *J Invest Dermatol* 2015;135:885–94.
 39. Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, et al. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 1996;379:91–6.
 40. Honda S, Shirohani-Ikejima H, Tadokoro S, Maeda Y, Kinoshita T, Tomiyama Y, et al. Integrin-linked kinase associated with integrin activation. *Blood* 2009;113:5304–13.
 41. Qian Y, Zhong X, Flynn DC, Zheng JZ, Qiao M, Wu C, et al. ILK mediates actin filament rearrangements and cell migration and invasion through PI3K/Akt/Rac1 signaling. *Oncogene* 2005;24:3154–65.
 42. Legate KR, Montanez E, Kudlacek O, Fassler R. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:20–31.
 43. Grashoff C, Aszodi A, Sakai T, Hunziker EB, Fassler R. Integrin-linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation. *EMBO Rep* 2003;4:432–8.
 44. Stevens JM, Jordan PA, Sage T, Gibbins JM. The regulation of integrin-linked kinase in human platelets: evidence for involvement in the regulation of integrin alpha 2 beta 1. *J Thromb Haemost* 2004;2:1443–52.
 45. Zhang M, March ME, Lane WS, Long EO. A signaling network stimulated by beta2 integrin promotes the polarization of lytic granules in cytotoxic cells. *Sci Signal* 2014;7:ra96.
 46. Kutlesa S, Wessels JT, Speiser A, Steiert I, Muller CA, Klein G. E-cadherin-mediated interactions of thymic epithelial cells with CD103+ thymocytes lead to enhanced thymocyte cell proliferation. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 23):4505–15.

Titre : Étude de la signalisation de l'intégrine $\alpha_E(\text{CD103})\beta_7$ dans les lymphocytes T cytotoxiques anti-tumoraux

Mots clés : Intégrine CD103, paxilline, lymphocyte T cytotoxique anti tumoraux, signalisation

Résumé : L'étude de l'intégrine $\alpha_E(\text{CD103})\beta_7$, exprimée à la surface des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et ayant pour ligand la E-cadhérine, marqueur des cellules épithéliales, a permis de démontrer son rôle dans le recrutement des CTL dans la tumeur, la formation de la synapse immunologique et l'induction de la mort des cellules tumorales épithéliales par les CTL spécifiques. Dans ce contexte, nous avons étudié la signalisation de CD103, et ainsi démontré que la paxilline, une protéine des points d'adhésion focaux, interagit avec CD103. De plus, son inhibition diminue les capacités d'adhésion et d'étalement des CTL sur un tapis d'E-cadhérine recombinante humaine. Nous avons ensuite identifié le domaine cytoplasmique de CD103 nécessaire à son activation. Une protéine de fusion CD103-GFP a été construite, ainsi que plusieurs mutants du domaine cytoplasmique de CD103. Nous avons identifié le motif ESIRKAQL, nécessaire à l'activation des lymphocytes T. La sérine en position 1163, présente dans ce motif, semble indispensable à la relocalisation de CD103, des lysosomes et de la paxilline, à la zone de contact avec la E-cadhérine.

Title : Integrin $\alpha_E(\text{CD103})\beta_7$ signaling and role in the functional activities of antitumor cytotoxic T lymphocytes

Keywords : CD103 integrin, paxillin, antitumor cytotoxic T lymphocytes, signaling

Abstract : The $\alpha_E(\text{CD103})\beta_7$ integrin plays a crucial role in the formation of a functional immune synapse (IS) between T cells and epithelial target cells. Indeed, the interaction of CD103 on tumor-infiltrating T lymphocyte (TIL) with its ligand, the epithelial cell marker E-cadherin on tumor cells, promotes tumor cell killing. We studied CD103 signaling, and we showed that paxillin, a protein found in focal adhesion, interacts with CD103, and its inhibition leads to a decrease in T cell adhesion and spreading of T cell upon activation with immobilized recombinant E-cadherin-Fc. Secondly, we investigated CD103 cytoplasmic domains involved in its activation. Therefore, we used wild-type (WT)-CD103-GFP or various mutant CD103-GFP fusion proteins. Our results showed that ESIRKAQL intracellular motif is necessary for T cell activation, and in particular the serine in position 1163 that is essential for CD103 clustering and paxillin recruitment.