



HAL
open science

Améliorer les effets anti-tumoraux des lymphocytes T folliculaires helper (Tfh) en ciblant la communication intercellulaire entre Tfh et Th2.

Romain Mary

► **To cite this version:**

Romain Mary. Améliorer les effets anti-tumoraux des lymphocytes T folliculaires helper (Tfh) en ciblant la communication intercellulaire entre Tfh et Th2.. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Bourgogne Franche-Comté, 2019. Français. NNT : 2019UBFCI009 . tel-02392441

HAL Id: tel-02392441

<https://theses.hal.science/tel-02392441>

Submitted on 4 Dec 2019

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

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

Thèse

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne Franche-Comté

Discipline : Sciences Vie

Spécialités : Immunologie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Soutenance publique

Le Mercredi 9 Octobre 2019

Par

Romain MARY

Améliorer les effets anti-tumoraux des lymphocytes T folliculaires helper (Tfh) en ciblant la communication intercellulaire entre Tfh et Th2

Directeur de Thèse

Pr François GHIRINGHELLI

Membres du jury :

Pr. Karin TARTE

Dr. Nicolas FAZILLEAU

Pr. Maha AYYOUB

Dr. Nathalie BENDRISS-VERMARE

Dr. Frédérique VEGAN

Pr. François GHIRINGHELLI

Rapportrice

Rapporteur

Examinatrice et **Présidente du jury**

Examinatrice

Co-encadrant de thèse

Directeur de thèse

« Je me presse de rire de tout, de peur d'être obligé d'en pleurer »

Beaumarchais (1732/1799).

Ecrivain, dramaturge, musicien et homme d'affaire français.

« La connerie, c'est la décontraction de l'intelligence ! »

Serge Gainsbourg (1928/1991).

Auteur-compositeur-interprète, poète, pianiste, artiste peintre, scénariste, metteur en scène, écrivain, acteur et cinéaste français.

« Prenez tout très au sérieux, à l'exception de vous-mêmes. »

Rudyard Kipling (1865/1936).

Ecrivain britannique.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail de thèse. Je remercie tout particulièrement le Pr. Karin TARTE et le Dr. Nicolas FAZILLEAU du temps et de l'intérêt qu'ils ont consacré à l'examen et l'évaluation de ce manuscrit en leur qualité de rapporteur. Je souhaite également remercier le Pr. Maha AYYOUB et le Dr. Nathalie BENDRISS-VERMARE d'avoir eu la gentillesse d'accepter d'examiner mon travail de thèse.

Pour continuer dans cette longue liste, je désire tout particulièrement adresser mes remerciements au Pr. François GHIRINGHELLI pour m'avoir accueilli dès mes premiers pas dans le monde de la recherche. Cela remonte maintenant à l'été 2013. Merci pour ta confiance et de m'avoir donné la chance d'intégrer ton équipe.

Je tiens ensuite à remercier chaleureusement le Dr. Romain Boidot, qui a été le premier à me voir atterrir à la paillasse d'un laboratoire (été 2012) et à jouer le rôle de relais entre la théorie des bancs de la fac et la réalité du métier de chercheur. C'est cette toute première expérience qui m'a donné envie de continuer dans cette voie ! Je te remercie pour cela, pour ta gentillesse et d'avoir également joué l'entremetteur avec l'équipe de François dans laquelle j'ai évolué jusqu'à aujourd'hui. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta carrière, au CGFL ou ailleurs.

Je souhaite bien entendu remercier tout particulièrement le Dr. Frédérique VEGRAN pour m'avoir pris sous son aile dès mes débuts dans l'équipe de François, alors qu'elle n'était encore que post-doc. Depuis, le chemin a été long et semé d'embûches et malgré un relationnel compliqué à nos débuts, nous avons réussi à trouver une certaine harmonie. Depuis maintenant près de 3 ans nous rigolons plutôt bien au quotidien, notamment durant la fameuse pause-café du matin. « The famous one », l'inévitable, la récurrente, l'indispensable ! Ce moment de communion mi-réunion/mi-rigolade qui permet à tout le monde de monter en selle pour une journée de dur labeur. De t'avoir eu comme maître de stage (x fois) puis comme co-encadrante de thèse m'a énormément apporté. J'ai pu m'enrichir de ton expérience, de ta vision scientifique, de ton intelligence et progresser toujours un peu plus chaque jour. Si j'en suis là aujourd'hui c'est en grande partie grâce à toi et ton implication quotidienne.

Je t'en suis de ce fait profondément reconnaissant. Puisse l'avenir te permettre de voler de tes propres ailes, de former une équipe à toi et de mener à bien tes rêves professionnels les plus fous, les plus audacieux, car tu le mérites. Encore merci d'avoir façonné mon esprit scientifique, de t'être évertuée à corriger mes défauts et de me laisser un bagage solide pour affronter la vraie vie de recherche à venir !

Je ne pourrai pas continuer ces remerciements sans une pensée toute particulière pour toi Hélène. Tu as été, en duo avec Fred, à l'initiative de ma formation scientifique et tout particulièrement à la paillasse. Tu m'as appris les fondamentaux, les manips de bases ! De leur design en passant par le premier pipetage jusqu'à l'analyse des données. Merci à toi pour le temps que tu m'as consacré malgré le rush de ta fin de thèse. Je te remercie également pour ta patience, ta bonne humeur et ces échanges au quotidien. Ça été un réel plaisir d'initier mon parcours scientifique avec toi. Et sache que je transmets également à mon tour aux étudiants de passage certains de tes conseils qui m'ont été précieux. Je souhaite que ton avenir soit radieux et que tu t'épanouisses pleinement dans ton nouveau monde professionnel. Et surtout, fait moi signe pour venir te soutenir le jour de ta soutenance de médecine ! Future MD, la classe et surtout quel courage de repartir sur les bancs de la fac après un PhD ! Respect...

Bon, alors là, je pense que je vais être obligé de raccourcir grandement le paragraphe que je te consacre mon bon bandit tellement il y a de choses à dire, à se remémorer (je vais certainement en oublier beaucoup, tu m'excuseras, mais la substantifique moelle, le concentré de nos moments sera décrit ici) sinon il risque d'y en avoir autant que pour la partie consacrée aux Tfh et leur rôle dans la mise en place des plasmocytes pérennes (première punch line, je sais que tu apprécieras que je t'introduise comme ça...). Comme le disait le bon Serge (Gainsbourg), « Faut savoir s'étendre sans se répandre » ! « Check ça mon esti ! » Tout le monde aura compris que je parle de toi, notre bon maître Antoine, Antoine de la Bernadière, Antoine Bernouillouwar, Antoine le Bourru, Berny la déchausse où l'homme capable de nous faire couler/mousser/fouetter un café (ou canisse selon notre terminologie) aux vertus astringentes à en faire tomber les dents du plus solide d'entre nous. Je pense que la Jouvence de l'abbé Berny® pourra faire fureur en pharmacie ! Je suis désolé mais par écrit il va être difficile de retranscrire notre mode de communication à base de cris

de mouette et/ou de gibbon mais tu comprendras surement tout de suite si je te fais un petit « hiiiiiii » ou « coouute !! coouute ! coouute ! ». Cette complicité qu'on a su créer depuis le M2 et tout au long de notre thèse a été forgée à base d'olives (dont l'olive étalon a été inauguré un jour de déplacement d'incubateur), de dérivés d' « How to basics » (chuuuuuuut), d'expressions québécoises modifiées à notre sauce et d'autres choses dont on taira le nom ici. En pagaille je te dirai bien que cette thèse nous a fait péter un coche, qu'on est plus capable, qu'on est tout encanissé et qu'on se callisserai bien une bonne bière de 6 pieds derrière le museau pour oublier certaines de nos journées. Mise à part tous nos craquages du lundi matin (Allooooo !) au vendredi soir, de te rencontrer a été pour moi une chance inouïe. La plupart des gens diront que tu es réservé, distant, peu loquace et silencieux tel le bédouin sur sa dune de sable admirant le crépuscule vermeille d'une chaude journée d'été, mais c'est qu'ils ne te connaissent pas. Quand on prend un minimum de temps pour s'intéresser à toi, on s'aperçoit très vite qu'il n'en est rien de tout ça. Tu es tellement cultivé, érudit, débrouillard, baroudeur, passionné par tant de choses qu'on ne peut qu'apprendre à ton contact (un puits sans fond). Je dirai aussi que tu es « chaud, doux, tu sens le café, le savon de Marseille » (au passage, il faut qu'on se la fasse cette soirée « Calmos ! »). Tu as été pour moi une grande source d'inspiration et ta vision de la vie m'a ouvert les yeux sur pas mal de choses et m'a fait grandir. On partage ces moments depuis le jour où je suis venu te demander une playlist de rock. Encore un thème qui, avec le rugby, nous a rapprochés. Que ce soit par l'écoute, en passant par la découverte d'artistes (en concert souvent) et de styles variés jusqu'à tes premiers précieux conseils de matos de musicien pour moi le néophyte. Grâce à toi je me suis ouvert au monde de la musique (jusqu'à l'orée du métal avec le stoner) qui a d'ailleurs été assez important pour couper, m'évader et penser à autres choses dans les mauvaises passes de la thèse (et elles furent nombreuses). Je finirai par te faire écouter du Blues en masse mon esti, je m'en fais une mission personnelle ! Tu dois te dire que j'en écris une rafale de 6 pieds mais si tu savais ce qu'il y aurait encore à dire à ton sujet. Avant de laisser la place aux autres qui sont, j'en suis sûr, en train de piétiner d'impatience, je dirai que si (toutefois) à un moment de notre vie il existe des hommes ou des femmes qui nous font grandir et que l'on considère comme modèle, tu fais bien évidemment parti de ceux-ci pour moi ! Puisse l'avenir pérenniser cette amitié de tabarnak, et qu'on se retrouve outre-Atlantique pour se câliser quelques poutines en

ciboire, arrosées de bonnes bières (IPA de préférence) ! Et surtout, surtout, ne change rien de qui tu es ! Pour finir, je voudrais faire don à l'humanité de tes croquis d'artiste :



A ton tour le gars Théo ! Je me souviens encore de cette première soirée, pierre fondatrice de notre relation, à base de « sapristi sauuuucisse !!! ». Pauvre Julien à y repenser... Mais il nous a permis de nous rapprocher et de créer la relation que l'on a à présent. A l'instar de Berny, tu m'as également beaucoup apporté dans pleins de domaines divers et variés. Un en particulier, et non des moindres, qui fait que nous sommes tous réunis autour d'une paillasse chaque jour, la science. Ta vision de la science, ta rigueur, ta religion de la méthode scientifique et ton implication dans les causes perdues d'avance, telle que l'évangélisation des masses contre les anti-vax, les pro-homéopathie et autres pseudosciences, font de toi un homme respectable et à prendre en exemple ! Depuis ton arrivée dans l'équipe tu as su apporter une dynamique nouvelle et insuffler un vent de sens critique à nos échanges scientifiques quotidiens. Je porte une profonde admiration pour la personne que tu es et que tu es en passe de devenir tellement ton potentiel est grand. Je porte également une grande affection pour toi du fait de ta gentillesse et ton altruisme quotidien. Comme le barbu évoqué précédemment, on partage également une passion pour la musique (jouée et écoutée). Malgré ton statut de bassiste qui, selon les lois, m'interdit de te porter autant d'attention, je fais fi des règles instaurées par l'oligarchie du disque et te consacre un petit paragraphe. Concernant ce monde, tu m'as également beaucoup apporté de par tes connaissances et ton expérience. Ce sont des personnes comme toi qui nous enrichissent chaque jour. Tout comme Antoine, j'espère que notre amitié continuera encore malgré la distance future qui nous séparera et que l'on sera toujours heureux de partager tous ces moments aussi bien ludiques autour d'un plateau de jeu et d'une bonne playlist (« wine and cheese ») que sérieux autour d'une paillasse ou de problèmes scientifiques à résoudre. Je suis

certaines que ton avenir sera radieux et qu'il fera de toi le grand scientifique encore bourgeonnant que tu es ! Ciao l'artiste !

Mon dieu ! Mais qu'est-ce à dire que ceci ? Interprète !! Cuillère !! Christophe, le roi Hibos (ou rooibos pour les amateurs de thé) apprécie les fruits au sirop. Là encore il y aurait tant à dire du phénomène que tu es ! Salsifis ! Guerre ! Comme on le dit souvent, si tu n'existais pas il faudrait t'inventer, mais il faudrait surtout s'y mettre à plusieurs tellement tu serais complexe à assembler ! L'instigateur du « Maître » en sus de chaque prénom et le pourfendeur du vouvoiement intempestif, vous avez été une bouffée de fraîcheur et de nouveauté pour toute l'équipe. Votre sens aigu du détail, du mot juste et de la belle citation au moment opportun (Brochant est au courant !!) font de vous un personnage incontournable de notre équipe. Et oui, il faudra vous y faire, bientôt thésard, vous ferrez donc partie à temps plein de notre équipe ! Puisse votre fougue, votre passion pour la science et la ferveur que vous mettez à comprendre l'incompréhensible vous faire voguer avec adresse, souplesse et virtuosité sur les flots tumultueux de vos futurs travaux de recherches. Ça sera fastidieux ! « *Vitoria mundis et mundis lacrima* » Bon, ça ne veut absolument rien dire, mais je trouve que c'est assez dans le ton. Aah nos soirées Amaretto/Kaamelott vont me manquer ! « Ce p'tit goût sucré !! ». J'en garderai toutefois un souvenir mémorable. Tu connais aussi bien chaque réplique de chaque scène que les cours, les théorèmes et les principes scientifiques fondamentaux que tu affectionnes tant. Comme tu le dis-toi-même, tu es une éponge de savoir ! A tes côtés, bien que brefs compte tenu de ton arrivée tardive, j'ai pu m'enrichir de tellement de choses mon bon Hibos. Littérature, chanson française, débats scientifiques autour de questions du quotidien au labo et bien entendu citations en tout genre. D'ailleurs, « *Nove sed non nova* : la manière est nouvelle, mais non la matière. Citation que je n'ai jamais pu replacer correctement dans une conversation » comme dirai notre bon roi. Je te l'offre ici ! Et aller, une dernière pour la route : « *Timeo libri rex agitur*. Ça ne veut rien dire, mais c'est ce que j'ai trouvé de plus... aigre ». Pour l'avenir je te souhaite réussite et courage. Tu le mérites amplement ! Et n'aie crainte, ton côté pantouflard fait de toi une personne atypique ! Et on aime quand ça pique ! Ne change rien ! Tu sortiras grandi de cette expérience ! Et pour finir, je te prierai de me faire l'honneur de vous adouber de ces quelques titres de noblesse : Maître Hibos, roi de la pantoufle charentaise, de la robe de chambre et

de la pipe au coin du feu, duc de l'oisiveté, défenseur du fauteuil moelleux et de la fraise melba. N'y voyez aucune malice. « Hahaha.....Biographie » !!

Normalement je devrais commencer ce paragraphe par mettre une playlist « de chansons pour... » (je pense que tu auras la fin de cette citation chère Fanny), afin de se rappeler ces longues journées de dissociation de tumeurs et autres marquages de cyto. Un peu dur de coucher ça sur le papier mais je pense que tu te la feras toute seule dans la tête (à base de tic, tic, tic absolument...pas en rythme). On en a passé des heures derrière nos tubes de GentleMax et autres bacs à glace que tu chérissais tant et que tu aimais me voir préparer. Je suis sûr que mon « organisation », comme tu dis, va te manquer. Ce qui va me manquer pour ma part c'est de ne plus travailler à tes côtés. A ton contact j'ai énormément appris, surtout en méthodologie, en amélioration de design de manips et en IV rétro-orbitales bien entendu ! Je crois que sans prétention j'ai dépassé le maître et je te remercie grandement de m'avoir initié à cette technique comme à tant d'autres choses et astuces utiles au quotidien ! On apprend énormément au contact des « anciens » ! Je sais que tu vas vouloir me pincer en lisant ça, ponctué d'un « non mais oh !! ». D'ailleurs j'ai toujours une cicatrice !! Ouais, tu sais de quoi je parle ! Ça va je ne t'en veux pas ! Je t'emmènerai en quelque sorte avec moi dans mon prochain post-doc ou autre. Je pourrai te demander ton avis lorsque j'aurai un doute sur quelque chose ! Merci pour tous ces super moments de complicité, de rigolade et surtout de soutien dans mon projet. Car sans toi, je ne pense pas que je serais arrivé au bout de l'histoire ! Merci encore pour tout Miss Chalmin et puisse l'avenir t'apporter un beau chouchou n°2. Je suis certain qu'on gardera contact et je suivrai avec attention ton ascension dans les hautes sphères de la recherche ! Ton investissement quotidien mérite bien une récompense de cette ampleur !

Mel, que dire de toi ?...Si tu le permets, je t'invite à en parler autour d'une bonne « rince cochon » bien chaude et j'insiste sur la température ! Je me souviens encore de nos premiers échanges au labo. Moi encore jeune stagiaire et frêle, je suis venu te demander des précisions sur ton projet de thèse. Et je crois qu'à cette époque ce fut... notre seul échange. Et dire que depuis on en a fait du chemin. Depuis ton retour de post-doc Amstellodamois (j'espère que j'ai bon car connaissant ton sens aigu de la précision, je ne voudrai pas que ça se finisse en pied-nuque à cause d'une petite

faute de frappe) on a pu débattre en long en large et en travers de divers sujets très prenants. Tu as brisé la glace à coup d'olives, comme quoi ce doit être une tradition séculaire dans cette équipe ! A partir de là tout était possible ! Mais tu as surtout su nous apporter ton regard critique et ton expérience sur beaucoup de nos projets, ce qui fut très enrichissant. Très enrichissant pour moi car j'en ressors grandit scientifiquement mais également en terme de confiance en moi. Ton leadership naturel fera de toi, j'en suis persuadé, une chef d'équipe brillante et reconnue. Ne désespère pas pour le concours, ton heure viendra, c'est certain. Tu sortiras grandie de cette première expérience et tu casseras la baraque lors de la prochaine session. Tout comme pour Fanny, je suivrai avec attention ton évolution de carrière qui a tout le potentiel d'être brillante. Ça été pour moi une chance incommensurable de passer mes dernières années de thèses à tes côtés. J'espère que l'avenir nous permettra de conserver cette complicité. Je te remercie encore grandement pour ta disponibilité, ton écoute et ta jovialité quotidienne. Ce qu'il faudra retenir de notre relation sera sûrement ponctué par des « oui...mais... » qui venaient cristalliser tous nos débats quotidiens (plus ou moins objectifs et/ou empreints de bonne foi). Encore merci à toi pour tout ce que tu m'as transmis. Ce fut un réel bonheur de travailler à tes côtés !

A toi « Chri-Chri d'amour » ! Notre chère Christel, qui sans elle le labo ne tournerait plus, voire grandement au ralenti ! Tel Atlas qui soutient la voûte céleste, tu as su par ton acharnement au travail, ta jovialité et ta franchise, te rendre indispensable à notre équipe. C'est bien connu, toute guerre menée sans une logistique millimétrée est vouée à l'échec. Tu as été pour nous cet apport indispensable au bon fonctionnement de nos projets. Je pense que je réussirai à confédérer l'intégralité de l'équipe en disant que sans toi nous aurions été dans la semoule ! L'annonce de ton départ nous a emplit de tristesse mais on sait que c'est pour commencer une nouvelle vie qui a le potentiel d'être radieuse. C'est pourquoi je me joins à tout le monde pour te souhaiter une merveilleuse aventure chez les Cow-Boys et si d'aventure tu reviens dans la mère patrie, n'oublie pas quelques souvenirs. Je te donne quelques idées : cravate bolo, chapeaux, santiags, cornes de buffle, etc.

Oooh coquin de sort ! Là je m'attaque à du lourd. Valou, mon bon Valou. Pionnier sous l'œil de l'éternel dans notre grande famille, que dis-je, dans notre vaste oliveraie. Notre Dr. Puget que l'international nous envie. A en croire les remerciements que

j'adresse jusque-là, un dénominateur commun ressort du lot. Je pense que tu auras tout de suite vu de quoi je parle. Mis à part ces digressions oliveresques, je garde de toi et de nos échanges d'excellents souvenirs sommes toute très enrichissant. Toi qui comme tant d'autres a su nous transmettre ton expérience, notamment en histologie et autres marquages. Ta ferveur dans tes explications trahissait la passion que tu donnes à transmettre ton savoir et t'assurer que ton interlocuteur ou ton auditoire ait assimilé toutes tes explications. Merci à toi pour ta gentillesse et ton dévouement. Merci pour ces heures passées à m'initier aux marquages histologiques. J'en ressors grandit !

Merci à toi aussi Emeric qui, dans la même passion et bienveillance, tu as su me transmettre ton savoir de cytométriste en herbe, ta méthodologie et m'as permis de dompter la bête (je parle du cytomètre bien entendu). Tu as éclairci beaucoup de problèmes et m'a aidé à désacraliser la discipline. Merci également à toi pour tous les échanges que l'on a eus, professionnels comme pas du tout. Je te souhaite le meilleur pour la suite, telle qu'une évolution de carrière fulgurante ! En attendant, bon vent à la PT(BC).

En parlant de PTBC, j'ai une pensée toute particulière pour toi Corentin ou plutôt Coco comme il est de coutume de t'intituler. Bah oui, sinon on ne comprend pas de qui on parle... Malgré la distance qui sépare nos deux bureaux, cela a toujours été un plaisir de travailler avec toi ! Tu as réussi à me réconcilier un petit peu avec les maths et m'as été d'une aide inestimable dans les analyses NGS de mon projet. J'emporte avec moi tous ces bons conseils ! Sans toi je pense que j'y serai encore... Outre nos échanges, majoritairement scientifiques dans un premier temps, nous avons réussi à rapidement sympathiser. Je suis content de te compter parmi ces collègues vraiment sympathiques et bienveillants. Toutefois je suis un peu jaloux d'une chose...tu pars au Québec pour ton premier post-doc... Je suis sympa, je vais quand même te souhaite bonne chance. J'espère que tu t'y pliras et que cette nouvelle expérience sera très enrichissante pour toi. Et dans les coups durs, s'il y en a, une bonne poutine et ça repart ! En tout cas j'espère te revoir rapidement et que tu partages avec nous cette aventure (sauf s'y on s'y retrouve...qui sait...). A l'heure où je t'écris (15h08 en l'occurrence mais bon, détail inutile) il te reste moins d'un mois avant la douloureuse ! Après ça tu passeras dans le monde des PhD ! Je te souhaite bon courage pour le jour J mais je ne m'inquiète pas trop, tu vas gérer !

Pour la prochaine personne que je souhaite remercier, j'ai longuement réfléchi à comment l'introduire. Au final, faisons simple. Merci à toi Pierre ou plutôt « Pierrot l'asticot », « Maître macrophage » voire plus inattendu « Maître gnocchi ». Surnom que tu dois à ce régime alimentaire à base de gnocchi ! Tu auras émerveillé nos papilles et nos récepteurs olfactifs chaque midi. Je ne peux pas parler de toi sans me remémorer nos soirées où l'on découvre un tout nouveau Pierre. A l'instar du Dr. Jekyll et de Mr. Hyde, on peut sans conteste t'attribuer le titre de Dr. Pierrot et Mr. Asticot. Tantôt calme et discret au labo, tu passes du côté obscur dès que tu t'assieds à une table de bar. Moulin à paroles que l'on ne peut plus arrêter, tu nous as fait partager tes connaissances et tu nous as laissés entrer dans ton monde ! J'ai appris à découvrir un tout autre Pierre que j'avais pourtant l'habitude de côtoyer au labo. Les échanges que j'ai pu avoir avec toi ont été passionnants et pour moi, tu fais partie de ces gens avec une culture incroyable ! Ne change absolument rien. Tu es, je le pense, une force de la nature ! Ou, i un super-héro des bars, l'homme au 2 foies dont 1 en houblon. L'homme qui donne des sueurs froides aux plus solides des tenanciers, le finisseur de fûts et tout ça épongé de bouchées au camembert ! Impossible à suivre ! Enfin, je garderai en mémoire cette fameuse punch-line « La baaaasse !!! La baaaasse !!! », souvenir d'un concert où tu as réinventé la pratique du headbang avec ta variante « pipeline headbang ». Je te souhaite, à toi aussi, un avenir radieux, en commençant notamment par un premier post-doc qui sera, j'en suis sûr, une superbe expérience ! J'espère surtout que l'on gardera contact et que l'on pourra, à l'avenir, nous remémorer autour d'un (voire plus) verre de whisky tourbé tous ces souvenirs de thésards.

Je souhaite également remercier l'intégralité des membres présents comme passés de mon équipe (CADIR) et ceux qui sont venus grossir les rangs de la PTBC ainsi que ceux de l'équipe de Lionel Apetoh (Elise (Hello Beauty !!), Ludivine, Isis, Tiffif et Andréa) pour leur aide et leur jovialité quotidienne. Lionel, que je remercie ici personnellement pour les divers échanges très enrichissants que nous avons eus au cours de ces 5-6 dernières années. Je te souhaite le meilleur, que ce soit sur un plan personnel comme professionnel avec ta toute jeune équipe de recherche. J'espère que les projets seront nombreux et aboutiront à des découvertes indispensables à notre domaine. J'ai également une pensée toute particulière pour Lucie, notre chère cantatrice qui aura ravie mes oreilles de sa voix suave et délicate tout au long de tes trois années de

thèse. Je pense également à Flavie, à qui je mets un « pouce dans les airs » ! Je sais que tu attendais avec impatience cette citation ! Te voilà comblée j'en suis certain. Pour le fun je te redonne un « pouce dans les airs » bonus ! Je n'oublie pas notre technicienne à toutes épreuves : Joséphine, ou José, ou Jo', ou Josy voire même Jjjjjj... Le couteau suisse de l'équipe, prête à rendre service sans rechigner. Merci à toi pour ton aide précieuse, qui m'a soulagé notamment vers la fin de mon projet. Je pense également à toi Virginie et à nos longues discussions qui, partant d'une simple question sur la disponibilité d'un réactif par exemple, finissait 1h plus tard à parler de plongée sous-marine...la matrice a dû bugger en cours de route je pense. Mais ce fut toujours avec un réel plaisir ! Je ne peux bien entendu pas oublier nos chers stagiaires tels que Marine, alias « la p'tite nerveuse » et ton accent soooo british, surtout quand tu proposes à une certaine personne (que tu reconnaitras aisément), d'aller voir ailleurs s'il n'est pas content. « Master Piece » ever ! Il y a également Marion ou Marion Maréchal Etiennot, (je sais que tu apprécieras cette douce attention) à qui je souhaite bon vent dans le monde des ILC1 et tous mes vœux de réussite pour tes aventures professionnelles futures. Je pense également à Akhésa alias Zaza ou Zazouille la fripouille pour les plus intimes, que j'ai encadrée le temps d'un été. Je me souviens de cette question récurrente que tu avais coutume de me sortir : « mais pourquoi ? » et qui initiait de longues discussions. Ne change rien et garde cette curiosité qui te caractérise tant. Te concernant je finirai par ce souvenir d'une nuit d'été où j'ai joué l'entremetteur subtile (oui c'est le mot). Je te souhaite tous mes vœux de bonheur avec ce bon gars Théo. Je me remémore également « l'amusant stagiaire » Clément. Je te laisse le soin d'utiliser ton plus bel accent « Boratien » pour lire à haute voix la ligne précédente. Ce fut sans conteste un vrai plaisir de partager ces quelques moments avec toi. Enfin quelqu'un qui connaît les répliques de Borat ! Merci à toi ! Et je te souhaite bon courage pour tes études de médecine qui s'annoncent longues. Soit bon ! Je ne peux pas continuer si je ne te remercie pas Julie, notre dame Niogret, notre rugby-woman, bras droit de Fanny qui ne rechigne jamais à la tâche. Tu nous auras ravis au quotidien de tes interventions furtives et subtiles mais qui ont toujours permis de sublimer les discussions. Je te souhaite toute la réussite que tu mérites et la reconnaissance de tes pairs. Je n'oublie pas Baptiste et Etienne, futurs M2, qui viendront de nouveaux grossir les rangs des stagiaires de notre équipe. Je vous souhaite bon courage et vous connaissant maintenant un peu mieux, je suis certain que l'issue de cette première grosse expérience à temps plein dans le monde de la

recherche sera la première étape vers une belle carrière scientifique. Je finirai cette petite liste par la dernière à nous avoir quitté. Je parle bien évidemment de notre sacrée Pauline, Paulette ou Popo l'asticot. Tu garderas une trace indélébile, jusqu'à ton dernier souffle, de ton passage à Dijon et de ce stage de M2 parmi nous. Si tu voulais rester plus longtemps, il fallait le dire, pas besoin de te briser l'épaule. En tout cas tu t'en es sortie avec courage, c'est ce qu'il faut retenir ! Je te souhaite toute la réussite que tu mérites dans ta nouvelle vie parisienne. J'espère que cette nouvelle expérience te conviendra comme un gant.

J'ai également une pensée pour l'ensemble des « bandits » des autres équipes, que j'ai pu côtoyer au cours de mes quelques années à hanter les couloirs et labo du troisième étage. Je pense tout particulièrement à l'armada qui compose l'équipe de Carmen Garrido, à savoir, Burhan, notre « Bouliche » à la voix portante mais qui trouve toujours des difficultés à se tailler la barbe sans faire de trous... faudra vraiment que je te fasse un cours mon p'tit Bubu. Killian, président fondateur et toujours en activité de la team du fiacre, que j'attends toujours pour un buff blues en mi 7... Baptiste, *alias* « le Baps' », seul survivant de la guilde « du cercle de l'amitié » comprenant également le bon Ossama et de ce sacré Simon, fervents défenseurs des valeurs Kaamelottiennes. Vous êtes également passés par le labo et j'en garde de merveilleux souvenirs. Longue vie (Baptiste ne me contredira pas) à vous dans le monde du corps enseignant (un sens subliminal se cache dans cette dernière phrase. Votre esprit sain saura la décoder). Je pense aussi à Christophe, maître Boudesco avec qui j'ai passé de superbes moments. Mais également à François dit « Franscesquiño », Gaëtan, membre actif de la team du fiacre, Marine *alias* « Eric » ou « 'rico » selon les envies, Steven, l'amateur de Rhum et l'instigateur du « salut, salut », Pierre-Marie, le camarade de galère de master, Lucile, que je remercie pour sa gentillesse quotidienne et ces bons moments à papoter de milles et une choses. J'ai également une pensée pour les membres de l'équipe EPHE, que je croise au quotidien. La team cytométrie dirigée par Anabelle, avec notre Serge international (Seeergee !! Au s'coooooours !!), protecteur du trieur et ajusteur aguerris de flux pour éviter que « ça clogged », notre bon Nicolas qui occupe une place de plus en plus indispensable parmi la plateforme ainsi que la regrettée Arlette qui restera la mascotte incontestée de cette équipe et avec qui on parle bonne ripaille, de bons vins et de voyages aux quatre coins du monde. Je pense que plus aucuns lieux ne te seront inconnus dans quelques années

et qu'il te faudra une nouvelle planète à explorer. Je te conseille de réserver ton billet pour Mars dès à présent !

Il est fort probable que j'en oublie certains/certaines et j'en suis désolé, ma mémoire n'est pas infallible et loin de là. J'ai essayé, du mieux possible, de consacrer un petit mot à chacun d'entre vous. C'est la moindre des choses. Mais, que vous êtes nombreux ! J'ai eu la chance de partager toutes ces années avec une multitude de belles personnes, de personnalités et d'avoir, j'en suis sûr, initié des relations d'amitié avec nombre d'entre vous. J'espère que l'avenir permettra de les pérenniser.

Enfin, (le meilleur pour la fin), je souhaite remercier ma famille, avec tout d'abord une tendre pensée pour mes deux grands-mères qui ont fait partie des premières à prendre soin de moi avec patience et affection. Bien entendu je pense également au brother, Benjamin dit « Ben » voire « zobi » ou même le combo « Ben-zobi » à qui je « picore » un p'tit coup comme il est de coutume entre nous ! Puisse la suite de tes études et tes expériences sportives comme extra-sportives te porter vers une belle carrière de préparateur physique ! Puisse également l'avenir nous permettre de garder cette complicité. « We are the chesgunt » ensemble. Je souhaite ensuite remercier tout particulièrement mes parents, qui ont toujours été là pour me soutenir dans mes choix et m'épauler dans les moments difficiles. Je vous remercie de toujours être là quand j'en ai besoin, de me remonter le moral dans les mauvaises passes et me permettre de relativiser. Votre expérience de la vie est telle qu'il est toujours possible de trouver une solution aux problèmes et que peu-importe l'issue des situations, on arrivera toujours à s'en sortir. Il faut voir le bon côté des choses. Toute expérience est bonne à prendre. Vous avez également su m'inculquer depuis tout petit l'ordre et la discipline qui, sans quoi, je ne serai pas là où je suis à l'heure actuellement. De votre passé de sportifs et grâce à votre âme de compétiteurs (toujours active), vous m'avez transmis cette soif d'aller au bout de ce que j'entreprends, de faire fi des difficultés, même si l'envie de tout laisser tomber se fait ressentir par moment. Ce manuscrit et ce travail en sont le point d'orgue. Vous vous êtes de plus toujours efforcés de nous élever, avec Ben, sur un pied d'égalité malgré notre différence d'âge. Je pense que cela nous a permis d'avoir et d'entretenir cette relation saine que nous avons aujourd'hui et je vous en serai toujours reconnaissant. Il est toutefois difficile de résumer notre vie quotidienne, ses hauts et ses bas. Les mots

peuvent venir à manquer. La seule solution est de continuer à la vivre, d'en profiter, notamment à travers les nouveaux horizons qui semblent se dessiner pour nous et de se serrer les coudes nous l'avons toujours fait. Le meilleur reste encore à venir !

Pour finir, j'ai une pensée affectueuse et toute particulière pour ma chérie, « la poupée », ma princesse Leïla. Nous partageons le même quotidien de thésard, avec son lot (très grand) de difficultés. De ce côté-là tu n'auras pas été épargnée, mais c'est avec une grande admiration que je te vois t'efforcer au quotidien de te sortir de cette situation. J'essaye du mieux possible de t'apporter conseils et entraide mais sache que peu importe l'issue, je serai toujours derrière toi, présent à t'épauler dans tes choix. Tu es pleine de ressources et peu importe de quoi l'avenir sera fait, je suis certains que tu trouveras quelque chose pour laquelle tu t'épanouiras et je serai là pour partager ces moments avec toi. Bien que l'échéance de ta soutenance ai été un peu repoussée, tu sauras finaliser ton travail du mieux possible et te sortir de cette difficulté, j'en suis persuadé. Ne perds pas espoir, le plus gros du travail est derrière toi. Apporte-lui la meilleure touche finale possible et défends-toi le jour J. Tu n'as pas supporté tout cela pendant plus de 4 ans pour laisser tomber avant la ligne d'arrivée. Tu montreras à tout le monde que, malgré les difficultés, tout est possible avec de la volonté ! Ensuite, nous voguerons ensemble vers d'autres horizons. Puisse cette promesse d'une nouvelle vie à deux te donner la force nécessaire pour achever ton projet. Puisse l'avenir nous permettre de faire grandir et renforcer cette belle relation et tendresse mutuelle que nous avons l'un pour l'autre. Je suis impatient de changer d'air avec toi et de commence une nouvelle vie ! Comme tu le sais j'aime le changement, mais ce qui ne changera jamais c'est l'amour et l'affection que je te porte !

Résumé

Il est maintenant acquis que le système immunitaire occupe une place importante dans l'évolution des cancers (Hanahan *et al.*, 2011). La compréhension actuelle de la réponse immunitaire adaptative en fait une cible de choix dans ce contexte. Il est apparu que les lymphocytes T CD4⁺, acteurs majeurs de la composante adaptative du système immunitaire, présentent des actions distinctes sur le contrôle de la croissance tumorale. Ainsi, les lymphocytes Th2 et Tfh, tous deux activateurs des lymphocytes B dans des conditions de lutte contre des infections pathogéniques, présentent des rôles ambivalents dans un contexte de cancer. En effet, de nombreuses études montrent que la présence de Th2 est corrélée à une progression de la maladie (notamment via l'action de l'IL-4 qu'ils sécrètent) (Koller *et al.*, 2010 ; Roca *et al.*, 2012) alors que les Tfh, seraient plutôt associés à un bon pronostic pour les patients (Gu-Trantien *et al.*, 2013, 2017).

Nos investigations actuelles nous ont permis de mettre en avant une caractéristique nouvelle de la biologie des lymphocytes Tfh. En effet, les Tfh expriment l'Hemathopoietic Prostaglandin D2 synthase (HPGDS). Cette enzyme de la voie de biosynthèse des eicosanoïdes est responsable de la production de Prostaglandine D2 (PGD2). Plusieurs travaux montrent que les cellules Th2 expriment le récepteur CRTH2, spécifique de la PGD2. Cette molécule agit sur ces cellules comme chemoattractant et permet également une augmentation de leur production cytokinique. Ainsi, nous posons l'hypothèse d'une communication potentielle entre lymphocytes Tfh et Th2 via la PGD2. Le projet présenté ici est alors axé sur la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents à cette communication au sein des deux sous-types ainsi que sur son impact dans un contexte de cancer. Ce projet ayant également pour but de mettre en avant la PGD2 comme nouvelle cible thérapeutique dans le cancer.

Mots clés : Tfh, Th2, HPGDS, PGD2, Communication cellulaire, Cancer

Abstract

It is now accepted that the immune system plays a critical role in cancers evolution (Hanahan *et al.*, 2011). In this context, current understanding of the adaptive immune response made it a prime target. T CD4 cells, the main players of the adaptive immune system component, are known to possess distinct roles in the control of tumour growth. Thereby, Th2 and Tfh cells, both known to activate B cells in pathogenic infections, present antagonistic roles in cancer. Indeed, numerous studies demonstrate that Th2 cells are correlated with disease progression (especially via IL-4 secretion) (Koller *et al.*, 2010 ; Roca *et al.*, 2012), whereas Tfh cells are associated with a good prognosis for the patients (Gu-Trantien *et al.*, 2013, 2017) despite the actual limited amount of available data.

Our current researches highlighted a new property of the biology of Tfh cells. We found that Tfh cells are able to express the Hemathopoietic Prostaglandin D2 synthase (HPGDS), an eicosanoid pathway enzyme involved in Prostaglandin D2 (PGD2) production. Moreover, different studies revealed that Th2 cells expressed CRTH2, the specific PGD2 receptor. PGD2 is known as a chemoattractant molecule for Th2 cells and lead to the increase of their cytokine secretion. We hypothesized that Tfh communicate with Th2 cells *via* PGD2 signalling. The present project is focused on the understanding of the underlying molecular and cellular mechanisms involved in this cross-talk and their impact in cancer. The last aim of this work is to favor the development of PGD2 as a new cancer therapeutic target.

Key words: Tfh, Th2, HPGDS, PGD2, Intercellular crosstalk, Cancer

Sommaire

Remerciements.....	5
Résumé/Abstract	18
Liste des Figures	25
Liste des Annexes.....	27
Liste des Abréviations	28
Avant-propos.....	31
Introduction	35
Partie I. La communication : concept général.....	36
1. Qu'est-ce que communiquer ?.....	36
1.1. Généralités.....	36
1.2. Classification	36
2. Le concept de Communication appliqué à la Biologie	37
2.1. Messagers solubles.....	39
2.2. Communication par contact physique	39
3. Communication et Immunologie	41
3.1. Généralités.....	41
3.2. Les messagers de la réponse immune.....	42
3.2.1. <i>Les messagers solubles</i>	43
3.2.2. <i>La synapse immunologique</i>	48
Partie II. Communication cellulaire et cancer	50
1. Le cancer	50
1.1. Epidémiologie du cancer.....	50
1.2. Le cancer : les origines	51

2. Système immunitaire et cancer : un lien étroit	52
2.1. Microenvironnement tumoral : système immunitaire, un acteur clé.....	52
2.1.1. <i>Du concept de l'immunosurveillance à celui d'immunoediting</i>	55
2.1.2. <i>Les trois E du concept d'immunoediting</i>	56
2.2. Acteurs de la réponse immune et cancer.....	59
2.2.1. <i>Cellules de l'immunité innée</i>	60
2.2.1.1. Macrophages.....	60
2.2.1.2. Neutrophiles	62
2.2.1.3. Cellules myéloïdes suppressives (MDSC)	62
2.2.1.4. Mastocytes	63
2.2.1.5. Cellules dendritiques (CD)	63
2.2.1.6. Cellules lymphoïdes innées (ILC)	64
2.2.1.7. Cellules NK.....	65
2.2.2. <i>Cellules de l'immunité adaptative</i>	66
2.2.2.1. Lymphocytes B	67
2.2.2.2. Lymphocytes T CD8 ⁺	70
2.2.2.3. Lymphocytes T CD4 ⁺	71
a. Th1	71
b. Th2	72
c. Th17	74
d. Treg.....	76
e. Th9	76
f. Tfh	77

Partie III. Zoom sur les Tfh et leur place dans le cancer 79

1. Bases moléculaires de la caractérisation des Tfh	80
1.1. Généralités.....	80
1.2. Acteurs moléculaires de la polarisation Tfh	81
1.2.1. <i>Molécules de co-stimulation</i>	81
1.2.1.1. Co-stimulation positive	81
1.2.1.2. Co-stimulation négative	85
1.2.2. <i>Cytokines</i>	86
1.2.2.1. Cytokines supportant la différenciation Tfh	87
1.2.2.2. Cytokines inhibitrices de la différenciation Tfh	89

1.2.3. Facteurs de transcription	90
1.2.3.1. Facteurs de transcription régulant positivement la polarisation Tfh.....	90
1.2.3.2. Facteurs de transcription réprimant la polarisation Tfh	96
2. Paramètres spatio-temporels de la polarisation Tfh	99
2.1. Initiation de la polarisation Tfh : mise en place d'un profil pré-Tfh	99
2.2. Rencontre à l'interface T/B des follicules : de pré-Tfh à Tfh....	100
2.3. Migration des Tfh dans la zone B : formation des centres germinatifs	101
3. Hétérogénéité du profil Tfh	106
4. Fonctions canoniques des Tfh	110
4.1. Profil sécrétoire des Tfh	110
4.1.1. <i>IL-21</i>	111
4.1.2. <i>IFN-α et IL-17</i>	111
4.1.3. <i>IL-4</i>	111
4.2. Rôles physiologiques des Tfh.....	113
5. Physiopathologie des Tfh	118
5.1. Tumeurs d'origine lymphoïde.....	119
5.2. Tumeurs d'origine non lymphoïde	120

Partie IV. Thérapies anti-tumorales : place du système immunitaire 123

1. Prémices des traitements anti-tumoraux.....	123
2. Avancées thérapeutiques anti-cancéreuses : Radiothérapie, Chimiothérapie et Hormonothérapie.....	124
2.1. Radiothérapie	124
2.2. Chimiothérapie.....	124
2.3. Hormonothérapie	126
3. Thérapies ciblées	127
4. Immunothérapie anti-tumorale	127
4.1. Immune-checkpoint : mode d'action.....	129
4.2. Immunothérapie ciblant les immunes checkpoints (monothérapie).....	130
4.3. Combinaisons thérapeutiques.....	133

4.4. Nouvelles stratégies	134
Objectif du projet de Thèse	142
Contexte et Stratégie d'Etude	145
I. Contexte	146
II. Stratégie d'étude	149
1. Les lymphocytes Tfh induisent une accumulation de Th2 dans les tumeurs murines	149
2. Les lymphocytes Tfh produisent de la PGD2.....	149
3. La PGD2 produite par les Tfh présente des effets biologiques sur les Th2	150
4. L'hétérodimère STAT1/STAT3 régule l'expression d' <i>Hpgds</i> au sein des Tfh	150
5. Cibler l'axe PGD2-CRTH2 limite la croissance tumorale	151
6. L'axe PGD2-CRTH2 a également des répercussions dans les tumeurs humaines.....	151
III. Article soumis	152
Matériel et Méthodes	153
Résultats.....	170
1. Les lymphocytes Tfh induisent une accumulation de Th2 dans les tumeurs murines	171
2. Les lymphocytes Tfh produisent de la PGD2.....	175
3. La PGD2 produite par les Tfh présente des effets biologiques sur les Th2	178
4. L'hétérodimère STAT1/STAT3 régule l'expression d' <i>Hpgds</i> au sein des Tfh	182
5. Cibler l'axe PGD2-CRTH2 limite la croissance tumorale	186
6. L'axe PGD2-CRTH2 a également des répercussions dans les tumeurs humaines.....	191

7. Résumé schématique	195
Données Supplémentaires	197
Discussion.....	234
Perspectives.....	239
Références	241
Annexes	282
Annexe 1 : Influence des CAFs du microenvironnement tumoral sur le système immunitaire.....	283
Annexe 2 : Liste exhaustive des immunothérapies anti-CTLA-4 et PD-1/PDL-1 approuvées par la FDA (mise à jour octobre 2018).	287
Annexe 3 : Liste non exhaustive de combinaisons thérapeutiques utilisant des inhibiteurs d'immune checkpoint.....	289
Annexe 4 : Liste exhaustive des thérapies ciblées approuvées par la FDA (29 types de cancers).	293

Liste des Figures

Introduction

Figure 1 : Résumé schématique du concept général de communication. **p. 37**

Figure 2 : Représentation schématique des différents modes de communications intercellulaires à distance et locales. **p. 40**

Figure 3 : Schématisation de la gestion de l'information par le système immunitaire. **p. 42**

Figure 4 : Résumé schématique des différents modes d'interaction des cytokines. **p. 45**

Figure 5 : Représentation schématique du mécanisme de communication cellulaire par chimiotactisme. **p. 46**

Figure 6 : Les trois phases du concept d'immunoediting. **p. 58**

Figure 7 : Représentation schématique du rôle des acteurs de l'immunité Innée et adaptative dans le microenvironnement tumoral. **p. 78**

Figure 8 : Processus de polarisation Tfh. **p. 98**

Figure 9 : Cinétique de développement et d'action des Tfh lors de la mise en place d'une réponse immune humorale. **p. 105**

Figure 10 : Modèles de mise en place des différents profils Tfh et phénotype Tfh retrouvés dans le sang périphérique humain. **p. 109**

Figure 11 : Acquisition séquentielle de la production d'IL-21 et d'IL-4 par les Tfh des CGs (GC Tfh). **p. 116**

Figure 12 : Représentation schématique des de l'implication des Tfh dans diverses pathologies. **p.119**

Figure 13 : Engagement des co-récepteurs immunitaires inhibiteurs et activateurs lors d'interactions impliquant des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) ou des cellules tumorales avec des lymphocytes T au sein du microenvironnement tumoral. **p. 129**

Figure 14 : Chronologie des évènements décisifs du domaine de l'oncologie moderne. **p. 141**

Résultats

Figure 1 : Les lymphocytes Tfh induisent une accumulation de Th2 dans les tumeurs murines. **p. 173**

Figure 2 : Les lymphocytes Tfh produisent de la PGD2. **p. 176**

Figure 3 : La PGD2 produite par les Tfh présente des effets biologiques sur les Th2. **p. 180**

Figure 4 : L'hétérodimère STAT1/STAT3 régule l'expression d'Hpgds au sein des Tfh. **p. 184**

Figure 5 : Cibler l'axe PGD2-CRTH2 limite la croissance tumorale. **p. 189**

Figure 6 : L'axe PGD2-CRTH2 a également des répercussions dans les tumeurs humaines. **p. 193**

Résumé schématique du projet : p. 195

Liste des Annexes

Annexe 1 : Influence des CAFs du microenvironnement tumoral sur le système immunitaire. **p.283**

Annexe 2 : Liste exhaustive des immunothérapies anti-CTLA-4 et PD-1/PDL-1 approuvées par la FDA (mise à jour octobre 2018). **p. 287**

Annexe 3 : Liste non exhaustive de combinaisons thérapeutiques utilisant des inhibiteurs d'immunes checkpoints. **p. 289**

Annexe 4 : Liste exhaustive des thérapies ciblées approuvées par la FDA (29 types de cancers). **p.293**

Liste des Abréviations

ACE : Antigène carcino-embryonnaire	CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4.
AITL : Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma	CXC : Cystein-X-Cystein motif chemokine
Akt : Akt-1 ou protéine kinase B (PKB)	CXCR : Cystein-X-Cystein motif chemokine Receptor
ASCL2 : Achaete-Scute family bHLH transcription factor 2	DNMT3A : DNA [cytosine-5]-methyltransferase 3 alpha
BAFF : B-cell activating factor	DZ : Dark Zone
BCL6 : B-cell Lymphoma 6	EAE : experimental autoimmune encephalomyelitis
BiTE : Bi-specific T-cell engager	EBI2 : Epstein-Barr virus-induced G-protein coupled receptor 2
Blimp-1 : B lymphocyte-induced maturation protein-1	EFNB1 : Ephrin-B1
Bob-1/OBF-1 : B cell Oct binding factor 1/Oct binding factor 1	EGR2 / 3 : Early Growth Response 2 / 3
Breg : Regulatory B cell	EpCAM : Epithelial Cell Adhesion Molecule
BTLA : B and T Lymphocyte Attenuator	EPHB6 : Ephrin type-B receptor 6
CAR T-cell : Chimeric Antigen Receptor T-cell	EPO : Erythropoïétine,
CCL : Cystein-Cystein motif chemokine Ligand	ERG3 : Early Growth Response 3
CCR : Cystein-Cystein motif chemokine Receptor	FAS : Fas cell surface death receptor
CDs/DCs : Cellules Dendritiques/Dendritic cells	FASL : Fas Ligand
CD : Cluster of Differentiation	Fc : Fragment cristallisable
CG/GC : Centre Germinatif/Germinal Centre	FcR : Fc Receptor
c-Maf : proto-oncogene c-Maf	FDC : Follicular Dendritic Cell
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	FOXO1 : Forkhead box protein O1
CNS2 : 3' conserved non coding sequence 2	FOXP1 : Forkhead box P1
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène	FOXP3 : Forkhead box P3
CRTH2 : Chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells	FT : Facteur de transcription
CSF : Colony-stimulating factor	GATA3 : GATA binding protein 3
cTfh : Circulating Tfh cell	GC B : Germinal Center B cell
cTfr : Circulating regulatory T follicular helper cell	GC Tfh : Germinal Center Tfh cell
CTL : Cytotoxic T Lymphocyte	G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor
	GFP : Green Fluorescent Protein
	Gh : Growth hormone
	GITR : Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor-Related Protein
	GITRL : GITR Ligand

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulation Factor)
gp130 : Glycoprotein 130
GPR183 : G Protein-Coupled Receptor 183
HDM : House Dust Mites
HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
HMS : Hypermutation somatique
HS2 : HS2 enhancer
HS5a : HS5a enhancer
HSV-1: Herpes Simplex Virus-1
ICOS : Inducible T-cell COStimulator
ICOS-L : ICOS Ligand
IDO : indoelamine-2,3-dioxygénase
IFN: Interferon,
Ig : Immunoglobulin
IL- : Interleukin
IL-1ra: IL-1 receptor antagonist
ILC : Innate Lymphoid Cell
IL-XR : Interleukine X Receptor
IRF : Interferon Regulatory factors
ITSM : Immuno-Tyrosine Switch Motifs
Kat : Katshka
KLF2 : Kruppel Like Factor 2
LAG-3 : Lymphocyte-activation gene 3
LCMV : chronic Lymphocytic ChorioMeningitis Virus
LEF-1 : Lymphoid Enhancer Binding Factor 1
LIF: Leukaemia inhibiting factor
LTA : LymphoToxin Alpha
LTI : Lymphoid Tissue Inducer
Ly9 : Lymphocyte Antigen 9
LZ: Light Zone
MDSC : Myeloid-Derived Supressor Cells
MMP-9 : Matrix metallopeptidase 9
mTORc1 / 2 : mechanistic Target Of Rapamycin complex 1 / 2
NFAT : Nuclear Factor of Activated T cells
NFκB : Nuclear Factor-kappa B
NK : Natural Killer
NKp46 : NK cell-specific surface molecule of 46 kD (p46)

NKT : Naturak Killer T cell
NOTCH-1/-2 : Neurogenic locus notch homolog protein 1 / 2
NSCLC : Non Small Cell Lung Cancer
Oct1/2 : Octamer-binding transcription factor 1 / 2
OPN-i : ostéopontine
OSM: oncostatine M
OX40 = TNFRSF4: Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4
OX40L: OX40 Ligand
PD-1 : Programmed cell Death 1
PD-L1 :Programmed cell Death Ligand 1
PGD2 : Prostaglandine D2
PGE2 : Prostaglandine E2
PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase
PlxnB2 : Plexine B2 transmembranaire
PPARγ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma
Psgl-1 : P-Selectin Glycoprotein Ligand 1
PTCL NOS : Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified
PU.1 : PUrine-rich DNA sequence (PU-box) binding transcription factor
RCPG : Récepteur Couplé à une Protéine G
RHOA : Ras HOmolog gene family, member A
RORγt : RAR-related Orphan Receptor gamma
S1PR1 : Sphingosine-1-phosphate receptor 1
SAP : SLAM-Associated Protein
SCF: Stem Cell Factor
Sema4C : Semaphorin 4C
SFK : SRC Family Kinase
SHP-1 : Src Homology 2 domain-containing Phosphatase 1)
SIRT1 : Sirtuin 1
SLAM : Signaling Lymphocytic Activation Molecule
SLAMF1 : Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family member 1

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

TAM : Tumor Associated Macrophage

TAN : Tumor Associated Neutrophils

T-bet : T-box transcription factor

TCF-1 : T-Cell Factor 1

TCR : T-Cell Receptor

TET2 : Ten-eleven-translocation 2

Tfh : T follicular helper cell

Tfr : Regulatory Tfh cell

TGF- β : Transforming Growth Factor- β

Th : T helper cell

TIM-3: T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3

TLR : Toll Like Receptor

TLS : Tertiary Lymphoid Structure

TNF: Tumor necrosis factor

TNFR : TNF Receptor

TNFRSF4 = OX40: Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4

TRAIL : Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand

Treg : Lymphocyte T régulateur

TSLP : lymphopoïétine stromale thymique

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VISTA : V-domain Ig Suppressor of T cell Activation

Avant-propos

Avant-propos

Le 30 avril dernier, le Pr Wolf Hervé Fridman établissait le constat suivant: « *Cela fait cinquante ans que je suis dans la discipline [immunologie des cancer] et nous sommes passés par des périodes de traversée du désert extrêmement longues, où, malgré les éléments certes souvent indirects mais convergents - le fait que les cellules du système immunitaire étaient capables de reconnaître leurs propres cellules cancéreuses, que la stimulation du système immunitaire, en tout cas dans des modèles expérimentaux, pouvait induire des régressions tumorales, que les individus qui avaient des déficits immunitaires étaient beaucoup plus enclins à développer des cancers, que des sujets qui avaient eu des transplantations et étaient traités par immunosuppresseurs, développaient souvent des lymphomes - malgré tous ces éléments accumulés pendant des années, la communauté scientifique et médicale était goguenarde voire agressive, rejetant l'idée d'un contrôle des cancers par le système immunitaire !* » (Fridman and Teillaud, 2019).

Il avance ensuite que, l'origine de la scission établie avec les réticences de la communauté scientifique à prendre au sérieux l'impact prépondérant du système immunitaire sur l'évolution des tumeurs, prend sa source dans de nombreuses preuves expérimentales. Il cite notamment trois découvertes majeures à son sens : la reconnaissance spécifique des antigènes tumoraux par les lymphocytes T, le développement du concept d'immunoediting et l'importance de « *l'infiltrat immunitaire, en particulier les lymphocytes T mémoires, [qui] sont le plus fort facteur de prédiction de l'évolution d'un patient cancéreux. Cette démonstration a vraiment changé le paradigme et a conduit à l'idée qu'il était essentiel d'étudier le microenvironnement immunitaire tumoral pour comprendre le développement des tumeurs. L'analyse de ce microenvironnement et la découverte [...] de la présence de structures lymphoïdes tertiaires au sein des tumeurs, véritables lieux de production de réponses anti-tumorales, dont l'existence était alors seulement connue dans des pathologies infectieuses et auto-immunes, nous ont amenés à considérer le microenvironnement tumoral comme un organe immunitaire à part entière. Nous pouvons dire que, d'une certaine façon, le cancer est une maladie immunologique et que les tumeurs sont des lieux au sein desquels la réaction immunitaire joue un rôle majeur pour leur destin* » (Fridman and Teillaud, 2019). Renforçant cette prise de

conscience, deux évènements majeurs sont venus appuyer l'importance et l'intérêt grandissant de la communauté scientifique pour ce domaine de la biologie des cancers. Premièrement, la prestigieuse revue Science a consacré son numéro du 20 Décembre 2013 à la mise en avant de l'Immunothérapie des Cancers. Deuxièmement, et non des moindres, la reconnaissance ultime de la communauté scientifique est atteinte en 2018 par l'attribution du prix Nobel de Physiologie ou Médecine aux deux chercheurs James P. Allison et Tasuku Honjo pour leur travaux sur «la découverte des thérapies anticancéreuses par inhibition de la régulation négative du système immunitaire ». Dès le milieu des années 1990, ils avaient commencé à mettre en évidence la possibilité d'utiliser le système immunitaire pour détruire des tumeurs. Vingt ans plus tard, l'immunothérapie est en passe de révolutionner la prise en charge de certains cancers, jusqu'alors incurables.

Cette révolution est née de l'évolution permanente des connaissances fondamentales dans les domaines de la biologie cellulaire et moléculaire. Cette évolution s'est faite conjointement à l'évolution des techniques d'analyses et le système immunitaire ne fait pas exception à cette dynamique. Dans le domaine de l'immunité des tumeurs, Wolf Hervé Fridman qualifie les tumeurs de « *lieux au sein desquelles la réaction immunitaire joue un rôle majeur pour leur destin* » (Fridman and Teillaud, 2019). En effet, de par leurs effets pernicieux sur leur microenvironnement, les cellules tumorales ont la capacité de moduler et de tirer à elles les avantages que peut lui apporter l'infiltrat immunitaire. Cette modulation de la réponse immune passe par la modification de la composition cellulaire de l'infiltrat et des réponses associées. Les tumeurs induisent un switch d'activité du système immunitaire passant d'une immunosurveillance et du contrôle, voire de l'élimination tumorale, à une immunosuppression limitant l'action cytotoxique de la réponse immune et favorisant l'entretien de la croissance tumorale. Cette compétence propre aux cellules tumorales est liée à leur capacité d'adaptation face à la pression induite par le système immunitaire. En retour, les cellules cancéreuses modifient ses propres interactions avec les acteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale ainsi que les interactions intercellulaires entre les acteurs eux-mêmes. La notion d'interaction et à fortiori de communication intercellulaire peut être vue comme une pierre angulaire des évènements biologiques liés à l'évolution des tumeurs. Pour apprécier le rôle d'un type cellulaire donné il est bon de le replacer dans son contexte environnemental et d'élargir sa vision quant à son spectre d'action. En effet, une cellule donnée ne vit pas

isolée du reste de l'organisme mais communique en permanence avec son environnement plus ou moins proche. Toutes modifications, normales ou malignes subies par cette cellule, impactent directement son réseau de communication complexe et finement régulé et module en profondeur son environnement. Ainsi, via des communications directes (physiques) ou indirectes (cytokines, facteurs de croissances, métabolites, etc.) les cellules tumorales modèlent leur microenvironnement afin d'échapper à la surveillance du système immunitaire et favorise l'installation d'un microenvironnement favorable à leur prolifération.

C'est à travers la compréhension de ces communications intercellulaires que des avancées majeures actuelles et à venir, trouvent et trouveront toutes leurs forces dans le but commun de contrôler la croissance tumorale, d'améliorer le pronostic vital et la qualité de vie des patients atteints de cancer.

Introduction

Partie I. La communication : concept général

1. Qu'est-ce que communiquer ?

1.1. Généralités

Afin de prendre pleinement conscience du concept de communication, il est bon de revenir sur son étymologie. Le terme « communication » provient du latin **communicare** signifiant « mettre en commun, faire part de, partager ». Il dérive de **communis**, « commun » en latin. S'ajoutant à cela, les dictionnaires français définissent l'action de communiquer comme :

- Rendre compte à, faire part de, transmettre. /avoir des relations, être en rapport avec quelqu'un (Littré).
- Transmettre, donner connaissance, faire partager à quelqu'un. / être en relation, en rapport, en correspondance avec quelqu'un (Larousse).

De ce fait, à travers ces définitions, on remarque que l'acte de communiquer met en avant l'idée de transmission dans laquelle **émetteur** et **receveur** de l'information en sont les acteurs. De plus, la communication n'est possible que s'il y a échange de signification. Ce processus est régi par une intention personnelle (émetteur) dirigée vers un partenaire ou un groupe (receveur) dans le but de **modifier** les comportements, les attitudes, les représentations ou les connaissances de chacun des acteurs. Ainsi, toute communication fixe la nature de la relation que l'on entend avoir avec son interlocuteur et définit des places et un type de relations (hiérarchiques, égalitaires, intimes, distantes, consensuelles ou conflictuelles). La structure des relations modifie et influence les propriétés de la communication.

1.2. Classification

Les trois types de communication qui ont été définie en sciences humaines et sociales (interindividuelle, groupale et sociétale) sont empreints d'une grande complexité du fait que l'on définisse également **quatre critères** les caractérisant : l'espace, le temps, la technique et la situation de communication, se décomposant chacun en deux modalités.

- L'espace : Toute communication met en relation ses acteurs dans un espace donné. Cet espace peut être commun (modalité présentielle) pour

- les acteurs de la communication ou ne pas l'être (communication à distance).
- Le temps : Les acteurs d'une communication peuvent diffuser des messages, partager des émotions ou même échanger des savoirs dans le même temps (communication synchrone) ou de manière différée (communication asynchrone).
 - La technique : L'utilisation (communication directe) ou non (communication médiatée) d'un support caractérise le moyen de transmettre l'information lors d'un processus de communication.
 - La situation de communication : Au sein d'un contexte donné, il existe deux grands types de situation de communication. En effet, on peut mettre en évidence les situations où la communication ne peut s'établir que dans un seul sens (communication unidirectionnelle) et les situations où chaque acteur peut prendre part à la communication (communication interactive).

Chacune de ces notions/définitions peuvent être résumées et mises en relation dans la figure suivante (**Figure 1**) :

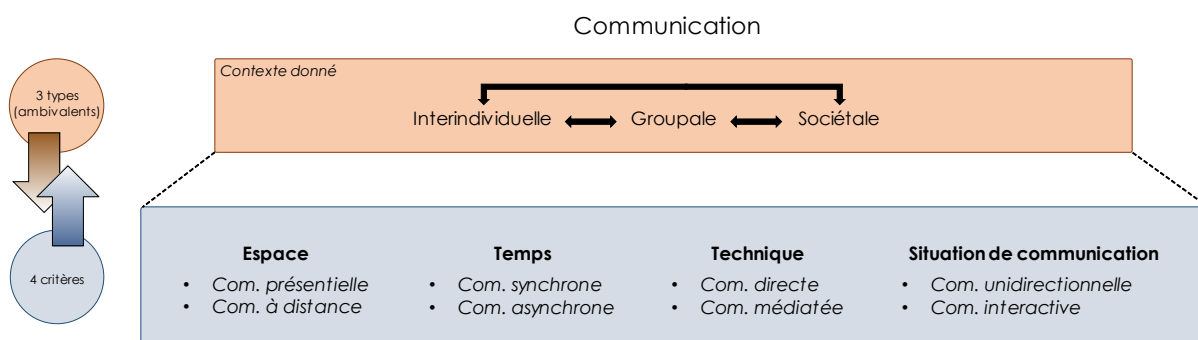


Figure 1 : Résumé schématique du concept général de communication.

Les généralités relatives au concept de communication décrites dans cette partie peuvent être appliquées à divers domaines. Dans la section suivante, le caractère transposable de ces principes généraux au domaine de la Biologie sera démontré.

2. Le concept de Communication appliqué à la Biologie

Il a été estimé que le corps humain est composé de plus de 200 types cellulaires différents pour un total approximatif de $3,72 \cdot 10^{13}$ (37 200 milliards) cellules (Bianconi et

al., 2013). Les cellules présentent une multitude de fonctions et un ensemble de cellules spécialisées dont l'une d'entre elles s'organise en structure plus complexe comme les tissus (la peau, les os, le sang, les muscles) et les organes (cerveau, cœur, foie, poumons, etc.) en coordonnant leur comportement via un réseau complexe de communication.

Chez les organismes multicellulaires, la communication s'établissant entre les cellules qui les composent est donc cruciale au bon fonctionnement de l'organisme. Cette **communication cellulaire** est nécessaire dès les premières étapes de la vie de l'organisme et jusqu'à sa mort. En effet, les cellules doivent communiquer les unes avec les autres afin de **coordonner leur comportement**. Au cours du développement d'un organisme, par exemple, les cellules de l'embryon échangent des signaux afin de déterminer le rôle spécifique de chaque cellule, leur position dans l'organisme et savoir s'il elles doivent survivre, se diviser ou mourir. Une grande variété de signaux coordonne par la suite la croissance, la physiologie et le comportement au jour le jour de l'organisme vis-à-vis du milieu dans lequel il évolue. Toute au long de leur vie, les cellules reçoivent des **stimuli** provenant d'autres cellules ou de leur environnement sous diverses formes. Par exemple, elles peuvent capter des stimuli électromagnétiques (lumière), mécaniques (contact physique) ou même chimiques (messager chimique soluble : cytokine, chimiokine, facteur de croissance, hormone, neurotransmetteur, etc.) et y **répondent de manière spécifique**. Dans cette partie, les principes généraux par lesquels les cellules reçoivent, analysent et répondent à ces stimuli seront détaillés.

A l'instar de la définition générale de la communication (Cf. plus haut) la communication cellulaire est basée sur les mêmes principes généraux. Ainsi, le **schéma général** de toute communication cellulaire met en jeu une **cellule émettrice** d'un message donné par le biais de la production d'un type particulier de molécule de signalisation (**messager**) qui sera détecté par la **cellule cible**. Les cellules cibles possèdent des **récepteurs spécifiques** de ces messagers leur permettant de les reconnaître et de **répondre** au stimulus de manière spécifique. L'information communiquée entre les cellules peut se présenter sous différentes formes et la communication commence par la transformation des stimuli reçus d'une forme à une autre. Cette transformation du message transmis est qualifiée de **transduction du signal**.

2.1. Messagers solubles

Les cellules, isolées ou faisant partie intégrante d'un organisme multicellulaire, utilisent des centaines de **molécules extracellulaires** afin de s'envoyer des signaux les unes aux autres telles que des protéines, des peptides, des acides aminés, des nucléotides, des stéroïdes, des dérivés d'acide gras et même des gaz dissous. Toutefois, malgré la multitude de médiateurs disponibles pour communiquer entre elles, elles ne s'appuient seulement que sur un **petit nombre de mécanismes de base** pour transmettre l'information.

Ainsi, dans les organismes multicellulaires, le système de communication le plus utilisé consiste à envoyer des signaux à l'ensemble de l'organisme par le biais de la circulation systémique. Les molécules de signalisation utilisées dans ce type de communication sont qualifiées **d'hormones**. Elles permettent une **communication à distance** dans laquelle une cellule d'un tissu donné peut transmettre un message à une cellule cible d'un autre tissu. On qualifie ce type de communication de **communication endocrine**.

On note également l'existence de molécules de signalisation n'empruntant pas la circulation systémique. Ces messagers diffusent localement à travers le milieu extracellulaire en restant au voisinage des cellules qui les ont sécrétés et agissent comme des **médiateurs locaux** sur les cellules voisines. Ce type de communication est qualifié de **communication paracrine**. Toutefois, parmi cette action locale on retrouve également des médiateurs agissant directement sur la cellule sécrétrice permettant à celle-ci, par exemple, de maintenir des signaux d'activation, de croissance ou de prolifération. Dans ce cas précis, on parle de **communication autocrine**.

2.2. Communication par contact physique

Un quatrième mode de communication intercellulaire a également été décrit. Cette communication ne passe pas par la libération d'un messager soluble mais par le contact physique d'une cellule avec une autre. Les messagers engagés dans ce mode de communication sont des molécules de signalisation présentes à la surface des cellules leur permettant ainsi d'entrer en contact et de transmettre l'information. Toutefois, cette **communication par contact** englobe également la transmission de signaux intercellulaires par le biais de **jonctions cellulaires**. En effet, outre la nécessité

pour deux cellules individualisées d'entrer en contact *via* leurs molécules de surface, certaines cellules constitutives de tissu (cellules musculaires ou de la peau par exemple) établissent déjà des connexions entre elles (**jonctions cellulaires**). Dans ce cas présent, l'échange d'information se fait directement d'une cellule à l'autre par diffusion du messager sans avoir à traverser la membrane plasmique.

La communication intercellulaire est donc indispensable à la vie des organismes pluricellulaires. En effet, les cellules doivent impérativement échanger les informations nécessaires à la coordination de leurs actions. Ainsi, l'intégration des activités des différents types de cellules constituant un organisme supérieur est principalement réalisée par le système nerveux, le système endocrinien et le système immunitaire. C'est sur ce dernier système biologique que la partie suivante sera consacrée. Ainsi, il sera exposé, par le biais de la description des différents modes de communication intercellulaire, l'importance de ces interactions dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire et à plus forte raison dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme.

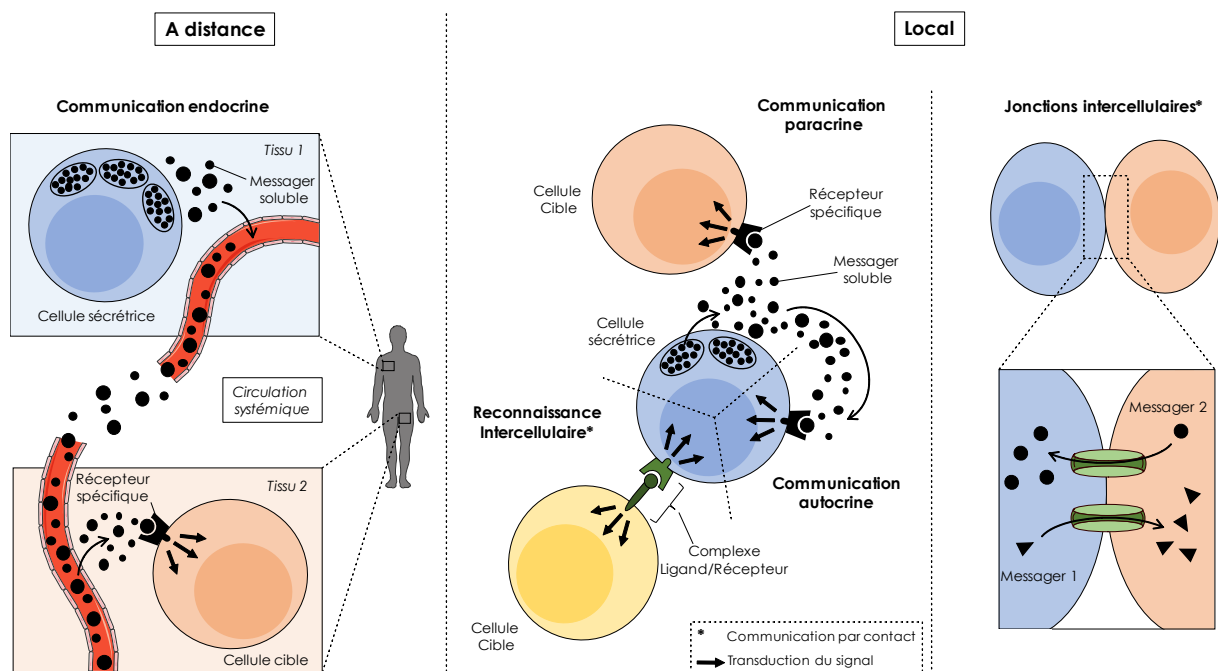


Figure 2 : Représentation schématique des différents modes de communications intercellulaires à distance et locales. Inspiré de Campbell N. et Reece J. « *Biologie* » 7^{ème} édition

3. Communication et Immunologie

3.1. Généralités

Le développement et la fonction du système immunitaire sont dépendants d'un **riche échange d'informations** entre les cellules qui le compose ainsi qu'entre ces dernières et leur environnement. Le maintien de **l'homéostasie du système immunitaire** repose sur un état d'équilibre rendu possible grâce **un réseau complexe de communications** entre ses composantes innées et adaptatives. De manière générale, l'homéostasie décrit les mécanismes par lesquels tout système biologique **maintient sa stabilité**. Dans le cas du système immunitaire ce sont les cellules qui le compose qui jouent ce rôle, notamment grâce à la surveillance permanente de leur environnement et la discrimination active du soi et du non-soi. Ces processus sont nécessaires au maintien de la balance entre tolérance vis-à-vis des antigènes du non-soi ainsi que dans le maintien d'une habileté à reconnaître rapidement les antigènes étrangers. Ce maintien de l'homéostasie immunitaire est orchestré par l'établissement de **communications intercellulaires** entre les différents acteurs de la réponse immune en réponse à un large spectre de signaux extérieurs. La finalité commune de ces communications est de protéger l'organisme des pathogènes, des toxines, de prévenir la mise en place de mécanismes auto-immuns et même d'intervenir lors de processus de prolifération néoplasique maligne (développement tumoral).

Les stimuli responsables du maintien de cette homéostasie immunitaire résultent **d'interactions directes** entre cellules voisines (contacts cellule-cellule) et/ou de la détection de **facteurs solubles** présents dans leur environnement. Ces stimuli peuvent être de nature chimique telle que les cytokines, les chimiokines, certains facteurs de croissance, certains métabolites mais également les anticorps, tous provenant de sites de production d'origines variées (à distance ou proche de la cellule réceptrice). Le maintien de l'homéostasie immunitaire peut également résulter de la détection de molécules signatures (solubles ou membranaires) de certains pathogènes. En somme, ces stimuli d'origines diverses sont considérés comme des **messagers** orchestrant la mise en place de la réponse immune.

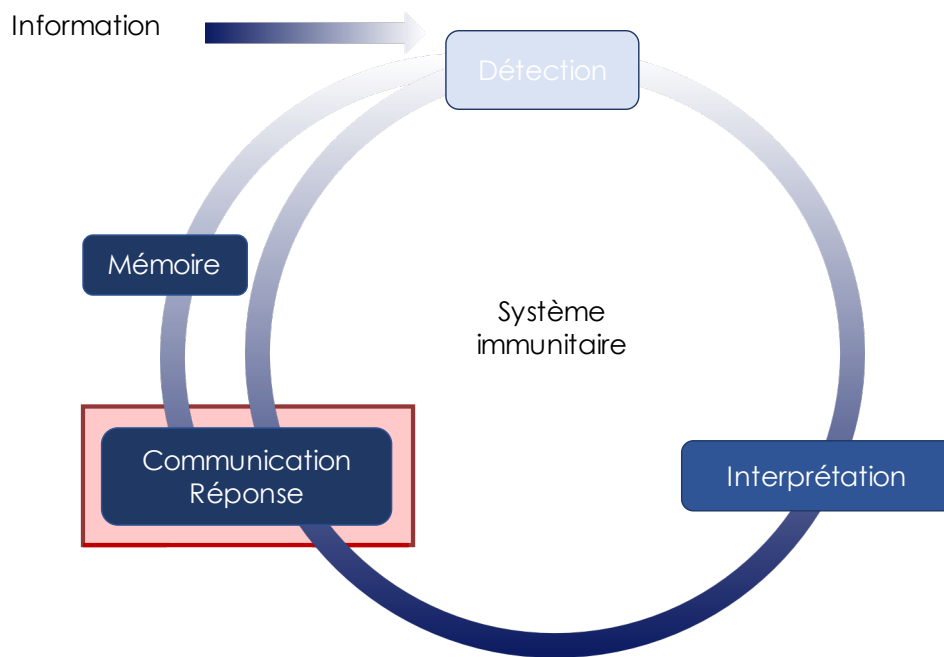


Figure 3 : Schématisation de la gestion de l'information par le système immunitaire. Ce processus commence par la détection d'informations, obtenue par interaction avec des molécules d'origines et de compositions différentes. Les informations sont ensuite interprétées, entraînant une activation et un recrutement spécifiques des leucocytes et l'initiation de l'immunité innée. Enfin, les informations sont communiquées et transmises aux autres composants du système immunitaire, tels que les cellules présentatrices d'antigène et les lymphocytes T CD4⁺. Le système immunitaire est capable de stocker des informations, rapidement mobilisables par la suite. Grâce à la gestion de l'information, le système immunitaire contribue à l'homéostasie de l'hôte. *D'après Marques et al. 2016.*

3.2. Les messagers de la réponse immune

Les processus biologiques menant à une réponse immunitaire définie comprennent plusieurs phases qui se déroulent dans des **cadres spatio-temporels différents** et impliquant **différents types cellulaires**. Ainsi, la mise en place d'une réponse immunitaire efficace nécessite des communications cellulaires assurant la présence des acteurs de la réponse (leucocytes) à un site et à un moment donné ainsi qu'un échange d'informations entre les différents leucocytes et les cellules du tissu impliqués dans la réponse.

Comme évoqué précédemment, ces réseaux de communications impliquent aussi bien des **interactions physiques** entre les cellules (synapse immunologique) que des **interactions à distance** via l'envoi de messagers solubles.

3.2.1. Les messagers solubles

Ces messagers de l'immunité sont appelés **cytokines**. Une cytokine est définie comme étant une protéine de faible masse moléculaire (8 à 50kDa), sécrétée par la majorité des cellules de l'organisme et principalement par les leucocytes. Ces messagers permettent aux cellules de communiquer entre elles au sein du système immunitaire mais également entre le système immunitaire et les autres systèmes de l'organisme. Synthétisées en réponse à un stimulus, les cytokines agissent en se fixant sur leurs **récepteurs spécifiques** présents à la surface des cellules cibles dont elles modifient l'activité. La classification de ces messagers cytokiniques repose majoritairement sur leurs propriétés biochimiques et structurales.

Comme présenté dans la section précédente (**Figure 2**), différents modes d'action des cytokines sont possibles du fait de la distance existant entre la cellule émettrice et la cellule réceptrice. On distingue donc:

- **La communication autocrine** : les cellules émettrices et réceptrices ne font qu'un. En effet, la cellule sécrétant la cytokine possède son récepteur spécifique. Ce mode d'action peut être qualifié d'autostimulation. Un exemple classique en immunologie est le cas de l'IL-2 sécrétée par et pour les lymphocytes T helper dans le but de maintenir l'état d'activation de ces cellules.
- **La communication paracrine** : la cytokine agit sur des cellules voisines de la cellule émettrice, au sein d'un même tissu ou organe. Le rayon d'action dans ce mode de communication est limité et représente le mode d'action le plus courant.
- **La communication endocrine** : ici, la cytokine agit à distance, sur des cellules éloignées de son site de production. Pour agir sur ses cibles, elle transite par la circulation sanguine. Ce mode d'action se rapproche du mode d'action des hormones, mais contrairement à la plupart des hormones, il n'existe pas, pour les cytokines, de tissu spécifique source de production. Les cytokines inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 ou le TNF- α par exemple, agissent selon ce mode d'action.

Toutefois, les modes d'action présentés ci-dessus sont quelque peu simplistes au regard de la réalité. En effet, les modes d'action des différentes cytokines sont étroitement entremêlés et chaque leucocyte subit en permanence l'action de

nombreuses d'entre elles en plus de divers signaux issus de ligands membranaires et d'autres messagers (hormones, facteurs de croissances, etc.). Cette complexité est telle qu'il faut voir l'action de chaque cytokine comme un maillon d'un réseau d'actions interconnectées. En effet, il apparaît qu'une certaine redondance quant à l'action d'un panel donné de cytokines n'entraîne pas de modifications majeures de la réponse biologique finale lorsqu'une ou plusieurs d'entre elles sont en défaut. La complexité de ces réseaux de communication peut toutefois être discriminée en plusieurs modes d'interactions. On distingue :

- **La pléiotropie** : via la sécrétion d'une cytokine donnée, une cellule émettrice induira une réponse biologique différente selon la cellule cible visée. Toutes les cytokines présentes des actions multiples.
- **La redondance (l'agonisme)**: Des cytokines différentes agissent sur une même cellule cible. Ces interactions induisent des signaux identiques à l'origine d'une activité biologique identique pour chacune des cytokines considérées.
- **La synergie** : Cet effet définit l'action conjointe de cytokines différentes induisant une réponse biologique plus intense que celle que chacune d'entre elles auraient induit séparément.
- **L'antagonisme** : Décrit l'action d'une cytokine venant inhiber la signalisation induite par d'autres cytokines.
- **La production en cascade de cytokines** : Un stimulus induit la production d'une première cytokine, induisant à son tour la production d'une deuxième et ainsi de suite.

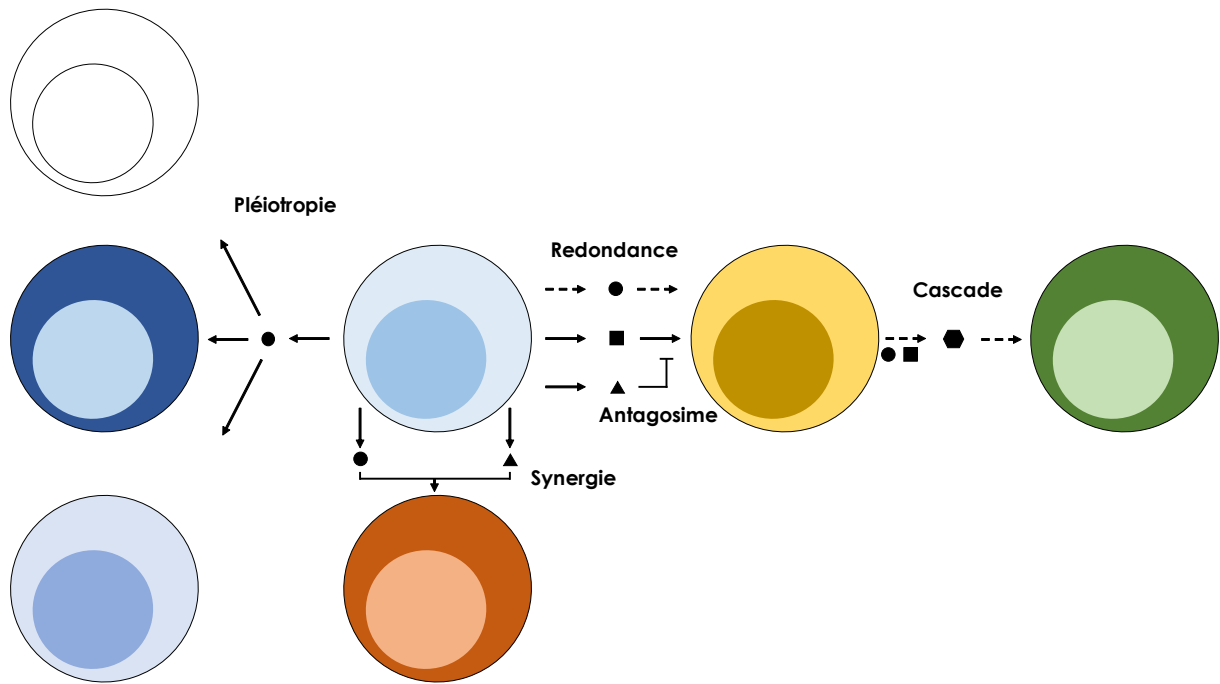


Figure 4 : Résumé schématique des différents modes d'interaction des cytokines.
 D'après Espinosa E. and Chillet P. « Immunologie ».

Du fait de leur action permanente et conjointe sur les cellules, les effets biologiques des cytokines sont très variés. Il est assez complexe de connaître la participation de chaque cytokine prise séparément sur un phénomène biologique donné.

De plus, parmi les messagers solubles du système immunitaire, on individualise un autre groupe de molécules : les **chimiokines**, présentant des propriétés chimiotactiques. Cette classification a été initiée en 1987 à la suite de la découverte des propriétés chimiotactiques de l'IL-8 (Yoshimura, 2015). C'est ainsi qu'un nouveau champ d'investigation sur le chimiotactisme (ou « homing ») des leucocytes vit le jour. A l'instar de la super famille des cytokines, les chimiokines sont des protéines de faible poids moléculaire (6 à 14kDa). Ces messagers sont principalement sécrétés par les leucocytes, les thrombocytes (plaquettes), les cellules épithéliales et endothéliales. Leur mode d'action réside dans la formation d'un gradient de concentration (ou gradient chimiotactique) de la cellule émettrice (force concentration) aux cellules cibles (faible concentration). Du fait de ce gradient, la fixation sur leurs récepteurs spécifiques à la surface des cellules cibles induisent leur migration. Les cellules cibles remontent le gradient de concentration afin d'atteindre le site de production de la chimiokine, lieu où leur action est désirée.

De nombreuses cellules de l'organisme sécrètent ces messagers en plus de celles du système immunitaire. Cette sécrétion peut être soit **constitutive** (intervenant dans l'homéostasie du système immunitaire) ou **induite** lors de la réponse à un stimulus extérieur. Dans les deux cas, les chimiokines sont stockées au sein des cellules, dans des granules, afin d'être sécrétées rapidement suite à l'activation cellulaire. De plus, le paramètre **d'espace** est une variable importante pour le chimiotactisme puisqu'elle participe au guidage des cellules. Ainsi, pour que le chimiotactisme soit efficace, il est nécessaire que les chimiokines soient accessibles aux leucocytes et leur gradient de concentration maintenu. Pour être **accessibles** aux leucocytes présents dans le système sanguin et contrôler leur diapédèse dans les tissus, les chimiokines doivent traverser la paroi des vaisseaux (principalement les cellules endothéliales) **passivement** à travers les jonctions intercellulaires (voie péricellulaire) ou **activement** par transcytose (voie transcellulaire).

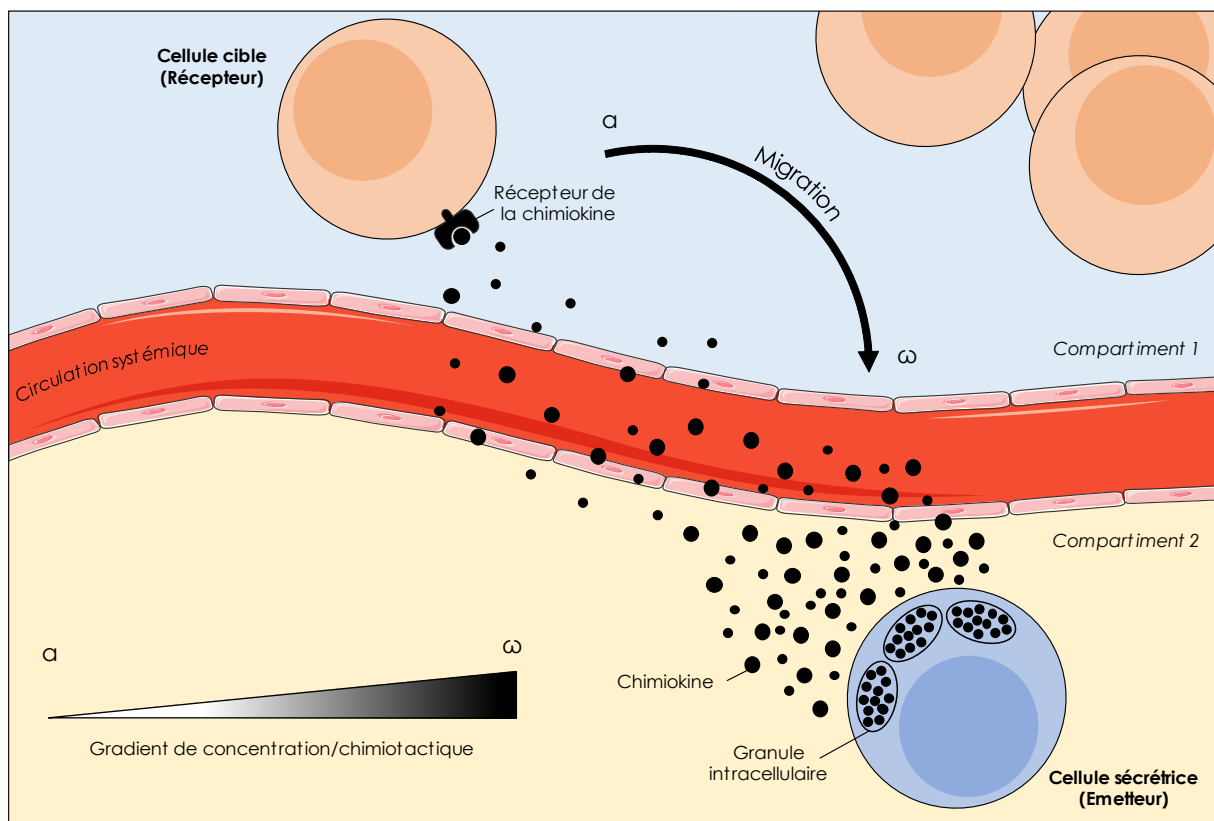


Figure 5 : Représentation schématique du mécanisme de communication cellulaire par chimiotactisme. Migration de la cellule cible selon le gradient de concentration ou gradient chimiotactique vers le site de production de la chimiokine (cellule sécrétrice).

Les **vésicules extracellulaires** font également partie intégrante des modes de communications intercellulaires à distance. Ce type de messenger correspond à des nanovésicules dérivées des membranes cellulaires et sécrétées dans le milieu extracellulaire. Elles sont émises dans l'espace extracellulaire, circulent via les différents fluides biologiques (sang, lymphe, urine, lait, liquide céphalo-rachidien, liquide synovial, etc.) et modulent localement ou à distance les réponses cellulaires. Ces types de messagers sont répartis en trois principales familles se dissociant les unes des autres de par leur taille, leur contenu, leurs mécanismes de formation et de sécrétion ainsi que leurs fonctions. On identifie les **microvésicules** (MVs) ou **microparticules** (MPs), les **exosomes** et les **corps apoptotiques** (Zaborowski *et al.*, 2015 ; Yáñez-Mó *et al.*, 2015 ; Borges *et al.*, 2013). D'autres termes peuvent toutefois être retrouvés tels que nanoparticules, ectosomes, oncosomes ou prostasomes.

La première grande famille, les **MVs/MPs**, regroupe des vésicules sécrétées par bourgeonnement de la membrane plasmique de tous les types cellulaires. Toutefois, les MVs/MPs les mieux décrites sont celles produites par les plaquettes (thrombocytes), les cellules endothéliales et tumorales. Leur production fait suite à une activation cellulaire (sénescence, apoptose, stimulation pro-inflammatoire ou pro-thrombotiques) ou à un stress (Nieuwland *et al.*, 1997 ; Heijnen *et al.*, 1999 ; Beyer et Pisetsky, 2010) et sont majoritairement retrouvées dans les fluides biologiques tels que l'urine, la salive, le liquide céphalo-rachidien, le liquide synovial, etc. (Castellana *et al.*, 2009 ; Moulin *et al.*, 2010).

Les **exosomes**, d'origine endosomale, dérivent de vésicules intraluminales formées lors de la maturation des corps multivésiculaires (endosomes précoces/tardifs +/- lysosomes) et sont sécrétées dans le milieu extracellulaire après fusion de ces derniers avec la membrane plasmique (van Niel *et al.*, 2018). Parmi leur rôle physiologique, plusieurs études démontrent la capacité de cette classe de vésicules extracellulaires à réguler la réponse immunitaire et anti-tumorale, notamment *via* leur capacité à transférer des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) entre cellules immunitaires (Thery *et al.*, 2009).

Enfin, les **corps apoptotiques** sont des vésicules produites durant les étapes tardives de l'apoptose, par fragmentation cellulaire et contiennent aussi bien des composants intra-cytoplasmiques, des organelles ainsi que du matériel génétique (ADN, histones) issus de la fragmentation du noyau. La formation de ce type de vésicules

extracellulaires est essentielle à l'élimination optimale des cellules en apoptose d'une part dans un souci de maintien de l'homéostasie cellulaire et d'autre part afin d'éviter le relargage du contenu cellulaire potentiellement pro-immunogène et pro-inflammatoire (Savill *et al.*, 2000 ; Ren *et al.*, 1998).

La communication intercellulaire au sein du système immunitaire ne se limite pas à la sécrétion et la fixation de ces messagers (cytokines, chimiokines et vésicules extracellulaires). En effet, des **contacts intercellulaires** (cellule-cellule) occupent une place importante dans les mécanismes de coordination de la réponse immune. En immunologie, l'interface physique créée entre deux cellules du système immunitaire est qualifiée de **synapse immunologique**. La partie suivante sera consacrée à l'introduction de cet autre mécanisme de communication cellulaire au sein du système immunitaire.

3.2.2. *La synapse immunologique*

De manière dogmatique, il est admis que le système immunitaire est fractionné en 2 composantes. L'**immunité innée**, très conservée au cours de l'évolution, est la première forme de réponse immunitaire à se mettre en place et représente une excellente première barrière de protection pour l'hôte. L'**immunité adaptative**, plus spécifique et plus puissante que la première, est toutefois plus longue à se mettre en place. Ainsi, une réponse immunitaire efficace contre un pathogène extérieur ou un dysfonctionnement cellulaire intrinsèque à l'organisme dépend de l'activation et de l'action coordonnées des deux composantes du système immunitaire et à plus forte raison des acteurs cellulaires qui les composent. Plus particulièrement, durant la mise en place de la réponse immunitaire, un ensemble de cellules regroupées sous le terme de **cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) professionnelles** (Cellules dendritiques (CDs), Macrophages, Lymphocytes B) est à l'origine de cette coordination entre réponse immunitaire innée et adaptative. Les CPAs transmettent l'information d'agression ou de dysfonctionnement cellulaire aux cellules de l'immunité adaptative. Ce mécanisme de communication intercellulaire met en lien les paramètres d'**espace** et de **temps**, introduits au début de ce chapitre. Paramètre d'espace car le site primaire du déclenchement de la réponse immunitaire innée (tissu infecté, cellule(s) aberrante(s) au sein d'un tissu) est à distance du site secondaire d'activation de la réponse adaptative (organes lymphoïdes secondaires :

ganglions, rate, muqueuses associées au tissus lymphoïdes). Paramètre de temps car la mise en place de la réponse immunitaire adaptative nécessite le transit des CPAs du site primaire de la réponse immune au site d'activation des acteurs de la réponse adaptative.

De manière schématique, les CPAs intègrent, appréhendent et présentent sur une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de type I ou II (CMH-I ou CMH-II) les antigènes relatifs au stimulus qui a déclenché l'activation de la réponse immune. C'est ce complexe CMH/peptide antigénique qui va être reconnu par l'immunorécepteur (TCR) des acteurs de la réponse adaptative, les lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺, au sein des organes lymphoïdes secondaires. Cet événement mène à l'assemblage et la mise en contact de domaines membranaires spécialisés de chacun des acteurs (CPAs et lymphocytes T). Cette zone de contact physique intercellulaire est appelée **synapse immunologique** (Norcross, 1984).

La synapse immunologique est requise pour induire l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules T effectrices spécifiques de l'antigène. L'établissement d'une telle communication intercellulaire par contact physique requière l'engagement de molécules membranaires (récepteurs et ligands) ainsi qu'une profonde réorganisation du cytosquelette (Dustin *et al.*, 1997 ; Kupfer et Singer, 1989 ; Dustin, 2007). Par la suite, les cellules activées et différenciées quittent les organes lymphoïdes secondaires afin d'exercer leurs actions effectrices au site du déclenchement de la réponse immune et/ou restent au sein des tissus lymphoïdes, du tissu infecté ou en périphérie afin de constituer la mémoire immunitaire de l'hôte. Les actions effectrices de ces cellules seront à leur tour gouvernées par un échange d'informations faisant intervenir majoritairement des médiateurs tels qu'ils ont été décrit dans le paragraphe précédent.

Partie II. Communication cellulaire et Cancer

La communication intercellulaire est un phénomène complexe. Ensemble, ces mécanismes d'interactions contribuent à la coordination des comportements cellulaires et à la complexité des fonctions biologiques tissulaires.

Durant la dernière décennie, les avancées relatives à la compréhension de l'initiation et de la progression tumorale ont largement contribué à la mise en place d'études focalisées sur les désordres génétiques. Toutefois, il a été démontré que les cellules cancéreuses possèdent le pouvoir d'influencer leur microenvironnement notamment en établissant une communication bidirectionnelle avec les différents systèmes biologiques, dont le système immunitaire. Néanmoins, cette communication est extrêmement complexe et les nombreuses variations dépendantes de la nature des tumeurs viennent ajouter de la complexité à ce réseau d'interactions.

1. Le cancer

1.1. Epidémiologie du cancer

Sur la base des données GLOBOCAN 2018, l'Observatoire mondial du cancer du CIRC fournit des estimations de l'incidence et de la mortalité dans 185 pays et pour 36 types de cancer. Publiée dans *CA: A Cancer Journal for Clinicians* (Bray *et al.*, 2018), l'étude de ces données met en évidence à la fois la grande hétérogénéité géographique de l'incidence du cancer et les variations de l'ampleur et du profil de la maladie entre et à l'intérieur des différentes régions du monde. Ainsi, en 2018, 18,1 millions de nouveaux cas et 9,6 millions de décès ont été recensés. Un homme sur cinq et une femme sur six dans le monde développeront un cancer au cours de leur vie, et un homme sur huit et une femme sur 11 meurent de cette maladie. A l'échelle mondiale, le nombre total de personnes vivant avec un cancer dans les cinq ans suivant le diagnostic (prévalence à cinq ans), est estimé à 43,8 millions.

D'un point de vue géographique, l'Europe concentre 23,4% du total des cas de cancer dans le monde et 20,3% des décès dus au cancer, alors qu'elle ne représente que 9,0% de la population mondiale. Les Amériques comptent 13,3% de la population mondiale mais concentrent 21,0% de l'incidence et 14,4% de la mortalité dans le monde. Contrairement aux autres régions du monde, les proportions de décès par

cancer en Asie et en Afrique (57,3% et 7,3%, respectivement) sont plus élevées que les proportions de cas d'incidence (48,4% et 5,8%, respectivement).

1.2. Le cancer : les origines

Les causes du développement de cette affection sont multifactorielles. La croissance démographique et le vieillissement des populations, ainsi que le tabac, les expositions professionnelles, la pollution environnementale, les contaminants, l'alimentation, les médicaments, les rayonnements, les infections chroniques, les immunodépressions, les prédispositions génétiques, les facteurs génésiques et les facteurs hormonaux sont autant de causes possibles à la survenue de cancers dans la population mondiale.

Biologiquement parlant, le cancer est une pathologie caractérisée par la prolifération incontrôlée de cellules. Ce phénomène est sous-jacent à une expression génétique aberrante induite par l'accumulation de mutations au sein de cellules somatiques. Ces mutations touchent des gènes impliqués dans des mécanismes biochimiques, des stratégies de régulation ou bien même de voies de signalisation cellulaire gouvernant la croissance, la survie et la prolifération des cellules (Laubenbacher *et al.*, 2009). De plus, en 2000, Hanahan et Weinberg ont proposé une explication à l'existence d'une hétérogénéité des génotypes des cellules cancéreuses en expliquant que le développement tumoral est dicté par la manifestation de six altérations de la physiologie cellulaire. Ainsi, ils décrivent l'indépendance des cellules cancéreuses face aux signaux de croissance, leur résistance à l'encontre des signaux inhibiteurs de croissance, leur résistance à l'apoptose, leur capacité de prolifération illimitée, leur capacité à favoriser l'angiogenèse ainsi que leur capacité à promouvoir le processus de métastases (Hanahan and Weinberg, 2000). Une décennie plus tard, ces mêmes chercheurs étoffent leur constat en expliquant que les caractéristiques précédemment citées ("Hallmarks") sont facilitées par une certaine instabilité génétique des cellules cancéreuses permettant la génération de mutations au hasard. D'autre part, ils ajoutent deux autres composantes à cette liste, à savoir la reprogrammation du métabolisme énergétique cellulaire dans le but de soutenir la croissance tumorale, initialement observée par Otto Warburg dans les années 1930 (Warburg, 1956), ainsi que la capacité des cellules tumorales à échapper à la surveillance du système immunitaire.

Cette dernière capacité est considérée comme la septième caractéristique des cellules cancéreuses (Zitvogel *et al.*, 2006 ; Colotta *et al.* 2009 ; Hanahan and Weinberg, 2011). Toutefois, la compréhension de la biologie des tumeurs ne peut se baser uniquement sur l'énumération des traits caractéristiques des cellules cancéreuses sans y inclure la contribution du microenvironnement tumoral. En effet, nombres de types et sous-types cellulaires de ce microenvironnement communiquent entre eux et contribuent à la mise en place des caractéristiques décrites par Hanahan et Weinberg.

2. Système immunitaire et cancer : un lien étroit

Les interactions intercellulaires sont d'une importance cruciale pour les mécanismes de formation des tissus, l'homéostasie, les processus de régénérations, pour le fonctionnement du système immunitaire et la mise en place d'une réponse immune adaptée. Dans le cancer, il apparait que la mise en place de réseaux de communications intercellulaires au sein du microenvironnement tumoral contribuent à l'élimination ou à la progression des tumeurs et au développement de métastases. La compréhension des mécanismes qui régissent les interactions entre cellules cancéreuses et cellules immunitaires représente une part importante des espoirs portés par la recherche actuelle.

2.1. Microenvironnement tumoral : système immunitaire, un acteur clé.

Les tumeurs ne sont pas exclusivement constituées de cellules cancéreuses mais peuvent être considérées comme des entités complexes de par leur composition et leur fonctionnement (« organ-like structure »). Plus de 50% des éléments qui les composent sont des cellules et des composants extracellulaires non-cancéreux (Semenza *et al.*, 2016). Les interactions entre cellules normales et cancéreuses peuvent avoir une action anti-tumorale. Toutefois, cette action bénéfique est, avec le temps, contrôlée et détournée au profit de la croissance tumorale (Gajewski *et al.*, 2013 ; Noy *et al.*, 2014 ; Mantovani *et al.*, 2002 ; Binnewies *et al.*, 2018 ; Xing *et al.*, 2010 ; Rivera *et al.*, 2015 ; Lu *et al.*, 2012). Parmi ces éléments cellulaires et extracellulaires constituant les tumeurs, on note la présence d'une matrice extracellulaire (MEC), de

cellules endothéliales constituant des réseaux lymphatiques et vasculaires, de péricytes, d'adipocytes, de cellules souches mésenchymateuses, de fibroblastes qui, dans ce contexte, portent le nom de fibroblastes associés aux tumeurs (cancer-associated fibroblasts ou CAFs) et une multitude d'acteurs immunitaires de nature différente tels que des cellules d'origine myéloïde (TAMs, MDSCs, TANs notamment), des lymphocytes B, des lymphocytes T (CD4⁺ et CD8⁺/cytotoxiques) et d'autres cellules à activité cytotoxique (NK et NKT). Un chapitre complet reviendra sur l'impact des acteurs de la réponse immune sur l'évolution des tumeurs. Toutefois, il est bon de rappeler que la pluralité phénotypique et fonctionnelle de ces différents acteurs cellulaires vient ajouter de la complexité à la compréhension des processus biologiques régissant l'évolution des tumeurs, notamment en termes d'interactions intercellulaires : qui fait quoi sur qui et qu'elle en est la répercussion sur la croissance tumorale ? Pour toucher du doigt cette complexité, prenons l'exemple des CAFs.

Premièrement, dans des conditions homéostatiques non cancéreuses, les fibroblastes résidents des tissus sont des sentinelles essentielles au maintien de l'intégrité tissulaire (Servais *et al.*, 2013). Ces fonctions physiologiques sont toutefois détournées dans les CAFs au sein du microenvironnement des tumeurs (Tumor microenvironnement ou TME). Les CAFs constituent une population de cellules stromales extrêmement hétérogènes et occupe une place importante au sein du TME des tumeurs solides. Dans certains types de cancer, les CAFs sont le type de cellules stromales le plus répandu. La présence et le fonctionnement de ces cellules dans le microenvironnement sont associés à un mauvais pronostic dans nombre de cancers (Liu *et al.*, 2016). De plus, des tumeurs associées à des signatures stromales élevées ont été associées à une résistance au traitement et à une rechute de la maladie (Calon *et al.*, 2015 ; Fiori *et al.*, 2019). Les CAFs sont composés de multiples sous-populations de diverses origines tels que notamment des fibroblastes tissulaires résidents reprogrammés (Kalluri *et al.*, 2016 ; Sharon *et al.*, 2015), des cellules mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse (Raz *et al.*, 2018 ; Quante *et al.*, 2011), des adipocytes (Kidd *et al.*, 2012) et des cellules endothéliales (Zeidberg *et al.*, 2007). Sur le plan fonctionnel, il a été démontré que les CAFs stimulent la croissance tumorale de différentes manières : en favorisant directement la prolifération des cellules cancéreuses via la sécrétion de facteurs de croissance, en induisant l'angiogenèse et en remodelant la MEC, ce qui favorise l'invasion des cellules

tumorales (LeBleu *et al.*, 2018 ; Kalluri *et al.*, 2016 ; Gascard *et al.*, 2016 ; Kalluri *et al.*, 2006 ; Ohlund *et al.*, 2014).

Outre la signalisation induite par les cellules tumorales induisant une suppression immunitaire, les fibroblastes apparaissent de plus en plus comme des acteurs essentiels de la transformation du TME en un phénotype immunosuppresseur favorisant la croissance tumorale (Barnas *et al.*, 2010). Les CAFs contribuent à la fuite immunitaire via la régulation positive de la production de cytokines immunosuppressives et des ligands de points de contrôle immunitaires (immune checkpoints, cf. section dédiée), l'exclusion des cellules T CD8⁺ cytotoxiques anti-tumorales et la modification de la différenciation fonctionnelle des cellules inflammatoires infiltrant les tumeurs. Ainsi, via la communication avec son environnement, les CAFs modulent fortement l'infiltrat (recrutement/exclusion), la différenciation et l'activité des acteurs du système immunitaire au sein du microenvironnement (résumé dans les **tableaux 1 à 3** en **Annexe 1**).

De plus, les CAF sont également impliqués dans l'installation de l'inflammation promotrice de tumeurs dans divers types de cancer via la sécrétion de cytokines et de chimiokines intervenant dans le recrutement et l'activation de cellules immunitaires ainsi que par leurs interactions réciproques avec les cellules immunitaires dans le TME (Servais *et al.*, 2013 ; Cohen *et al.*, 2017). Dans ce contexte, le lien entre inflammation et le cancer est né des observations de Rudolf Virchow en 1863 (Virchow, 1863), parmi lesquelles il nota la présence de leucocytes au sein de tissus néoplasiques. Il suggéra que l'infiltration lymphocytaire au niveau de sites d'inflammation chronique reflétait l'origine de cancers. Ainsi, l'inflammation joue un rôle important et contrasté dans le développement tumoral. S'ajoutant au fait que les acteurs de ce processus (cellules effectrices et cytokines) diffèrent considérablement d'une tumeur à l'autre, l'inflammation est décrite par Colotta et collègues comme ayant un double visage. A la fois délétère et bénéfique, les auteurs décrivent ainsi l'inflammation comme « the dark and the bright side of the force » (Colotta *et al.*, 2009). «The dark side» représentant la connexion entre inflammation et cancer en faveur de la progression tumorale. A l'inverse, « the bright side » correspond à l'action anti-tumorale du système immunitaire.

2.1.1. Du concept de l'immunosurveillance à celui d'immunoediting

Le concept selon lequel le système immunitaire permet la reconnaissance et l'élimination de tumeurs au stade primaire de leur développement remonte à environ un siècle. En effet, Ehrlich avance en 1909 l'hypothèse que le système immunitaire pourrait protéger l'organisme contre des pathologies d'origine néoplasique (Ehrlich, 1909). De manière similaire, Coley observe quelques années plus tôt, en 1891, une régression tumorale chez certains patients atteint de cancer et ayant développés une infection bactérienne (Weimann and Starnes, 1994). Toutefois, par manque de connaissances et d'outils adaptés à l'étude de cette hypothèse, il faudra attendre plusieurs décennies avant qu'elle ne soit remise au goût du jour par les travaux de Medawar (Medawar 1944 et 1945), Klein (Klein, 1966), Old et Boyse (Old and Boyse, 1966) montrant que les cellules de l'immunité peuvent reconnaître des tissus transformés soit via la reconnaissance de structures propres aux cellules cancéreuses soit en réponse aux molécules sécrétées par ces dernières. De ces constats Burnet et Thomas proposent un nouveau concept : l'**immunosurveillance** (Thomas, 1959 et 1982 ; Burnet, 1957, 1964, 1970, et 1971).

Toutefois, les études ultérieures menées par Stutman fournissent peu de preuves en faveur de cette hypothèse. En effet, il observe que la susceptibilité du développement tumoral (spontané et induit) chez des souris immunocompétentes est similaire à celle de souris nudes (immunodéficiences sévères mais non totales) (Stutman 1973, 1974, 1978 et 1979). Sur la base de ce constat, l'hypothèse de l'immunosurveillance fut abandonnée.

Malgré cela, un certain regain d'intérêt pour le rôle joué par le système immunitaire dans le contrôle du développement tumoral s'est fait ressentir dans les années 1990 grâce à la découverte de l'importance de l'interféron- γ (INF- γ) dans le rejet de cellules tumorales transplantées. En effet, il a été démontré d'une part que la réponse immunitaire est essentielle à la prévention du développement tumoral spontané et induit et d'autre part que la fonction de suppression tumorale jouée par le système immunitaire est dépendante de l'INF- γ . Bien que ces preuves soient en faveur du concept d'immunosurveillance, le professeur Schreiber et son équipe pondèrent leurs propos en démontrant que le système immunitaire contrôle non seulement la "quantité" tumorale mais également sa "qualité" (immunogénicité). En effet, la théorie

de l'immunosurveillance ne sous-entend que le rôle protecteur du système immunitaire dans les premières étapes du développement tumoral. Néanmoins, il semblerait que l'immunité innée et adaptative agissent de concert et non uniquement dans ce but mais sculpteraient également le phénotype immunogène des tumeurs. Ainsi a été suggéré le concept d'**immunoediting** (Shankaran *et al.*, 2001). L'interaction entre le système immunitaire et la tumeur suivrait trois phases : les « 3 E du concept d'immunoediting » : **Elimination, Equilibre et Echappement** (Dunn *et al.*, 2002 et 2004).

2.1.2. Les trois E du concept d'immunoediting

Elimination: La phase d'élimination correspond au principe originel de l'immunosurveillance et peut être divisée en quatre étapes. Premièrement, les effets anti-tumoraux du système immunitaire se manifesteraient seulement après que les cellules transformées aient contournées leurs mécanismes de suppression tumorale (Macleod, 2000) et que les acteurs de l'immunité innée soient avertis d'un remodelage tissulaire (angiogenèse et prolifération cellulaire). Il en résulte l'initiation de la croissance tumorale (Hanahan and Folkman, 1996 ; Carmeliet and Jain, 2000). Ainsi, ce remodelage tissulaire serait responsable de l'établissement d'un environnement inflammatoire médié par la production de cytokines pro-inflammatoires agissant de concert avec les chimiokines produites par les cellules tumorales dans le but de recruter les cellules de l'immunité innée (Vicari and Caux, 2002 ; Matzinger, 1994). Dans un deuxième temps, ces dernières vont reconnaître des signaux spécifiques des cellules tumorales (antigènes tumoraux) et être à l'initiative de la production d'INF- γ . Il s'en suivra l'infiltration et la production d'interleukine 12 (IL-12) par les macrophages permettant le recrutement des cellules "natural killer" (NK) et l'augmentation de la production d'INF- γ (feedback positif) (Hodge-Dufour *et al.*, 1997). Dans un troisième temps, les cellules dendritiques (CD) recrutées et activées au niveau du site de la tumeur vont pouvoir induire l'activation des cellules de l'immunité adaptative et plus particulièrement des lymphocytes T helper 1 (Th1 = LT CD4⁺) facilitant ainsi le développement des lymphocytes T cytotoxiques (CTLs = LT CD8⁺). Finalement, la spécificité des cellules CD4⁺ (Lymphocytes T helper) vis-à-vis des antigènes tumoraux va permettre la production d'IL-2 qui, en association avec l'IL-15 produite par les cellules tumorales, permet le maintien des cellules CD8⁺ et l'induction

de la mort des cellules tumorales. D'autre part, la production d'INF- γ par les CTLs potentialise la destruction des cellules tumorales. Ainsi, la phase d'élimination est un processus continu.

Equilibre : La phase d'équilibre est une sorte de dormance tumorale durant laquelle la croissance tumorale est contrôlée par le système immunitaire. Cette phase survient si la réussite de la phase d'élimination est incomplète. Le système immunitaire imposant une pression de sélection sur les cellules tumorales, certaines développent des mutations et résistent à son action anti-tumorale. Ainsi, cette phase est caractérisée par un équilibre entre le système immunitaire de l'hôte et les variants tumoraux ainsi produits. De ce fait, le développement tumoral est contenu mais n'est pas inhibé. Ce phénomène pouvant s'étaler sur plusieurs décennies avant toute manifestation clinique (cellules tumorales latentes) (Aguirre-Ghiso, 2007). Le maintien de cette phase d'équilibre est le résultat de l'action de l'immunité adaptative (via IL-12, IFN- γ , CD4⁺, CD8⁺) (Schreiber *et al.*, 2011). D'autre part, la nouvelle population de clones tumoraux apparus est responsable d'une diminution de l'immunogénicité de la tumeur. En effet, la diminution de l'expression des molécules du CMH-I leur permet de limiter leur reconnaissance par les CTLs et leur confère un avantage sélectif.

Echappement: Les cellules tumorales ayant développées des mutations entrent dans une phase d'échappement suite à l'échec des principaux mécanismes intrinsèques et extrinsèques suppresseurs de tumeur. S'ajoutant à la diminution de la présentation des antigènes tumoraux (diminution des molécules du CMH-I) impactant la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire, celles-ci développent des résistances contre les cellules cytotoxiques notamment grâce à l'induction de mécanismes anti-apoptotiques tels que l'activation de facteurs de transcription pro-oncogéniques (e.g. STAT3) ou l'expression de molécules effectrices anti-apoptotiques (e.g. BCL-2). D'autre part, cette phase peut être également le résultat de la mise en place d'un environnement immunosuppresseur (Radoja *et al.*, 2000). Cet environnement est caractérisé par la présence de cytokines immunosuppressives tels que le "Vascular Endothelial Growth Factor" (VEGF), le "Transforming Growth Factor- β " (TGF- β), la galectine ou l'indoelamine-2,3-dioxygénase (IDO) produites par les cellules tumorales résistantes mais également par

le recrutement de cellules aux propriétés immunosuppressives tels que les lymphocytes T régulateur (Treg) (via la production d'IL-10 et de TGF- β , l'expression de molécules co-stimulatrices négatives telles CTLA-4, PD-1 et PD-L1, ainsi que la consommation d'IL-2 essentielle au maintien des CTL) et les « Myeloid-Derived Suppressor Cells » (MDSCs) (via l'induction des Treg et la production de TGF- β) (Schreiber et al., 2011).

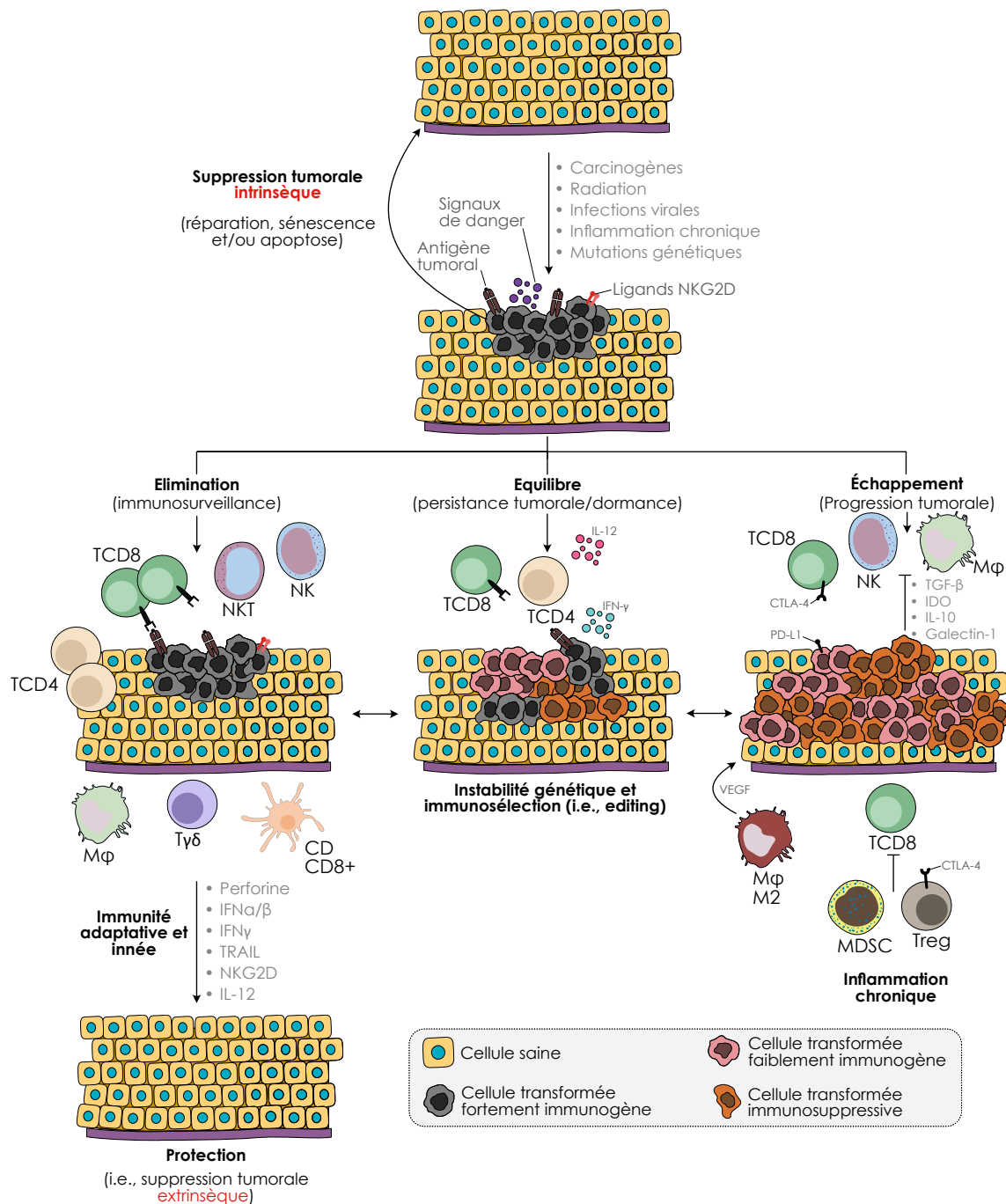


Figure 6 : Les trois phases du concept d'immunoediting. Ce concept est le résultat de trois processus fonctionnant indépendamment ou de manière séquentielle afin de contrôler et façonner les tumeurs. Une fois que les cellules normales sont transformées en cellules tumorales par la combinaison d'activation d'oncogènes et l'échec des

mécanismes intrinsèques suppresseurs de tumeurs, le système immunitaire peut jouer le rôle d'inhibiteur extrinsèque des tumeurs en éliminant les cellules tumorales ou en prévenant leur excroissance. Dans la première phase, l'élimination, auparavant appelée immunosurveillance du cancer, les cellules et molécules immunitaires innées et adaptatives reconnaissent les cellules transformées et les détruisent, entraînant un retour à la physiologie normale du tissu. Cependant, si l'immunité anti-tumorale n'est pas capable d'éliminer complètement les cellules transformées, les variants tumoraux ayant survécu peuvent entrer dans la phase d'équilibre. Durant cette phase, les cellules et les molécules de l'immunité adaptative empêchent la croissance tumorale. Ces variantes peuvent éventuellement acquérir d'autres mutations qui ont pour effet d'éviter la reconnaissance, la destruction ou le contrôle des cellules tumorales par les cellules immunitaires et évoluent vers des tumeurs malignes cliniquement détectables en phase d'échappement.

D'après Vesely et al., 2011.

2.2. Acteurs de la réponse immune et cancer

Les interactions entre cellules cancéreuses et système immunitaire jouent un rôle prépondérant dans les réponses anti- comme pro-tumorales. Le contrôle permanent des tissus par le système immunitaire (immunosurveillance), permet la détection et la prise en charge rapide de cellules tumorales via la reconnaissance d'antigènes aberrants, anormalement exprimés à leur surface. L'identification de cellules tumorales initie les réponses immunitaires anti-tumorales via l'entrée en action de cellules cytotoxique. Ces cellules, lymphocytes T cytotoxiques, auxiliaires et cellules NK/NKT, identifient les cellules aberrantes et les lysent. Les acteurs de la réponse immunitaire tels que les macrophages, les cellules dendritiques (CDs), les lymphocytes, les neutrophiles et les cellules NK sont retrouvés aux sites de métastases et sont activement impliqués dans la promotion, voire également dans la suppression, de la dissémination tumorale (Man *et al.*, 2013 ; Smith *et al.*, 2013 ; Kitamura *et al.*, 2015).

Les lymphocytes T et les macrophages associés aux tumeurs ("Tumor-Associated Macrophages" TAMs) sont les cellules de l'immunité majoritairement retrouvées dans le microenvironnement tumoral. Le rôle contrasté de ces cellules dans la réponse anti-tumorale est attribuable à leurs différentes fonctions effectrices mais également aux interactions qu'elles établissent entre elles et le microenvironnement tumoral.

2.2.1. Cellules de l'immunité innée

2.2.1.1. Macrophages

Les macrophages dérivent de la lignée myéloïde et font partie des acteurs majeurs de la réponse immunitaire innée. Ils sont majoritairement localisés aux niveaux de sites les plus exposés aux agressions extérieures (virus, bactéries, parasites, levures).

Les macrophages sont donc retrouvés dans la grande majorité des organes et différentes données ont permis d'établir un lien entre l'hétérogénéité de leurs actions et leur diversité phénotypique (sous-populations supposées) (Gordon et Mantovani, 2011 ; Gorgon *et al.*, 2014). Il apparaît que les macrophages peuvent présenter des phénotypes très différents, voire opposés, en fonction du microenvironnement dans lequel ils évoluent. On retrouve souvent une classification des macrophages activés basés sur leur phénotype tel que le phénotype M1 et le phénotype M2 (Biswas and Mantovani, 2010). En général, les macrophages M1 favorisent la réponse inflammatoire contre les agents pathogènes et les cellules tumorales. Ainsi, durant une infection bactérienne par exemple, les macrophages classiquement activés dans ces conditions présentent des fonctions pro-inflammatoires. Toutefois, sous l'influence d'un microenvironnement cytokinique différent, tel que la présence de cytokines de type Th2 (IL-4 ou IL-13), leurs fonctions s'orientent vers une réponse anti-inflammatoire. Dans ce contexte, ils sont qualifiés de macrophages de type 2 (M2) (Sica *et al.*, 2012). Les macrophages M2 auraient plutôt tendance à exercer une action immunosuppressive, favorisant ainsi la réparation tissulaire et la progression tumorale. Ces deux classes supposées de macrophages se discriminent notamment via l'expression de différents marqueurs, leur métabolisme et leur profil d'expression génique. Ainsi, on identifie les macrophages M1 comme sécrétors de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12, le TNF- α , CXCL10 et l'IFN- γ ainsi que des taux importants d'oxyde nitrique synthase (NOS). A l'opposé, le profil M2 est caractérisé par une sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, l'IL-13 et l'IL-4, la production d'arginase-1, l'expression de récepteurs au mannose (MR, CD206) et « scavenger » (Qian and Pollard, 2010 ; Movahedi *et al.*, 2010).

Dans le contexte tumoral, les macrophages infiltrant portent le nom de « macrophages associés aux tumeurs » ou TAMs (tumor associated macrophages) (Forget *et al.*, 2014 ; Roca *et al.*, 2009) et sont majoritairement associés à un mauvais

pronostic pour les patients (Bingle *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 2005 ; Ryder *et al.*, 2008 ; Zabuawala *et al.*, 2010 ; Medrek *et al.*, 2012 ; Tan *et al.*, 2012 ; Zhang *et al.*, 2012). Dans ce contexte, on retrouve dans la littérature l'appellation de « polarisation des macrophages » afin d'évoquer la mise en place de cette dichotomie de phénotype et de conversion M1 (anti-tumoral) / M2 (pro-tumoral) en réponse à des signaux microenvironnementaux (Mantovani *et al.*, 2002). L'étude de différents modèles tumoraux murins a établi que la présence dans le microenvironnement tumoral de chimiokines telles que CSF-1 (Clonin Stimulation Factor 1), GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulation factor), CCL2 (chemokine ligand 2, MCP1) et le VEGF (vascular endothelial growth factor) est responsable de l'infiltration des tumeurs en macrophages (Chitu *et al.*, 2006 ; Mantovani *et al.*, 2010 ; Hagemann *et al.*, 2006 ; Wyckoff *et al.*, 2004 ; Lin *et al.*, 2001 ; Qian *et al.*, 2011).

Le contrôle de la balance entre développement de macrophages M1 ou M2 ainsi que leurs activités respectives va fortement être modulée par les conditions environnementales des tumeurs. Ainsi, l'IFN- γ et le TNF- α vont plutôt favoriser le développement de macrophage M1. Ces macrophages M1 de par le biais d'une forte sécrétion d'IL-12 et d'une faible production d'IL-10 vont contribuer au contrôle du développement tumoral. A l'opposé, un microenvironnement tumoral riche en IL-4, IL-13, CCL2, CSF-1 et IL-10 va plutôt induire le développement du phénotype M2. L'IL-4 et l'IL-13 produits par les lymphocytes Th2 sont une des causes de la polarisation des TAMs vers un profil M2 (DeNardo, 2009). Ces TAMs M2 présentent une forte sécrétion d'IL-10, de prostaglandine E2 (PGE2), de TGF- β et une faible production d'IL-12. Ce sont ces caractéristiques qui procurent aux TAMs M2 une activité pro-tumorale (Hagemann *et al.*, 2006. Mantovani *et al.*, 2008 ; Solinas *et al.*, 2010 ; Kuang, 2009 ; Torroella-Kouri *et al.*, 2009). Bien que des études en faveur de la conservation de cette dualité de phénotypes et de fonctions aient démontrées une implication des deux profils de macrophages dans un contexte tumoral, certaines études semblent appuyer en faveur de la dominance d'un profil M2 de macrophages associés aux tumeurs (Laoui *et al.*, 2011; Mantovani *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2014 ; Henze and Mazzone, 2016) et d'une issue plus grave de la maladie (Ohtaki *et al.*, 2010; Pollard, 2008). L'expressions de CD68, CD14, HLA-DR et CD204 ont été utilisées pour la classification des macrophages ainsi que d'autres protéines telles que MMP2 / 9, B7-H4, STAT-3, CD163 et CD206 pour la classification des TAM (Sawa-Wejksza and Kandefer-Szerszeń, 2018). Toutefois, il semblerait également judicieux de baser

l'identification des TAMs sur leurs fonctions telles que celles régissant la régulation des processus métastatiques, de l'angiogénèse et immunitaire plus largement.

2.2.1.2. Neutrophiles

Les neutrophiles représentent le sous-type leucocytaire le plus abondant dans la circulation systémique (50%-70% des leucocytes). Ils font partie des acteurs majeurs de la réponse immunitaire innée contre les infections et sont largement impliqués dans les processus inflammatoires (Sionov *et al.*, 2015). A l'instar des macrophages, les neutrophiles associés aux tumeurs ou TANs (tumor associated neutrophils) présentent deux phénotypes différents. Ces deux phénotypes, N1 et N2, sont caractérisés par des effets ambivalents sur la croissance tumorale. Les TANs N1 sont considérés comme anti-tumoraux alors que les TANs N2 présentent une activité pro-tumorale. Les TANs N2 exercent leurs effets notamment *via* la surexpression de carcinogènes, de facteurs pro-angiogéniques et de facteurs immunosuppresseurs tels que CXCR4, le VEGF et la MMP-9 (Matrix metallopeptidase 9) (Mishalian *et al.*, 2013).

2.2.1.3. Cellules myéloïdes suppressives (MDSC)

Les cellules myéloïdes suppressives ou MDSCs (myeloid derived suppressors cells) constituent une population hétérogène de progéniteurs myéloïdes tels que les granulocytes immatures, les macrophages immatures et les CD⁺ immatures (Dolcetti *et al.*, 2010 ; Geissmann *et al.*, 2003 ; Röbner *et al.*, 2005). On décrit deux sous-populations de MDSC sur les bases de leur origine et de l'expression de certains marqueurs membranaires. Ainsi on distingue les MDSCs granulocytaires ou g-MDSCs (CD11b^{hi} Ly6G^{hi} Ly6C^{low} CD49^{d^{low}}) et les MDSCs monocytaires ou Mo-MDSCs (CD11b^{hi} Ly6G^{low} Ly6C^{hi} CD49^{d^{hi}}). Ces deux sous types de MDSCs sont recrutés au niveau tumoral *via* l'action de facteur pro-inflammatoire (GM-CSF, G-CSF et IL-6) (Marigo *et al.*, 2010) mais leur proportion est dépendante de la nature de la tumeur considérée (Umemura *et al.*, 2008 ; Lindau *et al.*, 2013). Globalement, les MDSCs sont associés à la promotion et l'entretien de la croissance tumorale notamment *via* leur actions immunosuppresseurs (Waight *et al.*, 2013).

2.2.1.4. Mastocytes

Les mastocytes sont des cellules immunitaires granulocytaires et impliquées dans les réactions immunitaires innées. Elles présentent des rôles multiples dans la progression et l'inhibition du développement tumoral. Cette pluralité d'action est due à leur plasticité. En effet, sous l'influence du microenvironnement tumoral, elles peuvent diriger leur polarisation vers un phénotype aux propriétés pro- ou anti-tumorales (Rigoni *et al.*, 2015). Au niveau tumoral, l'histamine produite par les mastocytes favorise à la fois la polarisation Th2 et le recrutement de lymphocytes Tregs. Cette double action sur les lymphocytes T CD4⁺ installe un contexte immunosuppresseur et entretient le développement tumoral (Rigoni *et al.*, 2015). Dans le cancer du côlon, le recrutement des TAMs par les mastocytes promeut l'invasion tumorale notamment via l'activation des voies de signalisation PI3K/AKT (Khan *et al.*, 2013). Ainsi, on s'aperçoit que l'impact des mastocytes sur le développement tumoral passe par la modulation du microenvironnement via son action sur l'infiltrat immunitaire. Ces propriétés font des mastocytes une cible potentielle des stratégies thérapeutiques anti-tumorales.

2.2.1.5. Cellules dendritiques (CDs)

Les cellules dendritiques (CDs) sont cellules présentatrices d'antigènes professionnels. Elles sont classiquement divisées en deux sous-populations majoritaires : les CDs plasmacytoïdes (plasmacytoid dendritic cells, pDCs) et les CDs conventionnelles (conventional dendritic cells, cDCs) (Villadangos *et al.*, 2007). Appartenant à la composante innée du système immunitaire, ces cellules permettent l'activation d'acteurs de la réponse adaptative. Ainsi, selon la nature des antigènes présentés, les lymphocytes CD8 (protéines virales/antigènes intracellulaires/CMH-I) ou CD4 (bactéries, toxines/antigènes extracellulaires/CHM-II) seront activés. Toutefois, les CDs possèdent également la capacité de « cross-présentation ». Ainsi, dans le contexte tumoral, les CDs peuvent activer les CD8 via la présentation d'antigènes tumoraux extracellulaires. Cette capacité est indispensable pour l'élimination des cellules cancéreuses et limiter leur développement.

2.2.1.6. Cellules lymphoïdes innées (ILC)

Les cellules lymphoïdes innées (innate lymphoid cells, ILCs) représentent une population de cellules immunitaires décrite assez récemment (Cella *et al.*, 2009 ; Cupedo *et al.*, 2009 ; Luci *et al.*, 2009 ; Sanos *et al.*, 2009 ; Neill *et al.*, 2010 ; Price *et al.*, 2010 ; Saenz *et al.*, 2010; Satoh-Takayama *et al.*, 2010). Ces cellules sont décrites comme faisant partie des premiers acteurs de la réponse immunitaire innée mise en place suite aux agressions subis par l'organisme. Ces agressions pouvant être d'origine virale, bactérienne, parasitaire ou cancéreuse. Elles sont également décrites comme acteurs du développement de nombreuses pathologies inflammatoires.

Trois classes principales d'ILCs ont initialement été identifiées sur la base de parallèles fonctionnels avec certaines sous-populations de lymphocytes T auxiliaires connus (Spits et Di Santo, 2011). Ainsi, on note l'expression de facteurs de transcription distincts, régulateurs clés des différents profils observés ainsi qu'une signature cytokinique propre à chaque classe. Une nomenclature a rapidement émergé (Spits *et al.*, 2013): on retrouve ainsi les ILCs du groupe 1 ou ILC1 présentant des caractéristiques communes aux Th1 à savoir, l'expression de *Tbx21* (codant pour Tbet) et la production d'IFN- γ (Bernink *et al.*, 2013 ; Vonarbourg *et al.*, 2010). On discrimine également les ILCs du groupe 2 ou ILC2 aux caractéristiques similaires à celles des Th2 telles que l'expression de GATA3 et une signature cytokinique caractérisée par la production d'interleukines 4, 5 et 13 (IL-4, -5 et -13) (Mjösberg *et al.*, 2011 ; Moro *et al.*, 2010 ; Neill *et al.*, 2010 ; Price *et al.*, 2010). Enfin on identifie un troisième groupe d'ILCs ou ILC3 regroupant les ILCs exprimant *Rorc* (codant pour ROR γ t) et produisant de l'IL-17A et de l'IL-22, représentant le pendant inné des Th17/Th22 (Cella *et al.*, 2009 ; Cupedo *et al.*, 2009 ; Sanos *et al.*, 2009 ; Satoh-Takayama *et al.*, 2008). Sur la base de leur phénotype membranaire, on discrimine de ce dernier groupe deux sous-classes d'ILC3 (Melo-Gonzalez and Hepworth, 2017) : les ILC3 LTi-like (NKP46⁻, IL-7Ra⁺, IL-23⁺, CCR6^{+/-}), le pendant adulte des LTI (Lymphoid tissue inducer cells) essentiellement retrouvés durant les premiers stades de la vie (fœtus) et jouant un rôle central dans l'organogenèse lymphoïde (Eberl *et al.*, 2004) ainsi que les ILC3 NKP46^{+/-}, IL-7Ra⁺, IL-23⁺, CD49 α ⁻, CCR6^{+/-} CHM-II (Luci *et al.*, 2009; Sanos *et al.*, 2009; Satoh-Takayama *et al.*, 2008). La comparaison de ces sous-populations d'ILCs avec les cellules NK conventionnelles (cNK) laisse apparaître des similitudes développementales ainsi que des fonctions effectrices similaires, plaçant les cellules NK et les ILCs ensemble comme

une famille à part entière d'effecteurs cellulaires innés. Néanmoins, plusieurs propriétés des cellules cNK les distinguent des autres sous-ensembles d'ILCs (Daussy *et al.*, 2014, Klose *et al.*, 2014, Robinette *et al.*, 2015) et suggèrent plutôt une distinction entre les ILCs dit « auxiliaires » (ILC1, ILC2s et ILC3s) et ILCs dit « cytotoxiques » (cellules NK) similaires à celle existant entre lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ cytotoxiques (Artis et Spits, 2015). L'identification récente d'une classe potentielles d'ILC régulatrices productrices d'IL-10 (Wang *et al.*, 2017) vient agrémenter la classification des ILCs (Gabryšová *et al.*, 2018).

A l'instar des lymphocytes T CD4⁺, le rôle des ILCs dans la réponse immunitaire anti-tumorale est ambigu. En effet, ces cellules peuvent avoir des effets à la fois pro- et anti-tumoraux en fonction des cytokines et des chimiokines auxquelles elles sont exposées ou des cellules avec lesquelles elles interagissent. De plus, il est difficile d'attribuer de manière précise un rôle spécifique à un sous-type donné, compte tenu de leurs différences de plasticité et de phénotype (Bruchard and Ghiringhelli, 2019).

2.2.1.7. Cellules NK

Les cellules NK, cellules effectrices de l'immunité innée, possèdent une activité cytolytique rapidement sollicitée lors d'infections ou dans l'élimination de cellules aberrantes/transformées/stressées (Cerwenka and Lanier, 2016, Bruno *et al.*, 2014). Dans le contexte tumoral, les récepteurs inhibiteurs des NK sont impliqués dans la reconnaissance et à l'élimination des cellules tumorales dont l'expression du CMH-I fait défaut (Marcus *et al.*, 2014). A l'opposé, dans les cellules saines, la reconnaissance du CMH-I par les NK inhibe leur activité (Bix *et al.*, 1991 ; Liao *et al.*, 1991 ; Colonna *et al.*, 1992 ; Karlhofer *et al.*, 1992 ; Wagtmann *et al.*, 1995 ; Lanier, 2005).

Il a été observé que l'infiltration de cellules NK dans les tumeurs colorectales (Coca *et al.*, 1997) et gastriques (Ishigami *et al.*, 2000) est associé à un bon pronostic vital (Burke *et al.*, 2010 ; Larsen *et al.*, 2014). Après activation, les cellules NK exercent leur fonction cytolytique *via* la sécrétion de granzyme B et de perforin (Voskoboinik *et al.*, 2006). La lyse des cellules tumorales gouvernée par les NK passe également par la sécrétion de TNF- α ou un contact intercellulaire direct. Dans ce dernier mécanisme d'action, les NK déclenchent l'apoptose des cellules cancéreuses *via* l'engagement de son récepteur TRAIL (Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand) dans la liaison avec FAS ligand (FASL) exprimé à la surface des cellules tumorales. De plus, il a été observé

que la production d'IL-15 par les cellules tumorales induit le recrutement de cellules NK. Ce recrutement permet ainsi l'élimination des tumeurs (Liu *et al.*, 2012). Les récepteurs cytotoxiques NKp46 et inhibiteurs Ly9 exprimés par les cellules NK sont impliqués dans le contrôle des processus métastatiques dans des modèles de mélanomes, de cancer pulmonaire et de fibrosarcome (Andrews *et al.*, 2012 ; Glasner *et al.*, 2012).

2.2.2. Cellules de l'immunité adaptative

De nombreux travaux rapportent, à la fin des années 1970, la présence de lymphocytes T et B infiltrant les tumeurs (Richters *et al.*, 1975 ; Brubaker *et al.*, 1977 ; Yron *et al.*, 1980). Les observations réalisées à cette époque (fin des années 1970 - première moitié des années 1980) révèlent une action contrastée des lymphocytes T infiltrant les tumeurs (Tumor Infiltrating Lymphocytes ou TILs). Il apparaît que les TILs peuvent aussi bien présenter des propriétés cytotoxiques vis-à-vis des cellules tumorales (Vose *et al.*, 1977 ; Brunner *et al.*, 1981) comme des propriétés immunosuppressives (Vose *et al.*, 1985). De manière très intéressante, une analyse comparative a rapporté que les TILs présentent une activité cytotoxique atténuée comparativement aux lymphocytes T retrouvés à distance des sites tumoraux (Chiou *et al.*, 2005). Ces données font donc état d'un certain environnement atténuateur quant aux fonctions cytotoxiques de ces cellules. L'état global d'immunosuppression de souris porteuses de tumeurs est à l'origine de ces observations (Zolla *et al.*, 1972). Ce n'est que plusieurs années après ces constats qu'il a été reconnu que le microenvironnement tumoral exerce une action suppressive sur le système immunitaire, en partie responsable de l'échappement des cellules tumorales au contrôle du système immunitaire (Fisher *et al.*, 2000 ; Drake *et al.*, 2006 ; Gajewski *et al.*, 2006).

Malgré cette prise de conscience vis-à-vis de la manipulation par le microenvironnement tumoral des fonctions des cellules immunitaires infiltrantes, les expériences menées par Rosenberg et collègues dans les années 1980 ouvrent la porte à d'autres interrogations. En effet, par le biais de transferts adoptifs de TILs, ils observent un regain d'efficacité des réponses anti-tumorales chez les patients souffrant de mélanome, cancer du rein et autres adénocarcinomes (Rosenberg *et al.*, 1986).

Les lymphocytes T constituent un des types cellulaires immunitaires majoritairement représenté dans le microenvironnement tumoral. En effet, ils représentent environ 10% de l'ensemble des cellules infiltrant les tumeurs (Balkwill *et al.*, 2012). Ces cellules sont retrouvées à la fois dans la tumeur mais également en périphérie. Les deux principales classes de lymphocytes T, les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques et les lymphocytes T CD4⁺ opèrent de concert dans un certain nombre de cancers mais présentent des actions bien distinctes (Huang *et al.*, 2015).

2.2.2.1. Lymphocytes B

Après activation dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes, les lymphocytes B de haute affinité se développent en lymphocytes B mémoires et plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines (Ig) spécifiques de l'agression subie par l'organisme (De Silva and Klein 2015). Bien que la présence de lymphocytes B dans le microenvironnement tumoral (Tumor-infiltrating B lymphocytes ou TIB) ait été décrit dans différents types de cancers (mélanome, cancer du sein, cancer de l'ovaire et cancer de la prostate notamment) (Chin *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 2013; Woo *et al.*, 2014; Pylayeva-Gupta *et al.*, 2016), le rôle de ces cellules dans les mécanismes de progression tumorale est moins bien décrit et compris que celui des lymphocytes T. Certaines preuves démontrent que les TIBs inhibent la progression tumorale *via* leur production d'immunoglobulines, en favorisant la réponse des lymphocytes T et en tuant directement les cellules cancéreuses (Wang *et al.*, 2018). Les TIBs jouent également un rôle dans le maintien de l'intégrité et de la fonction des structures lymphoïdes tertiaires (Tertiary lymphoid structures ou TLS). Les TLS sont des agrégats lymphoïdes ectopiques transitoires structurellement et fonctionnellement proches des organes lymphoïdes secondaires (Secondary lymphoid organs ou SLO) (Pitzalis *et al.*, 2014). Ces structures sont constituées de zones riches en lymphocytes T et B, sites de leur différenciation en cellules effectrices et mémoires (Germain *et al.*, 2014). La présence de TLS au niveau tumoral permet notamment l'infiltration de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) dans la tumeur (Germain *et al.*, 2014), contribuant ainsi à de puissantes réponses anti-tumorales et à de meilleurs pronostics pour les patients (Pitzalis *et al.*, 2014 ; Zhu *et al.*, 2015).

Des preuves montrent que les sous-populations distinctes de cellules B présentes dans le TME possèdent des rôles différents. Premièrement, il a été démontré dans le cas de

cancer gastrique que les TIBs produisaient des anticorps fonctionnels dotés de propriétés de suppression de la croissance tumorale. Dans ce contexte, une prédominance isotypique IgG a été observé dans les tissus cancéreux gastriques comparativement à la dominance de cellules B sécrétrices d'IgA au sein de la muqueuse gastrique normale (Kato *et al.*, 2017). Des réponses humorales impliquant les TIBs peuvent également être générées au sein de TLS dans des cas de cancer pulmonaire (Germain *et al.*, 2014) et du sein (Nzula *et al.*, 2003). Il apparaît également que les immunoglobulines sécrétées par les lymphocytes B peuvent induire une lyse tumorale par cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) ou cytotoxicité dépendante du complément (CDC) (Mizukami *et al.*, 2007). Deuxièmement, via leur rôle de CPAs, les lymphocytes B facilitent les réponses T dépendantes au sein du TME. Dans le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC), un nombre élevé de lymphocytes T co-localisés avec un nombre élevé de cellules B est associé à un bon pronostic (Kinoshita *et al.* 2016). Troisièmement, les cellules B activées peuvent lyser directement les cellules tumorales avec l'activité des CTL (Shi *et al.* 2013).

D'autre part, les cellules B sont également connues pour induire une progression tumorale. Dans des modèles murins de mélanome dépourvus de lymphocytes B, l'activité anti-tumorale des CTLs et l'efficacité du vaccin anticancéreux ont été augmentées (Inoue *et al.*, 2006). Une étude a montré qu'après injection, les lymphocytes B s'accumulaient au niveau des ganglions lymphatiques régionaux de souris atteintes de mélanome et favorisaient la progression tumorale (Ganti *et al.*, 2015). Il a également été démontré que les cellules B inhibaient directement les réponses des CTLs dans des modèles murins de mélanomes (DeNardo *et al.*, 2010). Toutefois, les preuves grandissantes d'une sous-population de lymphocytes B, les lymphocytes B régulateurs (Bregs) seraient responsables de leur activité pro-tumorale notamment par le biais de facteurs immunosuppresseurs, tels que l'IL-10 (Schioppa *et al.*, 2011 ; Horikawa *et al.*, 2011) et le TGF- β (Olkhanud *et al.* 2011). Cette capacité de suppression de l'immunité tumorale (Zhang *et al.*, 2016) nécessiterait des signaux des récepteurs de type Toll (TLR), CD40 et du BCR (Matsumoto *et al.*, 2011). Dans un modèle murin de carcinogenèse épithéliale, il a été démontré que l'absence de lymphocytes B matures ralentit la croissance tumorale (de Visser *et al.*, 2005). De plus, le transfert adoptif de lymphocytes B restaure les processus d'inflammation chronique, d'angiogenèse et de croissance tumorale. Différents mécanismes ont été décrit afin d'expliquer le rôle pro-tumoral des lymphocytes B. En plus de l'IL-10 et du TGF- β , cette

action immunosuppressive passerait également par la stimulation de la prolifération tumorale via la production d'IL-35 (Pylayeva-Gupta *et al.*, 2016). La présence d'Ig dans le microenvironnement tumoral permet également aux lymphocytes B d'activer indirectement certaines cellules myéloïdes exprimant des récepteurs spécifiques des parties constantes (Fc) des Ig (FcRγ) (Andreu *et al.*, 2010). Ces cellules sont impliquées dans les mécanismes d'angiogenèse et d'inflammation chroniques soutenant la croissance tumorale. Dans les carcinomes épidermoïdes cutanés (SCC) et un type d'adénocarcinome pancréatique (PDAC), les Bregs induiraient une polarisation des macrophages vers un phénotype M2 (Affra *et al.*, 2014 ; Gunderson *et al.*, 2016), ainsi que des cellules Tregs (Olkhanud *et al.*, 2011), qui favorisant la suppression des CTLs.

Les lymphocytes B sont les principales cellules effectrices de l'immunité humorale. Dans ce contexte, d'autres cellules de l'immunité adaptatives, les lymphocytes T folliculaires helper ou Tfh contrôlent la maturation et l'activation des cellules B (cf. section dédiée). Dans les organes lymphoïdes secondaires (Secondary lymphoid organs ou SLOs), après interaction avec les Tfh, les lymphocytes B se différencient en plasmocytes à courte durée de vie dans des zones B ou en cellules B mémoires et en plasmocytes long survivant au niveau des centres germinatifs (GCs) (voir section consacrée à la polarisation Tfh). De plus, il apparaît que la production de CXCL13 par les cellules Tfh et les CD folliculaires est responsable de l'afflux de lymphocytes B dans le TME (Wang *et al.*, 2018). Ainsi, les lymphocytes B et Tfh peuvent s'infiltrer dans les tumeurs et les cellules B affecter la progression tumorale via leur interaction avec les Tfh (Kobayashi *et al.*, 2016). Une relation existe entre l'état d'expression des profils B / Tfh et le devenir du patient. Ainsi, chez les patients atteints de carcinome colorectal (CCR), une étude a rapporté que le nombre de cellules B et de Tfh dans le TME augmentait avec le stade tumoral. Toutefois, les auteurs associent un meilleur pronostic à une forte proportion de ces types cellulaires. De plus, les patients présentant un défaut de CXCL13 ou une faible expression de cette même chimiokine présentaient une densité plus faible de lymphocytes B, de Tfh, de Th1 et de CTL couplée à un moins bon pronostic (Bindea *et al.*, 2013). Dans le cancer du poumon, les plasmocytes infiltrant les tumeurs et les lymphocytes Tfh sont associés à de meilleurs résultats (Germain *et al.*, 2014). Les réponses des cellules B et Tfh peuvent être modulées en fonction des types de cancer, de l'état de progression du cancer et du TME.

Toutefois, la manière dont les différents phénotypes de lymphocytes B coexistent dans le microenvironnement tumoral ou comment ils sont recrutés en tant qu'acteurs

immunosuppresseurs ou la manière dont ils sont reprogrammés dans le microenvironnement reste encore flou. Par conséquent, l'immunothérapie à base de cellules B nécessite une meilleure compréhension de la caractérisation immunophénotypique de ces sous-populations.

2.2.2.2. Lymphocytes T CD8⁺

L'infiltration du microenvironnement tumoral par les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTLs) est fortement associée à un bon pronostic vital et une meilleure survie sans récurrence pour les patients souffrants de divers cancers tels que les cancers du poumon, du sein, de la prostate, du colon, de la tête et du cou, le mélanome, de l'ovaire, de la vessie, du rein, du pancréas et de foie (Fridman *et al.*, 2012). Dans ce contexte, les CTLs possèdent la capacité de reconnaître spécifiquement les antigènes tumoraux néosynthétisés (néoantigènes) portés par les cellules cancéreuses et de diriger leur action cytolytique contre ces cellules afin de maîtriser la croissance tumorale. A l'instar de la reconnaissance antigénique dans le cas d'infection virale, les CTLs ont la capacité d'agir directement et spécifiquement sur leurs cibles tumorales sans l'aide des lymphocytes T CD4⁺ (Zhang *et al.*, 2011).

La présence de ces CTLs antigène réactif et infiltrant la tumeur est positivement corrélée à la survie à long terme du patient atteint de carcinome pulmonaire. De manière plus globale, une proportion élevée de CTLs au sein du microenvironnement tumoral apparaît être de bon pronostic pour les patients atteints de carcinome pulmonaire (Mackensen *et al.*, 1993 ; Mami-Chouaib *et al.*, 2002 ; Ito *et al.*, 2005 ; Al-Shibli *et al.*, 2008 ; Dieu-Nosjean *et al.*, 2008). Dans le cas du cancer de la vessie, un taux élevé de CTLs est également associé à un bon pronostic pour la survie des patients (Fluxa *et al.*, 2018). De manière très intéressante, pour les patients atteints par ce type de cancer, le ratio entre CTLs et Treg en faveur des CTLs offrent de meilleures réponses cliniques quant à l'utilisation de néo-adjuvant chimiothérapeutiques tel que les cisplatine (Fluxa *et al.*, 2018 ; Baras *et al.*, 2016). Ainsi, la mesure de ce ratio peut être utilisée de manière prédictive quant à l'efficacité des traitements employant des néo-adjuvants et aider ainsi au contrôle de la maladie dans les stades avancés. Des observations similaires ont été réalisées dans des cas de cancers ovariens. Ainsi, un taux intraépithélial élevé de CTLs est associé à une meilleure survie des patientes comparativement à celles présentant un taux faible. De la même manière, le ratio

CTL/Treg détermine la valeur du pronostic (Sato *et al.*, 2005). Ainsi, appuyées par un grand nombre de preuves supplémentaires, ces études mettent en évidence que de manière globale, la proportion en lymphocytes T CD8⁺ dans le TME est inversement corrélée à la progression tumorale (Galon *et al.*, 2006 ; Sinicrope *et al.*, 2009 ; Pagès *et al.*, 2009 ; Mlecnik *et al.*, 2011). S'ajoutant aux données relatives au mélanome, au carcinome pulmonaire, au cancer de la tête et de cou, au cancer de la vessie et au cancer des ovaires présentées précédemment, un constat similaire a été obtenu concernant le cancer du sein (Mahmoud *et al.*, 2011 ; Liu *et al.*, 2017 ; de Melo *et al.*, 2017), le cancer urothélial (Sharma *et al.*, 2007), le cancer de l'œsophage (Schumacher *et al.*, 2001 ; Cho *et al.*, 2003), le cancer de la prostate (Vesalainen *et al.*, 1990 ; Kärjälä *et al.*, 2005), le carcinome hépatocellulaire (Wada *et al.*, 1998 ; Huang *et al.*, 2007), le cancer du pancréas (Fukunga *et al.*, 2004 ; Lu *et al.*, 2017) et le cancer du rein (Nakano *et al.*, 2001). De la même manière, dans les hémopathies malignes telle que la leucémie aigüe myéloïde, le taux de CTLs spécifiques des antigènes tumoraux présente une capacité de reconnaissance et d'éradication des cellules tumorales (Deng *et al.*, 2017).

Pour conclure, la grande majorité des données obtenues concernant les CTLs tumoraux convergent vers la preuve que ces cellules sont majoritairement associées à un pronostic favorable pour les patients atteints de divers cancers

2.2.2.3. Lymphocytes T CD4⁺

a. Les Th1

Les Th1 sont, avec les Th2, les premiers sous-types de lymphocytes T CD4⁺ à avoir été identifiées en 1986 par Mosmann et Coffman (Mosmann *et al.*, 1986). L'interleukine-12 (**IL-12**) et l'interféron- γ (**IFN- γ**) sont nécessaires à l'initiation de leur différenciation (Trinchieri *et al.*, 2003). Le facteur majeur de transcription caractéristique de ce sous-type lymphocytaire est le T-box transcription factor (**T-bet**). Il induit l'activation de gènes clés de la différenciation Th1 (IFN- γ et IL-12R notamment) mais réprime également le développement d'autres sous-types tels les Th2 et Th17 (Afkarian *et al.*, 2002; Lugo-Villarino *et al.*, 2003; Lazarevic *et al.*, 2011). Les lymphocytes Th1 sont impliqués dans les réponses immunes à **médiation cellulaire** dirigées contre des pathogènes intracellulaires (virus, antigènes de tumeurs, etc.) (del Prete, 1992). Ils

exercent une action indirecte, en ce sens où elle s'effectue principalement via l'aide qu'ils apportent aux autres effecteurs de la réponse immune. En effet, l'**IFN- γ** , la **lymphotoxin- α** et l'**IL-2** qu'ils sécrètent permettent l'activation des phagocytes mononucléaires (Murray *et al.*, 1985) et la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (Gattinoni *et al.*, 2005).

Grâce à leurs fonctions intrinsèques, les Th1 sont considérés de manière globale comme favorables à la mise en place d'une réponse immune anti-tumorale (Fridman *et al.*, 2012). En effet, une proportion élevée de Th1 au sein du microenvironnement tumoral est associée à un bon pronostic clinique pour de nombreux type de cancer tels que dans le mélanome, le carcinome laryngé, le cancer du sein, le cancer colorectal, le cancer des ovaires et dans le cancer cérébral (Fridman *et al.*, 2012 ; Galon *et al.*, 2006 ; Sharma *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2003 ; Sasaki *et al.*, 2009 ; Xu *et al.*, 2016 ; Hoepner *et al.*, 2013).

b. Les Th2

Les cytokines **IL-4** et **IL-2** sont responsables de l'induction de la différenciation Th2. Ces cellules sont caractérisées par l'expression du facteur majeur de transcription **GATA3** (GATA-binding protein 3), également impliqué dans la répression de la différenciation Th1 (Zhu *et al.*, 2006). Ces cellules sont également caractérisées par l'expression des marqueurs membranaires **CCR3** (récepteur des chimiokines CCL11, CCL26, CCL7, CCL13 et CCL5), **CCR4** (récepteur des chimiokines CCL17 et CCL22) et **CRTH2** (récepteur de la Prostaglandine D2). Leurs cytokines signatures portant leurs actions effectrices sont l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13 (Tsuda *et al.*, 2001; Zhu and Paul, 2010). Le rôle des Th2 s'inscrit dans une réponse immune à **médiation humorale** dirigée contre des pathogènes extracellulaires (bactéries, toxines) (del Prete, 1992 ; Steinke and Borish, 2001). Ils contrôlent la différenciation des lymphocytes B et la production d'anticorps dans ces conditions.

A l'image de la majorité des lymphocytes T auxiliaires, les Th2 n'exercent pas leurs fonctions effectrices directement. En effet, l'action de ces cellules est principalement due à l'activation d'autres types cellulaires immunitaires (éosinophiles, macrophages) (Anthony *et al.*, 2006 ; Lorvik *et al.*, 2016). Cette fonction leur est apportée via le panel de cytokines effectrices qu'ils sécrètent. De ce fait, il a été suggéré par plusieurs

équipes, que ces cytokines Th2 sont notamment liées à la suppression des réponses anti-tumorales (Kusuda *et al.*, 2005 ; Ubukata *et al.*, 2010). Une des données qui justifie ce rôle est l'action inhibitrice de l'IL-10 sécrétée par les Th2 sur l'intégration et la présentation des antigènes par les CD8 et/ou l'activation des lymphocytes Tregs immunosuppresseurs (Ellyard *et al.*, 2007).

Cependant, le rôle des Th2 dans le développement tumoral reste encore contrasté. Sur la base de l'expression de GATA3 (cancer du sein) (Yoon *et al.*, 2010), de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 (cancer colorectal) (Tosolini *et al.*, 2011), de la production d'IL-2, d'IL-4, de TGF- β et de TNF- α comparativement aux cellules sécrétrices d'IFN- γ et de GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) (cancer du sein) (Camp *et al.*, 1996), de l'injection d'IL-4 dans un modèle d'adénocarcinome murin (Modesti *et al.*, 1993) ainsi que sur l'unique marquage histochimique de cellules c-Maf⁺ considérées comme Th2 (lymphome de Hodgkin) (Schreck *et al.*, 2009) des études tendent ainsi à démontrer la fonction anti-tumorale des Th2, malgré l'hétérogénéité dans la caractérisation du phénotype. Néanmoins, la cytokine signature des Th2, l'IL-4, jouerait un rôle dans l'élimination tumorale notamment *via* le recrutement des éosinophiles et des macrophages au site de la tumeur (Tepper *et al.*, 1992). Dans des cas de leucémie lymphoïde chronique, il apparaît que la proportion de Th2 accompagne l'état de progression de la maladie. En effet, un taux important de Th2 est retrouvé chez les patients pour qui la maladie ne progresse pas (Palma *et al.*, 2017). Une autre étude rapporte, sur la base de la sécrétion cytokinique, un taux élevé d'IL-4 produite par les lymphocytes T CD4⁺ perforin⁺ dans la progression de la leucémie lymphoïde chronique (Porakishvili *et al.*, 2001).

Dans l'optique d'éclaircir l'impact (bon ou délétère) au niveau tumoral de l'inflammation induite par les Th2, une équipe a évalué chez 69 patients atteints de cancer pancréatique la contribution des Th2 dans la progression tumorale. Pour se faire, les auteurs ont mesuré le ratio cellulaire GATA3⁺ (Th2)/ T-bet⁺ (Th1) infiltrant les tumeurs. Il en résulte qu'une prédominance de lymphocyte Th2 est associée à une faible survie. Les auteurs décrivent un mécanisme orchestré par les fibroblastes associés aux tumeurs (CAFs). Les CAFs, après stimulation par le TNF- α et l'IL-1 β , sécrètent de la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP) qui conditionne les cellules dendritiques myéloïdes à « booster » la polarisation Th2. En effet, la mise en place d'un contexte inflammatoire TSLP/Th2 dépendant est fortement associée à la réduction de la survie chez ces patients atteints de cancer du pancréas (De Monte *et al.*, 2011).

Ainsi, l'inhibition de la production ou de l'action de la TSLP produite par les CAFs, pourrait être une aide intéressante à la prise en charge et à l'amélioration du pronostic clinique des patients souffrant de cancer pancréatique. De plus, les cytokines IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13 sécrétées par les Th2 semblent jouer un rôle important dans la phase d'échappement des tumeurs à la surveillance par le système immunitaire (Burkholder *et al.*, 2014 ; Tasumi *et al.*, 2002).

Toutefois, dans un modèle murin de sarcome à cellules réticulaires (lignée cellulaire murine A-20), les Th2 spécifiques de la tumeur peuvent induire une réponse immunitaire anti-tumorale notamment *via* leur sécrétion d'IL-4. Ici, l'IL-4 qu'ils produisent active les cellules NK et leurs fonctions cytotoxiques *via* la sécrétion et l'action de la perforine et du granzyme B sur les cellules tumorales (Kitajima *et al.* 2011). Une autre équipe montre que dans un modèle murin de cancer colorectal, les Th2 spécifiques de la tumeur sont responsable de la régression tumorale (Liu *et al.*, 2015). Ces données sont étayées par d'autres observations montrant que l'IL-4, dans un modèle de mélanome murin (lignée murine B16F10), est responsable de la conversion des lymphocytes Tregs en lymphocytes T CD4⁺ producteurs d'IL-9 (Th9) présentant une action anti-tumorale (Cf. paragraphe consacré aux Th9) (Purwar *et al.*, 2012).

c. Les Th17

L'**IL-6**, l'**IL-21**, l'**IL-23** et le **TGF- β** induisent la différenciation Th17. Le retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma-T (**ROR γ T**), la sécrétion d'**IL-17A**, d'**IL-17F**, d'**IL-21** et d'**IL-22** (Martin *et al.*, 2012 ; Ivanov *et al.*, 2006) et l'expression membranaire du récepteur **CCR6** (ligand : CCL20) caractérisent ce sous-type de lymphocytes T CD4⁺. Bien que l'IL-17 soit connue depuis plusieurs années, c'est assez récemment que ces cellules ont été identifiées (Weaver *et al.*, 2006). L'implication des Th17 dans la réponse immunitaire se caractérise par une action dirigée contre les bactéries extracellulaires et les champignons. Ils recrutent et activent des polynucléaires neutrophiles. Ils sont également impliqués dans le développement de maladies auto-immunes ainsi que dans l'immunosuppression tumorale (Annunziato *et al.*, 2007 ; Weaver *et al.*, 2006).

Selon la nature du cancer considéré, les Th17 présentent des rôles anti-ou pro-tumoraux. Un rôle anti-tumoral a été observé dans le cas de carcinomes ovariens où la stimulation des Th17 via l'IL-1 β sécrété par les TAMs stimule l'enrichissement dans le microenvironnement tumoral en CXCL9 et CXCL10 permettant ainsi le recrutement des CTLs (Kryczek *et al.*, 2009). Le rôle pro-tumoral des Th17 a été décrit dans des cas de cancer du poumon non à petites cellules (non small cells lung cancer, NSCLC), de carcinome colorectal, de carcinome hépatocellulaire et de cancer du sein. Pour aller plus loin dans la compréhension de l'action des Th17 en contexte tumoral, une étude démontre l'existence de phénotypes Th17 ambivalents dont le développement est fortement influencé par le microenvironnement. En effet, dans un modèle de glioblastome murin, des données montrent un enrichissement splénique en lymphocytes Tregs et de Th17 sécréteurs d'IL-10, comparativement aux souris naïves. Toujours dans ce modèle, d'autres données laissent apparaître que l'inhibition de l'action des Treg favorise le développement du phénotype Th17 anti-tumoral IL-17/IFN- γ comparativement au phénotype IL-17/IL-10 (pro-tumoral). Cette étude suggère donc que la polarisation Th17 dans le glioblastome peut être influencée par les lymphocytes Treg permettant la mise en place d'un microenvironnement immunosuppresseur, soutenant la croissance tumorale (Cantini *et al.*, 2011). Un des facteurs immunosuppresseur intratumoral le plus représenté est le TGF- β . Sa source cellulaire est multiple : cellules tumorales, fibroblastes, CD8, MDSC, TAM2, Treg (Hasmim *et al.*, 2015). Dans ce contexte, les auteurs démontrent également que le TGF- β a une influence sur le développement des phénotypes Th17.

Pour conclure, il semblerait que les lymphocytes Th17 jouent un rôle contrasté dans la réponse immunitaire anti-tumorale. Cette réponse est fortement influencée par la composition du microenvironnement dans lequel ils évoluent. Il apparaît que les Th17 peuvent exposer un profil génétique et sécrétoire pro-Th1 (Roryt/IL-17/**T-bet/IFN- γ**) (Lee *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014) ou pro-Treg (Roryt/IL-17/**Foxp3/IL-10**) (Norton *et al.*, 2015). Respectivement, ces deux phénotypes seront engagés dans la mise en place d'une réponse immune anti- ou pro-tumorale. Ainsi, une meilleure compréhension de la polarisation et de l'action de ces cellules en conditions tumorales fait partie des clés nécessaires à l'optimisation des immunothérapies anticancéreuse.

d. Les Treg

Les lymphocytes T régulateurs représentent une sous-population de lymphocytes T CD4 caractérisés par une forte expression de la sous-unité alpha du récepteur à l'IL-2 (IL-2Ra ou CD25) ainsi que leur habilité à contrôler les réponses autoimmunes (Sakaguchi *et al.*, 1982 et 1995 ; Bonomo *et al.*, 1995 ; Asano *et al.*, 1996 ; Saoudi *et al.*, 1996). Ils sont définis par l'expression du facteur de transcription **Foxp3** (Forkhead box P3) induit par le **TGF- β** . Deux types majeurs de Tregs sont décrits : les Treg induits (**iTeg**) et les Treg naturels (**nTreg**). Ces derniers diffèrent des iTreg par le fait qu'ils sortent du thymus, différenciés et exprimant naturellement leur facteur majeur de transcription FoxP3. Ce type cellulaire joue un rôle important dans le maintien de la tolérance immunitaire (Sakaguchi *et al.*, 2006). En effet, par l'action des cytokines qu'ils produisent (IL-10, IL-35 et TGF- β) ils suppriment les réponses pro-inflammatoires et limitent les dommages tissulaires liées à l'inflammation (Asseman *et al.*, 1999 ; Couper *et al.*, 2008), ou par l'action synergique de l'**IL-10** et du **TGF- β** pour un effet atténuateur de réactions allergiques et l'IL-35 pour la suppression de la prolifération des lymphocytes T (Ouyang *et al.*, 2011 ; Jutel and Akdis, 2008).

Dans un certain nombre de cancers (mélanome, cancer colorectal, lymphome B, lymphome folliculaire, lymphome de Hodgkin), une plus grande proportion de Tregs est retrouvée au site tumoral comparativement aux tissus adjacent (Chaudhary *et al.*, 2016 ; Ward *et al.*, 2015 ; Tzankov *et al.*, 2008 ; Ladanyi *et al.*, 2010). La présence conjointe au sein du microenvironnement tumoral de lymphocytes Tregs et de T effecteurs mènent à la suppression des réponses immunes anti-tumorales supportées par ces derniers. Dans les cas de cancer colorectal (Betts *et al.*, 2012), de cancer du sein (Gobert *et al.*, 2009), de cancer de l'ovaire (Curiel *et al.*, 2004), de cancer du rein (Jensen *et al.*, 2009), de cancer du poumon (Tao *et al.*, 2012), de mélanome (Mougiakakos *et al.*, 2010), de lymphome (Schreck *et al.*, 2009) et de cancer hépatocellulaires (Fu *et al.*, 2007), ce mécanisme de suppression est de mauvais pronostic clinique car supportant la progression de la maladie.

e. Les Th9

Initialement caractérisées comme une sous population de Th2, les cellules sécrétrices d'**IL-9**, ou Th9, ont récemment été qualifiées de sous-type lymphocytaire T CD4⁺ à part

entière (Dardalhon *et al.*, 2008). L'action de l'**IL-4** et du **TGF- β** permet d'initier leur différenciation. Le développement de ce sous-type est dépendant des facteurs de transcription **PU.1** (Chang *et al.*, 2010) et **IRF4** (Staudt *et al.*, 2010). Ils sont impliqués dans certaines pathologies telles que l'asthme et les réactions auto-immunes mais jouent également un rôle dans l'immunité anti-tumorale (Purwar *et al.*, 2012 ; Lu *et al.*, 2012). Un certain nombre de preuves tendent à définir les lymphocytes Th9 comme faisant partie des acteurs centraux de la réponse immunitaire anti-tumorale. Une première étude met en avant ce rôle anti-tumoral dans un modèle murin de mélanome pulmonaire (foyers pulmonaires de cellules B16F10 préalablement injectées par voie intraveineuse). Dans ce modèle, l'inhibition de l'IL-9 (anticorps bloquant anti-IL-9) affaiblit les réponses immunitaires anti-tumorales. Toutefois, le transfert adoptif de Th9 laisse apparaître une forte réponse anti-tumorale. Le mécanisme à l'origine de cet effet passerait par le recrutement de CD8 par les Th9 au sein du microenvironnement tumoral. Ces CD8 permettraient à leur tour d'activer les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques responsables de l'effet anti-tumoral observé (Lu *et al.*, 2012). Allant dans ce sens, une autre étude suggère que le recrutement des CD8 par les Th9 est initié par l'IL-3 et non l'IL-9 (Park *et al.*, 2014). D'autres part, lorsqu'elles sont activées par un antagoniste du récepteur dectin-1 (Curdlan ou Scleroglucan), les CD8 sont responsables de la stimulation des Th9 et de l'effet anti-tumoral IL-9 dépendant associé (Chen *et al.*, 2016 ; Zhao *et al.*, 2016). Pour aller plus loin, une équipe a révélée l'effet stimulant des Th9 sur la polarisation CD8⁺. Ainsi, la polarisation CD8⁺ en conditions Th9 induit une forte réponse anti-tumorale comparativement à une polarisation classique. L'IL-9 serait à l'origine de cet effet sur les CD8⁺ (Lu *et al.*, 2014).

f. Les Tfh

Ce sous-type a été décrit pour la première fois au début des années 2000 après que plusieurs équipes aient observé qu'environ 50% des lymphocytes T CD4⁺ des tissus lymphoïdes en activité exprimaient très fortement le récepteur aux chimiokines CXCR5 et qu'une partie d'entre eux était localisée dans les centres germinatif (CG) (Schaerli *et al.*, 2000; Breitfeld *et al.*, 2000).

Une description plus approfondie des bases moléculaires à l'origine de la polarisation de ce sous-type, leurs fonctions canoniques ainsi que leurs implications physiopathologiques seront détaillées dans la partie suivante.

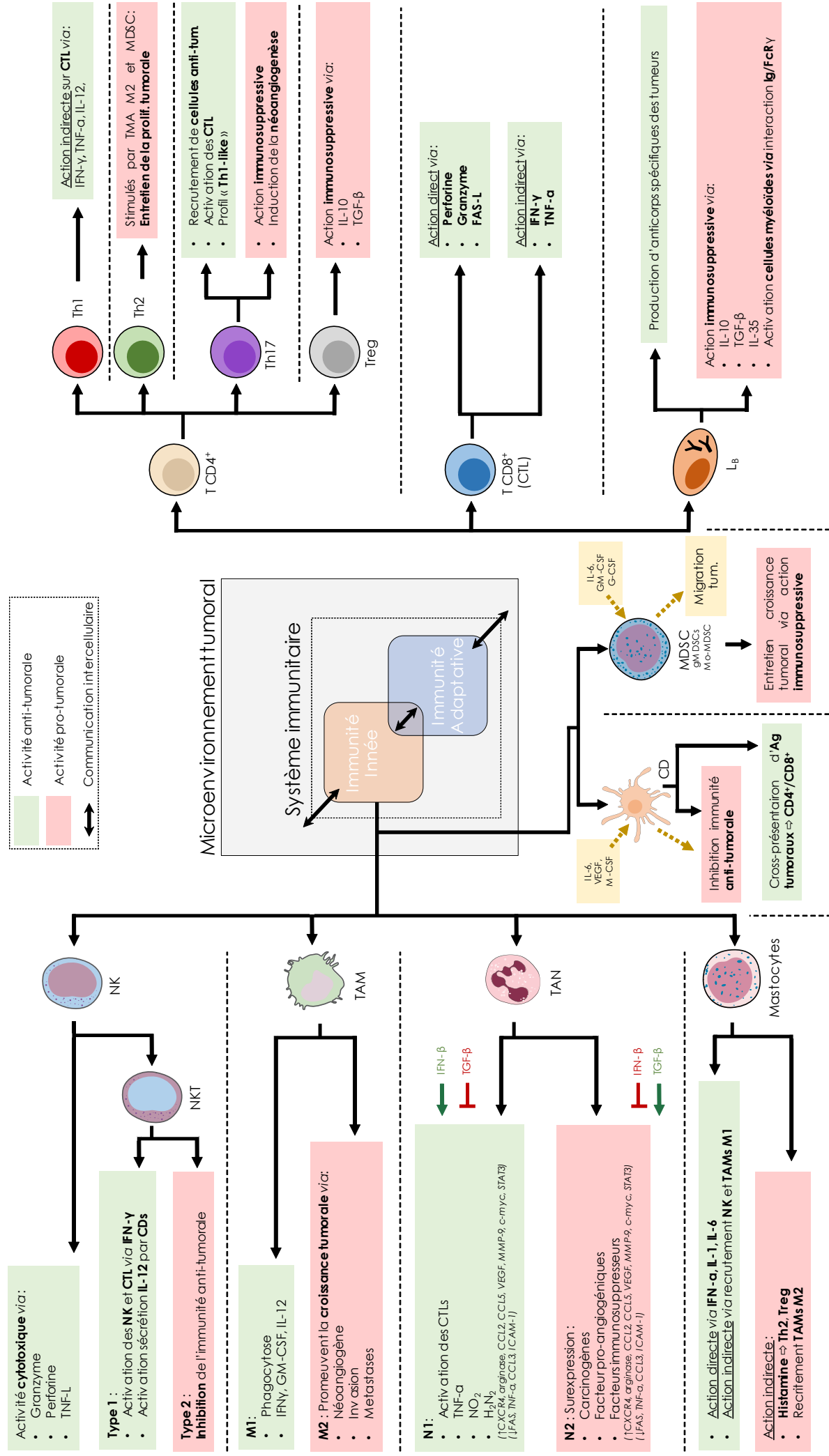


Figure 7 : Représentation schématique du rôle des acteurs de l'immunité Innée et adaptative dans le microenvironnement tumoral. TAM: Tumor Associated Macrophages, NK: Natural Killer cells, CD: Cellules Dendritiques, VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor, GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, M-CSF: Macrophage Colony-Stimulating Factor, TGF- β : Transforming Growth Factor-beta, TNF- α : Tumor necrosis factor alpha, IFN- γ : Interferon gamma, MDSC: Myeloid-derived suppressor cells, NO $_2$: Dioxyde d'azote, H $_2$ O $_2$: Peroxyde d'hydrogène. D'après Aldarouh and Wang, 2016

Partie III. Zoom sur les Tfh et leur place dans le cancer

La résolution d'une infection engage un certain nombre de communication entre les cellules du système immunitaire dans le but de générer des **anticorps de haute affinité** spécifiques des agents infectieux. Cette fonction de production d'anticorps est exclusive aux **lymphocytes B** et ne peut avoir lieu en absence de **cellules T** dérivées du thymus (Miller *et al.*, 1965 and 1968 ; Mitchell *et al.*, 1968 ; and Nossal *et al.*, 1968). Le thymus apparaît comme essentiel à la production d'anticorps. Des expériences de thymectomie au stade précoce de la vie ont révélé l'absence de production d'anticorps après immunisation. C'est à partir de ces observations que la notion de **cellules T auxiliaires** (helper en anglais, ou **Th**) fit son apparition. Les premiers travaux ont tout d'abord mis en évidence la présence de structures spécialisées dans la production d'anticorps (Nieuwenhuis and Opstelten, 1984). Elles composent l'anatomie des **organes lymphoïdes secondaires** (rate, ganglion, amygdales, plaques de Peyer et tissus lymphoïdes associés aux muqueuses). Elles ont été qualifiées de **centres germinatifs (CGs)** et se caractérisent par une forte prolifération cellulaire. Par la suite, le premier facteur de croissance et de différenciation des lymphocytes B mis en évidence a été l'interleukine 4 (IL-4) (Howard *et al.*, 1982 ; Defrance *et al.*, 1988). Vint ensuite la notion de cellules sécrétrices d'IL-4 responsable de la production d'anticorps par les lymphocytes B. Ce sous-type cellulaire fut défini par les termes : **cellules T auxiliaire de type 2** ou **Th2** (T helper type 2 cells) (Mosmann *et al.*, 1986). Toutefois le dogme selon lequel les lymphocytes Th2 sont les seuls acteurs nécessaires et suffisants pour la mise en place d'une réponse B ne tiendra pas longtemps. En effet, en 1995 une étude révèle la présence de CGs intacts et de réponses humorales chez des souris présentant un développement Th2 perturbé (Kopf *et al.*, 1995). Ces résultats ont donc suggéré que les lymphocytes Th2 ne représentent pas le sous-type lymphocytaire T initiant la mise en place d'une réponse B. Ce n'est que cinq ans plus tard, en 2000, qu'un nouveau sous-type de lymphocytes T auxiliaires a été décrit comme possédant la capacité d'induire une réponse B et de soutenir la production d'anticorps. Ces « nouvelles » cellules ont été retrouvées au sein des follicules B d'organes lymphoïdes secondaires humains. Ainsi, du fait de leur localisation et de leur fonction, on leur a donné le nom de **lymphocytes T folliculaires helper** ou **Tfh** (initialement B follicular helper T cells) (Breitfeld *et al.*, 2000 ; Schaerli *et al.*, 2000 ; Kim *et al.*, 2001). S'ajoutant aux paramètres de localisation et de fonction, les lymphocytes

Tfh sont caractérisés par l'expression membranaire du **C-X-C chemokine receptor type 5 (CXCR5)**, récepteur spécifique de la chimiokine CXCL13 (Ansel *et al.*, 1999 ; Breitfeld *et al.*, 2000), nécessaire à la migration folliculaire des Tfh et la formation des CGs.

1. Bases moléculaires de la caractérisation des Tfh

1.1. Généralités

Dans la première partie du XXI^{ème} siècle, l'étude du profil d'expression génique des lymphocytes Tfh humains comme murins ne laisse aucune équivoque quant au fait qu'il s'agisse d'un sous-type bien défini, différents des cellules Th2 et des autres sous-types de lymphocytes T CD4⁺ effecteurs (Chtanova *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2004 ; Vinuesa *et al.*, 2005). En effet, il a initialement été démontré que les cellules Tfh n'expriment aucun des facteurs de transcription canoniques des lymphocytes Th1 et Th2 (Tbet et GATA3 respectivement) ni même les cytokines caractéristiques des cellules Th1, Th2 et Th17. Le profil de ces cellules a notamment été établi à partir de lymphocytes T CD4⁺ provenant d'amygdales humaines triées sur la base de l'expression membranaire de CXCR5.

L'ensemble de ces expériences humaines et murines révèlent la surexpression d'un panel de gènes codant pour les facteurs **BCL6** (B-cell lymphoma 6), **ASCL2** (Achaete-scute family bHLH transcription factor 2), la cytokine **IL-21**, et les molécules de co-stimulation **PD-1** (Programmed-cell death 1) et **ICOS** (Inducible T-cell costimulator) (Chtanova *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2004 ; Vinuesa *et al.*, 2005). Il a été démontré que ces différents facteurs, cytokines et marqueurs membranaires sont des acteurs clés de la régulation du développement, de la migration, de l'homéostasie et des fonctions des lymphocytes Tfh. De manière importante, il a été établi que l'expression du marqueur PD-1, conjointement à celle du récepteur CXCR5, constituait les critères nécessaires à l'identification des Tfh (Dorfman *et al.*, 2006 ; Haynes *et al.*, 2007). Ainsi, ces découvertes ont initié la mise en place d'un tout nouveau champ d'investigation qui, durant la dernière décennie, a vu croître la compréhension de la biologie et de la physiopathologie de ce nouveau sous-type cellulaire T CD4⁺.

1.2. Acteurs moléculaires de la polarisation Tfh

1.2.1. Molécules de co-stimulation

La polarisation de cellules T CD4⁺ naïves en lymphocytes Tfh et leur contrôle est un processus multi-étapes requérant l'engagement de signaux de co-stimulation positifs comme négatifs. Ces signaux, s'additionnant à la signalisation du TCR, travaillent de concert pour l'activation, la prolifération, la différenciation, la migration, la survie et les fonctions des cellules Tfh (Vinuesa *et al.*, 2016 ; Wali *et al.*, 2016 ; Crotty *et al.*, 2011 ; Ramiscal *et al.*, 2013 ; Jogdand *et al.*, 2006). De ce fait, la perturbation de la balance de régulation entre signaux positifs et négatifs de co-stimulation impacte directement le nombre et la fonction des Tfh et peut aboutir par exemple au développement de pathologies auto-immunes (Yang *et al.*, 2005 ; Gong *et al.*, 2016).

1.2.1.1. Co-stimulation positive

CD28 et ICOS

CD28 et ICOS sont deux molécules de co-stimulation qui tiennent une place importante dans la différenciation Tfh (Weber *et al.*, 2015 ; Alegre *et al.*, 2001). Tout d'abord, CD28, constitutivement exprimé à la surface des lymphocytes T, se lie spécifiquement à ses ligands CD80 ou CD86 et participent à la régulation des réponses B (Peach *et al.*, 1994 ; Bluestone, 1995). Dans le cas d'infection virale, l'expression exclusive de CD86 à la membrane des lymphocytes B est suffisante pour l'engagement de la polarisation Tfh et leurs fonctions (Salek-Ardakani *et al.*, 2011). La signalisation cellulaire liée à CD28 impacte la différenciation Tfh en différents points. Tout d'abord lors des phases précoces de la polarisation en régulant l'expression des marqueurs membranaires PD-1, ICOS, OX-40 (ou CD134 ou Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4 (TNFSF4)), de BCL6 et de CXCR5 (Weber *et al.*, 2015). Puis, lors des phases plus tardives de la différenciation Tfh et leur survie (Wang *et al.*, 2015 ; Linterman *et al.*, 2014).

ICOS, membre de la famille de CD28, est fortement exprimé à la surface des Tfh et présente un rôle crucial pour leur différenciation et la formation des CGs (Wali *et al.*, 2016 ; Alegre *et al.*, 2001). Toutefois, contrairement à CD28, ICOS n'intervient pas dans les phases précoces de la polarisation Tfh mais plutôt dans le maintien du phénotype

(Weber *et al.*, 2015). Des preuves *in vivo* démontrent qu'un défaut d'interaction entre ICOS et son ligand (ICOS-L) chez la souris et un déficit pour ICOS chez l'Homme est responsable d'une réduction du nombre de Tfh et de la taille des CGs (Nurieva *et al.*, 2008 ; Weber *et al.*, 2015). Les fonctions de co-stimulation d'ICOS s'exercent à travers l'activation et la signalisation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) activant à son tour Akt (Weber *et al.*, 2015). Akt inactive par phosphorylation le facteur de transcription FOXO1 en l'empêchant d'être transloqué dans le noyau. FOXO1 alors séquestré dans le cytoplasme ne peut donc pas réprimer l'activation de Bcl6 ni activer Klf2 (Kruppel Like Factor 2) (Stone *et al.*, 2015). Klf2, interagit au niveau des régions promotrices de *Cxcr5*, *Ccr7*, *Cd62l*, *Psgl-1* et *S1pr1* et réprime l'expression de CXCR5. Cette action mène à une relocalisation des cellules Tfh de la zone B des follicules à la zone T et impacte le phénotype Tfh (Jogdand *et al.*, 2016). ICOS promeut également l'interaction entre la PI3K et l'ostéopontine (OPN-i) menant à la translocation nucléaire de cette dernière. OPN-i nucléaire peut alors interagir avec BCL6 et le protéger de la dégradation par le protéasome, soutenant ainsi le phénotype et les réponses Tfh (Leavenworth *et al.*, 2015).

SLAM-Associated Protein (SAP)

SLAM-Associated Protein (SAP) est un adaptateur protéique intracellulaire essentiel à la fonction des récepteurs de la famille de SLAM (SLAM family receptors, SFRs) dans les réponses immunitaires (Chen *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2011). Les SFRs sont constitués de neuf membres dont quatre sont retrouvés très fortement exprimés au sein des Tfh et des lymphocytes B. On retrouve CD150/SLAM, CD229/Ly9/SLAMF3, CD84/SLAMF5, et NTB-A/Ly108/SLAMF6 (Cannons *et al.*, 2011 et 2010a ; Kageyama *et al.*, 2012). Chez l'Homme comme chez la souris, une forte expression de SAP au sein des Tfh du CG (GC Tfh) est essentielle à la mise en place d'une réponse humorale pérenne, notamment en participant à la formation des CGs, au développement des plasmocytes à longue durée de vie et des lymphocytes B mémoires (Cannons *et al.*, 2011 ; Yusuf *et al.*, 2010 ; Crotty *et al.*, 2003). Il a été montré que BCL6 est requis pour l'expression de SAP au sein des GC Tfh (Kroenke *et al.*, 2012). SAP régule le contact intercellulaire entre lymphocytes Tfh et lymphocytes B (interactions T:B), la production de cytokines et la force de la signalisation du TCR (Hu *et al.*, 2013).

SAP n'est pas nécessaire aux phases précoces de la polarisation des Tfh (BCL6⁺ CXCR5⁺) mais est indispensable pour le maintien des interactions T:B et la finalisation

du profil Tfh (BCL6^{hi} PD-1^{hi}). SAP interagit avec les phosphotyrosines (Immuno-Tyrosine Switch Motifs, ITSM) de SLAM permettant le recrutement de deux kinases de la famille SRC (SFK), Fyn et PKC θ (Protein kinase C theta) (Latour., 2003). De plus, l'interaction de SAP avec les ITSM de Ly108 (SLAMF6) empêche la fixation de la tyrosine phosphatase SHP-1 (Src Homology 2 domain-containing Phosphatase 1) et limite de ce fait l'inhibition des interactions T:B et du développement des GC Tfh (Cannons *et al.*, 2010b). Suivant le même mécanisme, SAP régule la production d'IL-4 par les GC Tfh (Yusuf *et al.*, 2010 ; Cannons *et al.*, 2010b). Enfin, l'engagement de l'axe SAP/Ly180 soutient la signalisation liée au TCR, nécessaire à la formation de la synapse Tfh:B et aux réponses B associées (Zhao *et al.*, 2012).

Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor-Related Protein (GITR)

Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor-Related Protein (GITR, TNFRSF18, CD357), un membre de la superfamille des récepteurs au TNF (Tumor necrosis factor receptors, TNFR) est surexprimé dans les Treg et les lymphocytes T activés (Nocentini *et al.*, 1997). L'interaction de GITR avec son ligand (GITRL) est responsable de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T effecteurs mais limite également l'action immunosuppressive des Treg (Knee *et al.*, 2016 ; Stephens *et al.*, 2004). GITR est également fortement exprimé par les Tfh (Butcher *et al.*, 2016). La signalisation liée à l'activation de GITR dicte l'expansion et la survie des Tfh. Ainsi, l'administration d'un antagoniste au récepteur GITR (GITR-Fc protein) mène à la suppression du développement des Tfh et par extension à la suppression des réponses humorales (Butcher *et al.*, 2016). D'autre part, dans un modèle d'infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire chronique (chronic Lymphocytic ChorioMeningitis Virus, LCMV), une étude a mis en avant le rôle de GITR dans le maintien des réponses dépendantes des Tfh notamment via la détection de la production d'anticorps spécifique du LCMV (Glouthier *et al.*, 2015). Ainsi, la signalisation liée à GITR peut être considérée comme un régulateur positif de la polarisation Tfh (Jogdand *et al.*, 2016).

Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1)

LFA-1 fait partie de la grande famille des molécules d'adhésion. C'est une β 2 intégrine qui est retrouvée constitutivement exprimée à la surface des thymocytes, des cellules

de la moelle osseuse, des lymphocytes T et B mais également à la surface des monocytes et des granulocytes. On lui connaît 5 ligands de la famille des molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM) 1-5 et JAM-A (Junctional adhesion molecule A). LFA-1 joue notamment un rôle essentiel dans la migration des lymphocytes T, leur rétention tissulaire et la formation de synapse immunologique (Evans *et al.*, 2009). Plus précisément, les lymphocytes T naïfs circulent dans le sang et transitent par les organes lymphoïdes secondaires (OLs). Le signal lié à CCR7 (C-C chemokine receptor type 7 exprimé par les lymphocytes T et impliqué dans leur « homing » au sein des OLs) induit un regroupement et une conformation de haute affinité de LFA-1, permettant ainsi aux lymphocytes T de s'arrêter au niveau des HEV (High endothelial venules) des OLs grâce à l'interaction de LFA-1 avec ses ligands (ICAM-1 notamment). Les lymphocytes ainsi stoppés, entrent au sein des OLs par diapédèse en suivant un gradient chimiotactique (Laufer and Legler, 2018; Shulman *et al.*, 2009; Woolf *et al.*, 2007). Une récente étude met notamment en lumière la régulation de l'expression de LFA-1 au niveau des lymphocytes T via la signalisation liée au récepteur CCR7 (Laufer *et al.*, 2019).

Concernant les lymphocytes Tfh, une étude de 2016 démontre l'importance de LFA-1 dans le contrôle de la différenciation et du maintien de ce sous-type (Meli *et al.*, 2016). En effet, les auteurs révèlent que les Tfh murins comme humains expriment fortement LFA-1 et que la survie des Tfh au cours de la mise en place de réactions immunitaires dépendantes des GCs est fortement liée à son expression. Plus précisément, ils démontrent que LFA-1 joue un rôle critique à la fois lors de la différenciation des cellules Tfh pendant les premiers stades de la polarisation T mais également durant les stades ultérieurs de la réponse immunitaire humorale, où LFA-1 est nécessaire à la survie des cellules Tfh. En témoigne la déficience pour LFA-1 qui, durant les stades d'activation des lymphocytes T, compromet les événements de différenciation précoces dépendants des CD requis pour l'engagement de la polarisation Tfh (modèle d'infection parasitaire intestinale). L'importance de LFA-1 s'inscrit notamment dans la régulation de BCL6, facteur central régissant l'engagement de la polarisation des lymphocytes Tfh. En effet, par le biais de la déplétion de la protéine cytosolique Talin-1, habituellement recrutée au niveau de la sous-unité $\beta 2$ intégrine de LFA-1 et nécessaire à la mise en place de sa conformation de haute affinité, ils observent une répression de l'expression de *Bcl-6 in vitro* et un défaut de polarisation Tfh *in vivo*.

1.2.1.2. Co-stimulation négative

Programmed-cell death 1 (PD-1)

PD-1 (ou PDCD1 ou CD279), membre de la superfamille de CD28, est exprimé de manière transitoire par les lymphocytes T conventionnels. L'interaction avec ses ligands PD-L1/CD274/B7-H1 et PD-L2/CD237/B7-DC, présents à la surface des lymphocytes B activés, des cellules dendritiques (DCs) et des macrophages, mènent à l'inhibition des réponses initiées par les lymphocytes T engagés dans cette interaction (Good-Jacobson *et al.*, 2010). Une expression élevée et stable de PD-1 a été mesurée à la surface des cellules T épuisées, des Treg, des Tfh et des lymphocytes T régulateurs folliculaires (Tfr) (Chung *et al.*, 2011 ; Linterman *et al.*, 2011 ; Sage *et al.*, 2013 et 2016) mais également par les lymphocytes B, les cellules NK et les cellules myéloïdes (Fancisco *et al.*, 2010 ; Keir *et al.*, 2008). L'utilisation de souris déficientes pour PD-1, PD-L1 ou PD-L2 ou *via* injection d'anticorps bloquants spécifiquement ces marqueurs, ont permis de mettre en évidence une atténuation des réponses humorales mais également un effet inverse dans d'autres cas (Good-Jacobson *et al.*, 2010 ; Hamel *et al.*, 2010 ; Kawamolo *et al.*, 2012 ; Hams *et al.*, 2011 ; Velu *et al.*, 2009 ; Butler *et al.*, 2011). De plus, la déplétion cellule-spécifique de PD-1 et ses ligands, a permis de démontrer que l'axe PD-1/PD-L1 limite la polarisation des Tfr et leur fonction immunosuppressive (Sage *et al.*, 2013). Néanmoins, PD-1 affecte la différenciation et les fonctions des Tfh. En effet, il a été observé que les Tfh issus de souris âgées expriment fortement PD-1. Toutefois, les fonctions des Tfh sont restaurées *via* le blocage de PD-1 (Lages *et al.*, 2010 ; Sage *et al.*, 2015). Enfin et de manière très intéressante, il a été démontré que l'expression de PD-L1 au niveau des DCs inhibait les différenciations Tfh et Tfr (Badell *et al.*, 2018).

Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4 (CTLA4)

Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4) est un point de contrôle clé dans la tolérance immunitaire (Walunas *et al.*, 1991 ; Krummel *et al.*, 1995 ; Tivol *et al.*, 1995 ; Perez *et al.*, 1997 ; Leach *et al.*, 1996). Bien que CTLA4 et CD28 partage les mêmes ligands (CD80 et CD86), CTLA4 présente une plus forte affinité et avidité pour ces derniers comparativement à CD28 (Alegre *et al.*, 2001). CTLA4 est constitutivement exprimé sur les lymphocytes Tregs et surexprimé sur les lymphocytes T conventionnels

après activation. CTLA4 joue un rôle central dans les réponses dépendantes des Tregs et le contrôle de l'activité des lymphocytes T conventionnels (Alegre *et al.*, 2001). Il a été démontré que la déplétion spécifique de CTLA4 au niveau des Tregs mimait le phénotype des souris déficientes pour CTLA4 (CTLA4 KO) par l'augmentation de la production d'anticorps. Ces données précisent le rôle de CTLA4 porté par les Tregs et le contrôle des réponses B (Wing *et al.* 2008). Toutefois, il a également été démontré que l'expression de CTLA4 dépendante de FOXO1 dans les lymphocytes TCD4⁺ (hors Treg) régule de manière intrinsèque la différenciation, le maintien et les fonctions des Tfh (Sage *et al.*, 2014). De plus, CTLA4 participe au contrôle de la polarisation Tfh via la régulation du degré d'engagement de CD28 (Wang 2015).

B and T Lymphocyte Attenuator (BTLA)

B and T Lymphocyte Attenuator (BTLA ou CD272), exprimé à la surface des lymphocytes B et T, est un récepteur interagissant avec des membres de la famille des TNFR tels que B7H4 (Watanabe *et al.*, 2003) ou le tumour necrosis factor receptor superfamily, member 14 (TNFRSF14 ou herpes virus entry mediator, HVEM). Comme son nom l'indique, BTLA possède une action atténuatrice, inhibitrice, vis-à-vis de l'activation et des fonctions effectrices des lymphocytes B et T (Cheung *et al.*, 2005 ; de Rio 2010 et 2012.). *In vivo*, un défaut d'expression de BTLA mène à une augmentation significative des réponses IgG dépendantes et au développement graduel de pathologies auto-immunes au cours du temps (hépatite auto-immune et production d'auto-anticorps ciblant des antigènes nucléaires) (Oya *et al.*, 2008). Ces données suggèrent donc que BTLA régule négativement la mise en place des réponses humorales. Il a été observé que BTLA est fortement exprimé à la surface des cellules T CD4⁺ CXCR5⁺ (Tfh) et affecte leur capacité à contrôler le développement des lymphocytes B au sein des CGs et la production d'IgG2a et IgG2b (Kashiwakuma *et al.*, 2010) notamment via la suppression de leur production d'IL-21 (Kashiwakuma *et al.*, 2010).

1.2.2. Cytokines

S'ajoutant aux signaux de co-stimulation, le microenvironnement cytokinique des lymphocytes T CD4⁺ naïfs influence très fortement leur polarisation en sous-type effecteurs spécifiques. Concernant les Tfh, il apparaît qu'un panel de cytokines exerce

des rôles positifs ou négatifs au cours des différents stades de leur polarisation (Vinuesa *et al.*, 2016 ; Wali *et al.*, 2016). Toutefois, entre humain et souris, la composition de ces panels diffère (Vinuesa *et al.*, 2016 ; Schmitt *et al.*, 2015). Ainsi, les différentes cytokines influençant la différenciation humaine et murine des Tfh seront détaillées dans cette section.

1.2.2.1. Cytokines supportant la différenciation Tfh

IL-6, IL-21 et IL-27

Ces interleukines sont toutes trois impliquées dans le développement des Tfh mais diffèrent de par leurs mécanismes d'action (Vinuesa *et al.*, 2016 ; Wali *et al.*, 2016 ; Nurieva *et al.*, 2008 et 2009 ; Eto *et al.*, 2011 ; Batten., 2010).

IL-6

L'IL-6 est principalement produite par les lymphocytes B activés, les DCs et les cellules dendritiques folliculaires (FDCs). Elle est nécessaire à l'initiation de la polarisation Tfh via l'induction de l'expression de BCL6 et de l'IL-21 (Karnowski *et al.*, 2012 ; Eto *et al.*, 2011 ; Nurieva *et al.*, 2010 ; Liu *et al.*, 2013). Ainsi, la déplétion en IL-6 ou de son récepteur (IL-6R) réduit, voire retarde, la formation des Tfh due notamment à un défaut dans la signalisation STAT1 et STAT3 dépendante (Karnowski *et al.*, 2012 ; Choi *et al.*, 2013). Il semblerait que l'IL-6 produite par les FDCs lors d'infection virale soit cruciale pour le maintien du phénotype Tfh et le contrôle de l'infection. Cette action passe par l'augmentation de l'expression de BCL6 au sein de ces cellules (Harker *et al.*, 2011). De manière similaire aux études murines, il apparaît également que l'IL-6 produite par les plasmocytes immatures (plasmablasts) humains circulants présentent le même potentiel d'induction de la différenciation Tfh (Chavele *et al.*, 2015).

IL-21

L'IL-21 est produite par quelques cellules T telles que les lymphocytes Tfh, Th17 mais également les lymphocytes T natural killer (NKT). Cette sécrétion joue un rôle central dans le maintien du phénotype et des fonctions Tfh (Nurieva *et al.*, 2007, 2008 et 2009 ; Chtanova *et al.*, 2004 ; Bauquet *et al.*, 2009). Il a été démontré qu'après immunisation de souris déficientes pour l'IL-21 ou pour son récepteur (IL-21R), le nombre de lymphocytes Tfh reste faible. Ceci suggérant un rôle autocrine de l'IL-21 dans le maintien et l'augmentation du programme Tfh (Nurieva *et al.*, 2008 ; Vogelzang *et al.*, 2008). Toutefois, un défaut de signalisation liée à l'IL-6 ou l'IL-21 n'impacte pas

complètement la différenciation Tfh. Ces preuves laissent penser que l'IL-6 et l'IL-21 présentent une action redondante quant au développement des lymphocytes Tfh (Karnowski *et al.*, 2012 ; Eto *et al.*, 2011). En réalité, on observe une réduction drastique du nombre de Tfh en cas de d'absence de ces deux cytokines comparativement à la perte d'action d'une seule d'entre elles (Karnowski *et al.*, 2012 ; Eto *et al.*, 2011). Cette double perte d'action n'entraîne toutefois pas de déficit complet en Tfh, suggérant l'existence de mécanismes indépendants de l'IL-6 et de l'IL-21 lors des phases de polarisation Tfh. Ce sont d'autres preuves expérimentales qui ont révélé l'impact de l'IL-27 dans la mise en place du profil Tfh. En effet, il est apparu que l'IL-27 est responsable de l'expression de l'IL-21 et contribue de ce fait au maintien du phénotype Tfh (Batten *et al.*, 2010).

IL-27

L'utilisation de modèles murins déficients pour l'IL-27 a démontré son rôle dans le développement et l'activité des Tfh. En effet, lorsque l'IL-27 est en défaut, on observe une réduction de production d'IL-21 ainsi que dans le nombre et l'activité des Tfh au niveau des CGs (Batten *et al.*, 2010). Par le biais des CD_s, l'IL-27 influence la production d'IL-21 des Tfh et par extension la production d'IgG par les lymphocytes B (Gringhuis *et al.*, 2014). S'ajoutant à l'induction de l'IL-21, il a été suggéré que l'IL-27 pouvait agir comme antagoniste à la signalisation IL-2, connue pour inhiber la polarisation Tfh (Ballesteros-Tato *et al.*, 2012 ; Owaki *et al.*, 2006).

TGF- β , IL-12, IL-23, Activin A

Chez l'Homme, il apparaît qu'un panel de cytokines comprenant les cytokines TGF- β , l'IL-12, et l'IL-23 soutient la différenciation Tfh.

IL-12, IL-23

Ces deux cytokines sont impliquées dans l'induction de l'IL-21 au sein de lymphocytes T CD4⁺ circulants ou issus d'amygdales humaines. Toutefois, seul l'IL-12 est apte à augmenter l'expression de CXCR5, ICOS, CD40L et BCL6 dans ces cellules. Il semblerait donc que l'IL-12 agisse au niveau des étapes précoces du développement des Tfh. Il a été observé qu'une co-culture de lymphocyte B et de lymphocytes T CD4⁺ stimulés en amont avec de l'IL-12 stimule la production d'anticorps (Peng *et al.*, 1998). De plus, des individus mutés pour le gène codant pour la sous-unité β 1 du récepteur à l'IL-12 (IL-12R β 1, commune à l'IL-12 et l'IL-23) présentent un faible nombre de Tfh circulants,

de GC Tfh et de lymphocytes B mémoires. Ces observations sont autant de preuves soutenant l'importance de l'IL12 et de l'IL-23 dans la polarisation Tfh. Chez la souris, l'activation de STAT4 par l'IL-12 réprime le programme Tfh via l'inhibition de BCL6.

TGF-β

De manière surprenante, il apparaît que le TGF-β agit comme cofacteur important dans les étapes précoces de la polarisation Tfh humaine (et non murine) (Nurieva *et al.*, 2009 ; Schmitt *et al.*, 2014 ; McCarron *et al.*, 2014). Chez l'Homme, le TGF-β agit de manière synergique à l'action de l'IL-12 et de l'IL-23. Son action STAT3/STAT4 dépendante promeut la différenciation Tfh via l'induction des marqueurs clés CXCR5, ICOS, IL-21, BCL6, BATF et c-Maf et l'inhibition de Blimp-1 (Schmitt *et al.*, 2014).

Activin A

Mis en évidence chez l'Homme et les primates uniquement, l'Activin A est liée à l'augmentation de l'expression de CXCR5, CXCL13 et PD-1 ainsi qu'à la répression de CCR7 et Blimp-1 (Locci *et al.*, 2016). En combinaison avec l'IL-12, l'Activin A participe à l'expression de CXCR5, BCL6, PD-1, SLAMF1, CXCL13, IL-21, LIF, LTA et TNF (Locci *et al.*, 2016) Cet effet passe par l'activation des facteurs de transcription SMAD2 et SMAD3 (Locci *et al.*, 2016).

1.2.2.2. Cytokines inhibitrices de la polarisation Tfh

IL-2, IL-10 et IL-7

Il a été démontré que l'axe IL-2/STAT5 possède une action inhibitrice sur la polarisation Tfh. *In vivo*, l'administration d'IL-2 recombinant supprime la différenciation Tfh, la formation des CGs et abolit la production d'anticorps dans un modèle murin d'influenza (Ballesteros-Tato *et al.*, 2012). Plus précisément, l'expansion des Tfh n'est rendue possible que grâce à la perte d'expression de la sous-unité α du récepteur à l'IL-2 (IL2Ra) (Choi *et al.*, 2011 ; Pepper *et al.*, 2011). Si l'on s'attache à la description du mécanisme d'action de l'IL-2 on s'aperçoit que STAT5, consécutivement activé à la suite de la fixation de l'IL-2 sur l'IL-2R, promeut l'expression de Blimp-1 et réprime celle de Bcl6 via l'inhibition de l'interaction de STAT3 au locus de Bcl6 (Ballesteros-Tato *et al.*, 2012). De plus, il a été observé que l'action inhibitrice de l'IL-2 sur la polarisation Tfh passe par la répression de la signalisation liée à l'IL-6. L'IL-2 inhibe l'expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-6 (IL-6Ra) et de la sous-unité gp130 associée à ce

récepteur (Liao *et al.*, 2011). Il a également été démontré que l'IL-2 oriente la différenciation lymphocytaire vers un profil Th1 plutôt que Tfh via l'activation d'Akt et de la kinase mTORC1 (Ray *et al.*, 2015).

De la même manière que l'IL-2, l'IL-7 induit l'activation de STAT5 et par conséquent réprime la différenciation Tfh via l'inhibition de CXCR5 et Bcl6 (McDonald *et al.*, 2016). Enfin, d'autres preuves expérimentales démontrent le rôle inhibiteur de l'IL-10 sur les réponses humorales notamment via la suppression d'une sous-population Tfh productrice d'IL-17 et d'IL-21 (Cai *et al.*, 2012).

1.2.3. Facteurs de transcription

La différenciation de lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes Tfh est finement régulée par un réseau coordonné d'interactions entre facteurs cellulaires extrinsèques et un réseau transcriptionnel intrinsèque. Depuis la découverte de BCL6 comme facteur majeur de la différenciation Tfh, de nombreuses études ont permis de révéler l'implication de divers autres acteurs régulant positivement (IRF4, c-Maf, BATF, différentes STATs, ASCL2, TCF1, LEF1, ERG2, ERG3, Bob1, NF-κB1) comme négativement (FOXO1, FOXP1, BLIMP-1, STAT5, KLF2 et le peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ)) le développement, la migration et les fonctions des Tfh. Il existe de ce fait une balance dynamique entre l'action de ces différents facteurs de transcription et le maintien de l'homéostasie immunitaire. Ainsi, un dysfonctionnement dans l'ensemble de cette machinerie transcriptionnelle mène le plus souvent à l'apparition et au développement de pathologies auto-immunes (Sahoo *et al.*, 2015 ; Gong *et al.*, 2014).

1.2.3.1. Facteurs de transcription régulant positivement la polarisation Tfh

B-Cell Lymphoma 6 Protein (BCL6)

BCL6 a été identifié et reconnu comme facteur majeur de transcription pour le développement de lymphocytes Tfh et la mise en place des réponses humorales dépendantes des CGs (Nurieva *et al.*, 2009 ; Johnston *et al.*, 2009 ; Yu *et al.*, 2009). L'expression de BCL6 implique l'engagement de réseaux de signalisation

intracellulaires induits d'une part par le signal de co-stimulation délivré par CD28 et d'autre part par l'axe IL-6/IL-21-STAT1/STAT3 (Weber *et al.*, 2015). BCL6 participe à l'induction des marqueurs PD-1, CXCR5, CXCR4 et SAP essentiels aux fonctions des Tfh et aux interactions Tfh/lymphocytes B (Liu *et al.*, 2013 ; Choi *et al.*, 2011). Une autre caractéristique de BCL6 dans le développement des Tfh est de réprimer l'expression de facteurs antagonistes à la polarisation Tfh et la mise en place des autres phénotypes T CD4⁺ effecteurs. Parmi ces actions, BCL6 réprime l'expression de Blimp-1, celle des gènes codant pour des protéines impliquées dans le contrôle de la migration cellulaire (EIB2, CCR7, CCR6, S1PR1 et PSGL1), celle de KLF2 mais également des facteurs gouvernant les profils Th1 (IFNGR1, T-bet et STAT4), Th2 (GATA3) et Th17 (IL-17 et ROR γ t) (Nurieva *et al.*, 2009 ; Johnston *et al.*, 2009, Yu *et al.*, 2009 ; Crotty *et al.*, 2010 ; Martins *et al.*, 2008 ; Hatzi *et al.*, 2015 ; Kusam *et al.*, 2003 ; Liu *et al.*, 2016).

c-Maf

Le proto-oncogène c-Maf, facteur de transcription de la famille des facteurs à domaine de liaison à l'ADN bZIP (basic leucine zipper), est connu pour jouer un rôle important dans la régulation de la production cytokinique par les lymphocytes Th2, Th17 et dans la différenciation Tfh (Butler *et al.*, 2011). Les Th17 et les Tfh partagent une expression importante de c-Maf. La perte d'expression de ce facteur mène à un défaut de production d'IL-21 et une réduction du nombre de ces deux sous-types (Bauquet *et al.*, 2009). De plus, de récentes données tendent à démontrer que la perte d'expression de c-Maf impacte négativement l'expression des facteurs clés du profil Tfh, à savoir, BCL6, CXCR5 et PD-1 (Andris *et al.*, 2017).

BATF

BATF partage des caractéristiques communes avec c-Maf. Comme ce dernier, BATF est un facteur à domaine bZIC appartenant à la famille AP-1 originellement décrit comme impliqué dans la différenciation Th17. BATF régule notamment le facteur majeur de transcription ROR γ t ainsi que leurs cytokines IL-21 et IL-22 (Schraml *et al.*, 2009). La régulation de l'expression de BCL6 et de c-Maf fait de BATF un acteur essentiel au développement des Tfh (Betz *et al.*, 2010 ; Ise *et al.*, 2011). De plus, les souris déficientes pour BATF présentent un défaut dans le développement des Tfh. Toutefois, la surexpression de BCL6 et de c-Maf n'induit qu'une restauration partielle de la polarisation Tfh comparativement à une simple surexpression de BATF. Ces

données suggèrent donc l'intervention d'autres acteurs dans l'établissement d'un profil Tfh complet (Krishnamoorthy *et al.*, 2017). S'ajoutant à ces données, une étude assez récente met en évidence une coopération entre le complexe BATF /IRF4 et les facteurs de transcription STAT3 et STAT6 dans l'expression d'IL-4 par les Tfh (Sahoo *et al.*, 2015).

IFN-Regulator Factor 4 (IRF4)

IRF4 semble jouer un rôle important dans la polarisation Tfh et dans la formation des CGs (Bollig *et al.*, 2012). Plus précisément, IRF4 peut interagir avec différents facteurs impliqués dans les processus de polarisation T CD4⁺. Ainsi, IRF4 forme un complexe avec Jun et BATF (IRF4-Jun-BATF) régulant la polarisation Th17 (Li *et al.*, 2012), mais peut également interagir avec STAT3 et réguler l'expression d'IL-21 (Kwon *et al.*, 2009) ou avec STAT6 et réguler l'expression des gènes dépendants de l'IL-4 (Gupta *et al.*, 1999). Dans ce dernier cas, l'interaction d'IRF4 avec BCL6 empêche son interaction avec STAT6 et de ce fait réprime l'expression des gènes induit par l'action du complexe STAT6-IRF4 (Gupta *et al.*, 1999). Il a également été démontré que plus la force du signal TCR est importante, plus la concentration d'IRF4 est élevée et plus les gènes dépendants de BLIMP-1 sont exprimés et inversement pour BCL6. Il est bon de rappeler que ces deux facteurs de transcription (BLIMP-1 et BCL6) présentent des actions antagonistes et de ce fait s'inhibent mutuellement. On observe ainsi une corrélation inverse entre la concentration en IRF4 et le développement du profil Tfh (Krishnamoorthy *et al.*, 2017).

Signal Transducers and Activators of Transcriptions (STATs)

Il existe différents membres de la famille des STATs qui contribuent au développement des lymphocytes Tfh. On dénombre notamment STAT1, STAT3 et STAT4 (Nurieva *et al.*, 2008 et 2012, Liu *et al.*, 2013).

STAT1

STAT1 intervient précocement dans la polarisation Tfh (Choi *et al.*, 2013). Il a été démontré que l'IL-6 est nécessaire à l'initiation de la polarisation Tfh notamment via l'action de STAT1 et STAT3 lors de la mise en place du profil Tfh (Choi *et al.*, 2013). Dans ce contexte, des preuves expérimentales démontrent que l'action de STAT1 passe par

la régulation directe d'acteurs clés de la polarisation Tfh tels que BCL6, CXCR5 et PD-1 (Nakayamada *et al.*, 2014).

STAT3

Consécutivement activé par l'IL-6 et l'IL-21, STAT3 contrôle l'expression de BCL6 (Nurieva *et al.*, 2008 et 2009 ; Zhong *et al.*, 1994 ; Asao *et al.*, 2001). De plus, STAT3 peut également coopérer avec deux autres facteurs de transcription, Aiolos et Ikaro, membres de la famille des facteurs Ikaros à doigts de zinc. Cette coopération permet d'induire l'expression de Bcl6 et de l'IL6Ra (Read *et al.*, 2017). STAT3, activé par l'IL-6, présente également une action répressive sur l'expression de la sous-unité IL-2Ra, limitant de ce fait la différenciation Th1 (Choi *et al.*, 2013). Enfin, il a été observé chez l'Homme qu'un défaut fonctionnel de STAT3 compromet fortement la génération de lymphocytes Tfh (Ma *et al.*, 2012).

STAT4

Chez l'Homme comme chez la souris, le facteur de transcription STAT4 induit, *in vitro*, l'expression de Bcl6 et d'IL-21 (Nakayamada *et al.*, 2011 ; Schmitt *et al.*, 2009). Toutefois, chez la souris, le maintien de l'axe de signalisation IL-12/STAT4 présente un effet répressif sur l'expression de BCL6 et d'IL-21. En effet, STAT4 renforce l'expression de T-bet et de ce fait dérive la différenciation vers un profil Th1 (Nakayamada *et al.*, 2011). Très récemment, T-bet et BCL6 ont été retrouvés co-exprimés au sein d'une population de Tfh dans le cas d'infection virale. Il apparaît que cette co-expression additionnée à celle de STAT4 est nécessaire afin de coordonner la production d'IL-21 et d'IFN- γ par les Tfh et promouvoir ainsi une réponse GC dépendante adaptée à la résolution de l'infection (Weinstein *et al.*, 2018).

Notch1 et Notch2

Les protéines Notch font partie d'une famille de récepteurs transmembranaires très conservés au cours de l'évolution. Ces récepteurs jouent un rôle important dans la régulation de la différenciation et des fonctions des lymphocytes T CD4⁺ effecteurs (Auderset *et al.*, 2012). Une déplétion spécifique de Notch1 et Notch2 dans les lymphocytes T a pour conséquence un défaut de polarisation Tfh et de sécrétion d'IL-4 par ces cellules. Conjointement, un déficit de réactions dépendantes des CGs a été observé après infection parasitaire ou immunisation avec un antigène T-spécifique (4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl (NP) conjugué à de l' γ -globuline de poulet (chicken γ -

globulin ou CGG) (NP39-CGG)) (Auderset *et al.*, 2013). Les Tfh déficients pour Notch 1 et 2 présentent un défaut d'expression de marqueurs canoniques du profil Tfh tels que CXCR5, PD-1, BTLA, et BCL6. S'ajoutant à cela, une augmentation d'expression de Blimp-1 a été observée (Auderset *et al.*, 2013). Le développement des cellules Tfh et leur production d'IL-4 requière l'action des deux récepteurs Notch 1 et 2. Toutefois, la différenciation Th2 peut se passer de ces deux récepteurs. Il apparaît donc que dans le cadre de réponses immunes de type 2, Notch 1 et Notch 2 représentent un point de bifurcation notoire dans la mise en place de réponses Tfh ou Th2 dépendantes (Dell'Aringa *et al.*, 2018).

Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT)

Deux études mettent en avant le rôle des facteurs NFAT 1 et 2 dans la régulation de la polarisation Tfh. Tout d'abord, NFAT2 est fortement exprimé dans les Tfh mais sa déplétion entraîne toutefois une augmentation de l'activité des CGs. Les auteurs se sont aperçu que la proportion de lymphocytes T folliculaires régulateurs (Tfr) était fortement réduite. Ils attribuent cela au fait qu'NFAT2 participe à l'induction de CXCR5 au sein des Tfr. De ce fait, si ce facteur fait défaut, les Tfr n'expriment plus CXCR5 et ne peuvent plus migrer dans les follicules B et réguler le développement des lymphocytes B. D'où cet emballement d'activité des CGs (Vaeth *et al.*, 2014).

Enfin, la perte conjointe des deux facteurs NFAT1 et 2 dans les lymphocytes T CD4⁺ montre un défaut d'activité des CGs. Cette perte de fonction est causée par une diminution de la polarisation Tfh et de l'expression d'ICOS, de PD-1 et des SFRs, facteurs important du développement des lymphocytes B car engagés dans les interactions Tfh/B (Martinez *et al.*, 2016).

Achaete-Scute Homolog 2 (ASCL2)

ASCL2, un facteur de transcription à domaine bHLH (basic helix-loop-helix), est sélectivement surexprimé dans les Tfh et participe aux mécanismes d'initiation de leur polarisation (Liu *et al.*, 2014). *In vitro*, la surexpression d'Ascl2 conduit à une forte expression de CXCR5 et à une répression de CCR7 (Liu *et al.*, 2014). *In vivo* (souris), ASCL2 accélère à la fois la migration des Tfh vers les follicules ainsi que leur développement (Liu *et al.*, 2014). Ainsi, l'inhibition de ce facteur mène à la déplétion complète du développement Tfh et des réponses dépendantes des CGs (Liu *et al.*,

2014). De plus, ASCL2 réprime l'expression des gènes signatures des sous-types Th1 et Th17 (Liu *et al.*, 2014).

T Cell Factor 1 (TCF-1) et LEF-1

A l'instar d'ASCL2, TCF-1 est exprimé dans les Tfh et participe à l'initiation de leur polarisation. TCF-1 présente également un rôle important pour les fonctions effectrices des Tfh. En effet, un défaut d'expression de ce facteur réduit fortement la formation de lymphocytes Tfh ainsi que le soutien qu'ils apportent à la mise en place de réponses B (Choi *et al.*, 2015 ; Wu *et al.*, 2015 ; Xu *et al.*, 2015).

De manière semblable, le facteur LEF-1 offre une aide essentielle à la mise en place du profil Tfh, notamment durant les phases précoces (Weber *et al.*, 2011 ; Yu *et al.*, 2012). L'expression des facteurs TCF-1 et LEF-1 précède celle de BCL6 et cible directement certains marqueurs signature des Tfh, à savoir, BCL6, l'IL-6R, gp130 et ICOS (Choi *et al.*, 2015). Enfin, il a été démontré que TCF-1 réprime l'expression de Blimp-1 et de l'IL-2Ra (Wu *et al.*, 2015).

Early Growth Response Gene 2 (EGR2) et EGR3

EGR2 et 3 sont des facteurs de transcription à doigt de zinc de la famille des EGRs (early growth response gene). Ces facteurs régulent directement l'expression de Bcl6 et par extension la différenciation des Tfh. En effet, dans un contexte d'infection virale, l'absence d'EGR2 et 3 mène à un défaut d'expression de BCL6 et une déficience dans la polarisation Tfh ayant pour conséquence une réduction de la production d'anticorps antiviraux (Ogbe *et al.*, 2015).

Bob1

Le facteur B-cell-specific octamer-binding protein 1 (Bob1), en coopération avec les deux facteurs de transcription Oct1 et Oct2, promeut la différenciation Tfh *via* sa fixation aux promoteurs de *Bcl6* et *Btla* et induit leur activation (Stauss *et al.*, 2016). Toutefois, d'autres études semblent démontrer que Bob1 limite la proportion de Tfh (Barnett *et al.*, 2014 ; Schwicker *et al.*, 2011).

NF-κB1

Il a été observé que NF-κB1 participe aux réponses Tfh notamment grâce à son rôle dans l'expression de CXCR5. Il apparaît toutefois que NF-κB1 n'influence pas l'expression d'autres facteurs clés des Tfh tels que BCL6, IL21 et PD-1. Néanmoins, un défaut d'NF-κB1 mène à une perte partielle de l'aide apportée par les Tfh au développement des lymphocytes B (Serre *et al.*, 2011). Il a également été rapporté que la voie canonique de signalisation d'NF-κB joue un rôle central dans le développement des Tfh notamment *via* la régulation de l'expression d'ICOSL à la surface des lymphocytes B (Hu *et al.*, 2011).

1.2.3.2. Facteurs de transcription réprimant la polarisation Tfh

FOXO1 et FOXP1

Des preuves expérimentales suggèrent qu'une diminution de l'expression du facteur FOXO1 (du fait d'une augmentation de celle d'ICOS) (Stone *et al.*, 2015) ou de la dégradation d'ITCH (ubiquitine ligase E3) (Xiao *et al.*, 2014) favorise la différenciation Tfh. En effet, la déplétion lymphocytes T spécifiques de FOXO1, entraîne la suppression de l'expression de Bcl6 et de ce fait inhibe la différenciation Tfh (Stone *et al.*, 2015). Toutefois, FOXO1 serai requis pour les étapes finales de leur différenciation, en atteste le déficit en GC Tfh lorsqu'il est en défaut (Stone *et al.*, 2015). Une autre étude démontre que FOXO1 joue son rôle répresseur sur la différenciation Tfh en affectant l'expression d'ICOS et d'IL-21 notamment *via* CCR7 et de CTLA4 (Wang *et al.*, 2014).

Krüppel-Like Factor 2 (KLF2)

Le facteur de transcription KLF2 régule la migration des lymphocytes T naïfs vers les tissus lymphoïdes secondaires. Ce rôle est attribuable à la régulation positive qu'il opère vis-à-vis des marqueurs CD62L et S1PR1 (Weinreich *et al.*, 2009). S1PR1 est connu pour permettre la sortie des lymphocytes T du thymus en direction de la périphérie (Mandala *et al.*, 2002 ; Matloubian *et al.*, 2004) et CD62L pour leur entrée dans les ganglions lymphatiques (Arbones *et al.*, 1994). De plus, une étude a démontré le rôle répresseur de KLF2 sur la différenciation Tfh (Lee *et al.*, 2015). La cause cet effet réside dans la capacité de KLF2 à induire l'expression de gènes antagonistes à la

différenciation Tfh tels que *Prdm1* (BLIMP-1), *Gata3* et *Tbx21* (T-bet) ainsi que dans la répression de l'expression de *Cxcr5* (Lee *et al.*, 2015).

BLIMP-1 et STAT5

BLIMP-1, codé par le gène *Prdm1* est un répresseur transcriptionnel capable d'inhiber l'expression de *Bcl6* dans les lymphocytes B et T (Crotty *et al.*, 2010). L'expression de BLIMP-1 est induite par la voie de signalisation STAT5 activé par l'IL-2 et l'IL-7. L'expression de *Bcl6* ainsi que d'autres gènes signatures du profil Tfh tels que *Cxcr5*, *c-Maf*, *Batf* et *Il-21* est réprimée et la différenciation Tfh fortement compromise (Niureva *et al.*, 2012 ; Johnston *et al.*, 2012).

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ)

PPAR γ est un facteur de transcription impliqué dans le métabolisme des lipides et du glucose (Park *et al.*, 2014). Chez la jeune souris, un déficit pour PPAR γ dans les lymphocytes T est responsable du développement de réactions auto-immunes. Dans ces souris, la production de GC Tfh, de lymphocytes B et d'auto-anticorps est exacerbée (Park *et al.*, 2014). Dans les faits, PPAR γ inhibe la différenciation Tfh et la mise en place des GC via la répression de BCL6 et d'IL-21, conséquence de la stabilisation d'Ikba (inhibiteur d'NF κ B), de FOXO1 et de SIRT1 (Park *et al.*, 2014).

2. Paramètres spatio-temporels de la polarisation Tfh

2.1. Initiation de la polarisation Tfh : mise en place d'un profil pré-Tfh

La polarisation Tfh est initiée lorsque qu'un lymphocyte T CD4⁺ entre en contact avec une CD de la zone T folliculaire des organes lymphoïdes secondaires. De par la reconnaissance de l'antigène présenté, des voies de signalisation liées au TCR ainsi qu'aux molécules de co-stimulation, permettent au lymphocyte T CD4⁺ de s'activer. S'additionnant à cela, les CD libèrent dans le milieu extérieur proche un panel de cytokines nécessaire à l'initiation de la polarisation du lymphocyte T CD4⁺. Cette première étape est suffisante pour initier la mise en place d'un phénotype pré-Tfh précoce. En effet, un des premiers effets est l'activation de la transcription et de la synthèse protéique du facteur de transcription BCL6. Une rapide acquisition des marqueurs membranaires canoniques des Tfh : CXCR5 et PD-1 s'ensuit (Baumjohann *et al.*, 2011 ; DiToro *et al.*, 2018). Le phénotype pré-Tfh se caractérise également par l'expression précoce du facteur de transcription *Ascl2*. Ce facteur initie l'expression de *Cxcr5* et réprime celle de *Ccr7* et *Psgl1*, deux récepteurs membranaires nécessaires à la séquestration des lymphocytes TCD4⁺ dans à la zone T folliculaire (Liu *et al.*, 2014).

S'additionnant à la sécrétion de cytokines, une catégorie de CD, les cDC2 (migratory conventional DC2) (migration IRF4 dépendante), ont été décrites comme nécessaires et suffisantes à l'initiation du programme de différenciation Tfh (Calabro *et al.*, 2016 ; Choi *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2016 ; Shin *et al.*, 2015). Après avoir été activées, les cDC2 migrent dans la zone T des follicules (possiblement facilité par l'expression des récepteurs CXCR5 et EBI2/GPR183) où elles se retrouvent co-localisées avec les lymphocytes T CD4⁺. Dans cette zone, les cDC2 augmentent l'expression de molécules de co-stimulation telles qu'ICOSL, et OX40L ainsi que la sous unité α de l'IL-2R (CD25) (Calabro *et al.*, 2016 ; Li *et al.*, 2016 ; Shin *et al.*, 2015 ; Krishnaswamy *et al.*, 2017). L'expression de CD25 à la surface de ces cellules leur permet de séquestrer l'IL-2 du milieu avoisinant afin de limiter les mécanismes d'inhibition de la polarisation Tfh STAT5 dépendant (Li *et al.*, 2016). S'additionnant à cela, la promotion de la différenciation Tfh est renforcée par les interactions cDC2/T CD4⁺ engageant les couples récepteur/ligand ICOS/ICOSL et OX40/OX40L. Ces interactions déclenchent

l'activation des voies de signalisation PI3K/Akt (Gigoux *et al.*, 2009 ; Jacquemin *et al.*, 2015 ; So *et al.*, 2011 ; Song *et al.*, 2005 ; Xiao *et al.*, 2014).

Après les premières phases d'initiation de leur polarisation, les pré-Tfh subissent également une modification de leur métabolisme. Cette modification semble être nécessaire à leur adaptation et leur survie vis-à-vis du microenvironnement dans lequel ils évolueront (follicule B puis CGs). Alors que pour la majorité des autres lymphocytes T activés leur programme métabolique s'oriente vers des mécanismes glycolytiques (Frauwirth *et al.*, 2002 ; Macintyre *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2011), les lymphocytes pré-Tfh semblent se centrer sur l'oxydation mitochondriale. Il a été observé que la seule expression de *Bcl6* était suffisante pour inhiber l'expression de gènes liés aux mécanismes de la glycolyse (Oestreich *et al.*, 2014 ; Ray *et al.*, 2015). L'absence de signalisation liée à l'IL-2 au sein des pré-Tfh comme des Tfh permet également à ces cellules de s'affranchir d'une activité glycolytique. En effet, il a été démontré que la voie de signalisation PI3K/Akt/mTORc1 liée à l'action du couple IL-2/CD25 est responsable de l'augmentation du métabolisme glycolytique dans les lymphocytes T (Ray *et al.*, 2015). Les Tfh présentent une faible activité mTORc1 et est nécessaire au développement du phénotype (Ray *et al.*, 2015). Toutefois, la déplétion de mTOR (mTORc1/mTORc2) mène à l'inhibition de la polarisation Tfh (Yang *et al.*, 2016 ; Zeng *et al.*, 2016). Ainsi, il semblerait qu'une faible activité de mTOR est cependant nécessaire au développement du profil Tfh. La reprogrammation métabolique lors des étapes précoces du développement Tfh est vue comme une adaptation préventive au microenvironnement dans lequel ces cellules résideront par la suite. En effet, dans les follicules B, l'accessibilité au glucose comme source d'énergie est limitée du fait de la forte prolifération des lymphocytes B. Ainsi, l'orientation des Tfh vers un métabolisme oxydatif représente une stratégie d'adaptation et de survie nécessaire au maintien du phénotype.

2.2. Rencontre à l'interface T/B des follicules : de pré-Tfh à Tfh

La polarisation Tfh est initiée par les CD4 dans la zone T des follicules mais le maintien du phénotype est gouverné par les lymphocytes B au niveau de l'interface entre follicule T et follicule B. L'initiation par les CD4 induit l'augmentation de l'expression de *Cxcr5*, *Ebi2* (Epstein-Barr virus-induced G-protein coupled receptor 2, récepteur de l'oxystérol 7- α ,25-dihydroxycholestérol) et l'inhibition de celle de *Ccr7* et *Psgl-1*

permettant leur migration en direction de la zone B sous l'action de CXCL13 (Li *et al.*, 2016 ; Kerfoot *et al.*, 2011 ; Coffey *et al.*, 2009). A l'inverse, les lymphocytes B, localisés dans les zones B des follicules, initient leur migration en direction de l'interface avec les zones T. Cette migration est rendu possible grâce à l'expression à la surface des lymphocytes B du récepteur CCR7 soumettant ces cellules au pouvoir chémoattracteur de ces ligands, CCL19 et CCL21, présents dans les zones T (Reif *et al.*, 2002). Au niveau de cette interface, les lymphocytes B jouent le rôle de CPAs pour les pré-Tfh. Ainsi, via la reconnaissance du complexe CMH-II/antigène présenté par les lymphocytes B, les pré-Tfh entrent en contact avec ces derniers (Okada *et al.*, 2005 ; Qi *et al.*, 2008). Lors de l'établissement de cette synapse immunologique, l'engagement du couple CD40/CD40L induit l'augmentation d'EBI2 par les lymphocytes B (Kelly *et al.*, 2011). Ces modifications permettent la migration des complexes pré-Tfh/B en direction de la région interfolliculaire au niveau de laquelle d'autres cycles de prolifération auront lieu (Kerfoot *et al.*, 2011 ; Weinstein *et al.*, 2014).

De manière réciproque, au travers de cette synapse immunologique, les lymphocytes B doivent offrir au pré-Tfh les signaux nécessaires à l'évolution de leur phénotype vers un profil Tfh effecteur. Ainsi, les lymphocytes B sont nécessaires à l'augmentation de l'expression de *Bcl6* dans les pré-Tfh. Cette augmentation permet de soutenir leur polarisation et le phénotype Tfh, leur recrutement folliculaire et plus tard de soutenir leur développement en lymphocytes Tfh des CGs (CXCR5^{hi} PD-1^{hi}) (Maumjohann *et al.*, 2011 ; Kerfoot *et al.*, 2011 ; Weinstein *et al.*, 2014). La formation d'une interaction durable entre lymphocyte B et pré-Tfh nécessite, en plus des complexes CMH-II/TCR, B7/CD28, OX40/OX40 et CD40/CD40L, l'expression et l'engagement de SAP par les pré-Tfh. SAP se lie aux récepteurs Ly180 (SLAMF6) et CD84 (SLAMF5) de la famille des récepteurs SLAM (Qi *et al.*, 2008 ; Cannons *et al.*, 2010).

2.3. Migration des Tfh dans la zone B: formation des centres germinatifs

Sous l'action d'un gradient chimiotactique de CXCL13 (Ansel *et al.*, 1999), les Tfh migrent au sein des follicules B et entrent en contact avec d'autres lymphocytes B folliculaires non-CPA. L'abondance relative des cellules B non-CPA rend d'autant plus favorable l'interaction des lymphocytes Tfh avec ces dernières (Weinstein *et al.*, 2014). Ces interactions sont cruciales pour le développement des CGs (Deenick *et al.*, 2010 ;

Xu *et al.*, 2013). Ces autres lymphocytes B expriment à leur surface ICOSL. L'engagement du couple ICOS/ICOSL dans les interactions Tfh/B déclenche au sein des Tfh l'augmentation de l'expression de CXCR5 (Xu *et al.*, 2013) et celle du facteur de transcription KLF2 impliqué dans la répression des récepteurs CCR7, PSGL-1 et CD62L (ou L-sélectine, exprimée par les lymphocytes T naïfs et leur permet de migrer jusqu'aux ganglions ou sites d'inflammations) (Choi *et al.*, 2011 ; Weber *et al.*, 2015). Cette interaction promeut également la motilité cellulaire *via* la voie de signalisation PI3K (Xu *et al.*, 2013). En plus de l'expression d'ICOSL, les lymphocytes B non-CPA surexpriment PD-L1. L'interaction de PD-1 avec son ligand PD-L1 est connue pour limiter l'activation des cellules exprimant ce point de contrôle immunitaire. Ici, la surexpression de PD-L1 par les lymphocytes B est nécessaire pour limiter l'expansion des Tfh n'exprimant pas ou faiblement ICOS (Shi *et al.*, 2018).

Au centre des follicules B, les CGs constituent une zone anatomique transitoire focalisant le développement, la sélection et la prolifération de plasmocytes à longue durée de vie et de lymphocytes B mémoires de haute affinité. Au niveau de ces structures, les Tfh peuvent être divisés en deux populations selon leur localisation. On observe des Tfh présents au cœur des CGs (germinal center Tfh, GC Tfh) et une population de Tfh en marge des CGs, dans la zone du manteau folliculaire (Tfh du manteau). Il a également été observé que les GC Tfh, comparativement aux Tfh du manteau, expriment plus fortement CXCR5 et PD-1 à leur surface (Shulman *et al.*, 2013) ainsi que certains facteurs canoniques du phénotype Tfh tels que BCL6, l'IL-21, l'IL-4 et Maf (Suan *et al.*, 2015). Une autre donnée intéressante a été apportée par l'étude de la dynamique des Tfh. Il a été observé qu'un peu moins d' $1/3$ des GC Tfh présentent une mobilité hors des GCs. Ces Tfh vont coloniser d'autres CGs et participer ainsi à l'enrichissement du répertoire lymphocytaire B. Dans le même temps, environ 20% des lymphocytes Tfh du manteau migrent vers le CG (Shulman *et al.*, 2013 ; Suan *et al.*, 2015).

Leur localisation dans les CGs semble être gouvernée par le niveau d'expression de certaines molécules membranaires. On note à la fois une forte expression de CXCR5, permettant aux Tfh de maintenir leur migration au sein des follicules B et une diminution de l'expression de CCR7 les empêchant de retourner vers les follicules T. Il apparaît également qu'EBI2, préalablement surexprimée par les Tfh et lymphocytes B au niveau des follicules B est par la suite réprimée, permettant ainsi leur entrée dans les CGs (Pereira *et al.*, 2009 et 2010). Cette répression est notamment induite par la diminution

de la stimulation d'EIB2 par son ligand (7 α ,25-dihydroxycholesterol ou 7 α ,25-HC). Ainsi, la réduction de l'expression d'EIB2 par les lymphocytes B et Tfh des CGs est nécessaire à leur localisation au sein des CGs (Hannedouche *et al.*, 2011). A l'inverse, ces mêmes cellules surexpriment le récepteur S1PR2 (sphingosine-1-phosphate receptor 2) (Moriyama *et al.*, 2014). La fixation de la sphingosine-1-phosphate (S1P) à son récepteur S1PR2 inhibe leur migration et permet leur séquestration au sein des CGs (Green and Cyster, 2012). Il existe ainsi une balance d'expression entre EIB2 et S1PR2, responsable à la fois de la migration et de la séquestration des Tfh au niveau des CGs. De plus, la localisation des Tfh et des lymphocytes B au niveau des CGs semble être gouvernée par l'expression respective de la sémaphorine 4C (Sema4C) et la plexine B2 transmembranaire (PlxnB2). Ces deux molécules gouvernant les interactions entre Tfh et lymphocytes B, l'absence d'expression de l'une ou de l'autre entraîne une séquestration des deux sous-types en marge des CGs et l'inhibition de la mise en place de réponses humorales (Yan *et al.*, 2017). SAP, mentionnée plus tôt, semble également jouer un rôle important dans la localisation des Tfh dans les CGs. Les Tfh retrouvés dans les CGs présentent une forte expression de SAP. Ainsi, dans des modèles murins de déplétion pour SAP, il a été observé que les Tfh étaient majoritairement séquestrés dans la zone du manteau (Qi *et al.*, 2008 ; Suan *et al.*, 2015). Un contrôle négatif de la formation des CGs fait intervenir l'EFNB1 (ephrin-B1) portée par les lymphocytes B et son récepteur EPHB6 (ephrin type-B receptor 6) porté par les lymphocytes T. Via l'interaction entre lymphocytes B des CGs et GC Tfh, le couple EFNB1/EPHB6 limite la séquestration des Tfh au sein des CGs (Lu *et al.*, 2017). Enfin, à l'instar des lymphocytes B des CGs, les lymphocytes B non-CPA des follicules B influencent également la localisation des Tfh via PD-L1. La perte d'expression de PD-L1 à la surface des lymphocytes B non-CPA et/ou un défaut d'expression de PD-1 par les Tfh entraîne une séquestration préférentielle des Tfh au niveau de la zone du manteau. PD-1 est donc également important pour la localisation des Tfh dans les CGs (Shi *et al.*, 2018).

L'initiation et le maintien des réactions immunes dépendantes des CGs sont gouvernés par l'action des GC Tfh. Dans le cadre de cette régulation, on observe la mise en place d'un réseau de communications intercellulaires via contacts physiques et échanges de médiateurs solubles. Ces mécanismes mettent notamment en jeu les molécules de co-stimulation CD40L et ICOS ainsi que l'IL-21, l'IL-4 et l'IFN- γ . Il est également important de signaler que ces mécanismes d'aides ne sont pas uniquement observés au sein des CGs mais également en périphérie. Les Tfh extra-

folliculaires (Odegard *et al.*, 2008 ; Cunningham *et al.*, 2004) présentent également un rôle important dans la génération de plasmocytes immatures à courte durée de vie (short-lived plasmablast) (MacLennan *et al.*, 2003 ; Qi *et al.*, 2016).

A travers la synapse immunologique engageant les GC B et les GC Tfh, la signalisation liée à CD40L est cruciale pour le maintien du développement des lymphocytes B des CGs. En effet, en cas de délétion pour CD40L, on note un défaut de formation des CGs. De plus, l'inhibition de cette interaction *via* l'emploi d'anticorps bloquant perturbe l'intégrité des CGs déjà établis (Han *et al.*, 1995 ; Xu *et al.*, 1994 ; Foy *et al.*, 1994). L'importance du couple ICOS/ICOSL provient du fait que consécutivement à leur interaction, la signalisation CD40L soutient l'expression d'ICOSL par les GC B. Cette boucle de régulation positive soutient ainsi le développement des lymphocytes B des CGs (Liu *et al.*, 2015).

Au sein des GC Tfh, la signalisation calcique est également responsable de l'expression de l'IL-21 et de l'IL-4 (Shulman *et al.*, 2014 ; Agarwal *et al.*, 2000 ; Kim *et al.*, 2005). L'IL-21 sécrétée par les Tfh régule notamment les réponses immunes liées au CGs *via* le maintien de l'expression de BCL6 au sein des GC B (Linterman *et al.*, 2010 ; Zotos *et al.*, 2010) et promeut leur prolifération et leur différenciation en lymphocytes B de haute affinité (Ettinger *et al.*, 2008 ; Ozaki *et al.*, 2002 ; Good *et al.*, 2006). L'IL-4 est quant à elle impliquée dans les processus anti-apoptotiques des lymphocytes B *via* STAT6, responsable de l'activation de la molécule transmembranaire mitochondriale Bcl-XI. Bcl-XI est notamment impliqué dans l'inhibition du relargage cytoplasmique du cytochrome c. La signalisation dépendante de STAT6 est également responsable de l'activation du métabolisme glycolytique des lymphocytes B (Dufort *et al.*, 2007 ; Wurster *et al.*, 2002 ; Paul *et al.*, 1987). De plus, l'IL-4 est un acteur central des réponses immunes de types 2 notamment grâce à son rôle dans la commutation de classe isotopique IgG2. L'IFN- γ , responsable du switch isotopique IgG1, est impliqué dans les réponses immunes de type 1 (Toelner *et al.*, 1998). Le rôle physiologique des Tfh et leur impact sur le développement des lymphocytes B seront détaillés dans une des parties suivantes (Cf. Fonctions canoniques des Tfh).

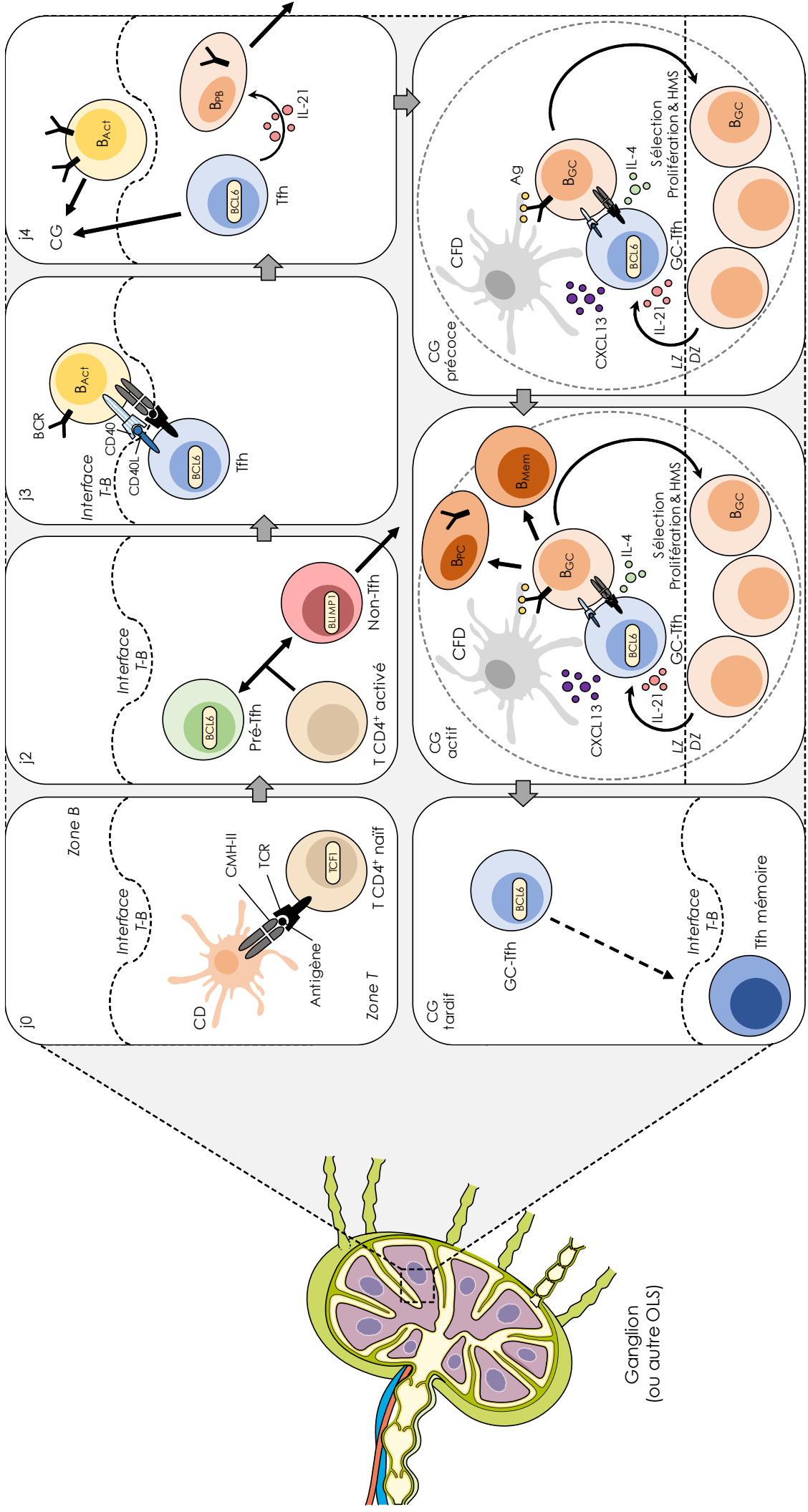


Figure 9: Cinétique de développement et d'action des Tfh lors de la mise en place d'une réponse immunitaire humorale. Chaque étape expliquée précédemment est résumée et schématisées dans cette figure. **HMS** : Hypermutation somatique. D'après Crotty, 2019

3. Hétérogénéité du profil Tfh

La pluralité des réponses humorales liées à la nature de l'agression (infection bactérienne, virale, parasitaire, fongique) reflète la capacité d'adaptation des lymphocytes Tfh à orienter le développement lymphocytaire B. De cette aptitude, il a été observé que les Tfh présentent une certaine plasticité selon les conditions environnementales et de ce fait une modification de leurs fonctions effectrices. Les fonctions effectrices des lymphocytes T CD4⁺ sont consensuellement gouvernées par l'activation d'un facteur de transcription signature du phénotype, associée à l'action d'un panel de cytokines spécifiques. Ainsi, il a été observé que les GC Tfh possèdent la capacité de sécréter des cytokines caractéristiques d'autres sous-types effecteurs CD4⁺ tels que l'IFN- γ (Th1), l'IL-4 (Th2) et l'IL-17 (Th17) (Johnston *et al.*, 2009 ; Reinhardt *et al.*, 2009 ; Hsu *et al.*, 2008). De plus, il a été démontré que les Tfh IL-21⁺ peuvent être reprogrammer *ex vivo* en cellules sécrétrices de cytokines Th1, Th2 et Th17 (Lu *et al.*, 2011). Basé sur cette étude de reprogrammation Tfh, des marques de régulations épigénétiques positives ont été observées au niveau des loci *Tbx21* (codant pour Tbet, Th1) et *Gata3* (Th2) (Lu *et al.*, 2011). Ces données laissent suggérer qu'une partie du programme de différenciation des Tfh présente des axes communs avec ces autres sous-types T CD4⁺ effecteurs.

Dans les réponses immunes de type 1, la différenciation Th1 est initiée par l'activation des voies de signalisation STAT1 et STAT4 induites par les IFNs de type 1 et l'IL-12. Cette activation menant à l'expression de *Tbx21* et *Ifn- γ* (Afkarian *et al.*, 2002 ; Mullen *et al.*, 2001 ; Zhu *et al.*, 2012). STAT4 est également responsable de l'expression de *Bcl6* et *Il-21* durant les phases précoces du développement Th1 (Nakayamada *et al.*, 2011 ; Weinstein *et al.*, 2018). De plus, il a été observé durant les phases précoces de la polarisation Tfh, que ces cellules pouvaient co-exprimer l'IFN- γ et l'IL-21 et présenter un niveau d'expression de *Tbx21* et *Bcl6* similaire (Weinstein *et al.*, 2018). Une autre étude a pu démontrer que les Tfh exprimant Tbet étaient susceptibles d'être retrouvés dans les CGs et produire de l'IFN- γ de manière STAT4 dépendante (Fang *et al.*, 2018). Une population de lymphocytes Tfh IL-21⁺ IFN- γ ⁺ est observée dans des cas d'infection virales par le virus influenza (grippe) et *Plasmodium chabaudi* (Carpio *et al.*, 2015 ; Miyauchi *et al.*, 2016). Toutefois et de manière plus générale, la frontière entre cette population cellulaire double productrice et les profils Th1 et Tfh est encore floue.

L'expression de l'IL-4 par les Tfh et son impact sur leurs fonctions sont détaillés dans le paragraphe consacré aux fonctions canoniques des Tfh (Cf. sous-partie « Profil sécrétoire des Tfh »).

Enfin, la dernière source d'hétérogénéité dans le phénotype Tfh a été observée au niveau du système digestif, au sein des plaques de Peyer. Dans ces structures, les CGs contiennent des Tfh provenant des sous-types effecteurs Treg et Th17 (Hirota *et al.*, 2013 ; Tsuji *et al.*, 2009). Il a été démontré, dans un modèle de transfert adoptif de Treg et de Th17, que ces cellules étaient capables de migrer dans les plaques de Peyer et arborer un profil Tfh par la suite (Tsuji *et al.*, 2009). Venant appuyer ces données, la déplétion en Treg et Th17 induit un défaut dans les réponses dépendantes des IgA (isotype majoritairement produit par les CGs des plaques de Peyer et majoritairement représenté dans les réponses immunes au niveau intestinale) (Cong *et al.*, 2009). Au regard du développement des Tfh, ces données sont intéressantes en ce sens où elles soulèvent des questions quant au rôle des Tfh dans les mécanismes de tolérance et d'auto-réactivité permis au niveau intestinal. Concernant les Treg, d'autres données humaines et murines apportent des éléments renforçant l'idée d'une plasticité Tfh et d'un schéma commun dans les phases précoces de leur développement. Une population cellulaire T CD4⁺ BCL6⁺ Foxp3⁺ a été retrouvée dans les follicules et les CGs. Ces cellules, qualifiées de Tfh régulateurs ou Tfr, semblent limiter les réponses liées aux CGs via la sécrétion d'IL-10 et de contacts intercellulaires (Chung *et al.*, 2011 ; Linterman *et al.*, 2011 ; Wollenberg *et al.*, 2011 ; Laidlaw *et al.*, 2017).

Chez la souris comme chez l'Homme, l'analyse des cellules du sang périphérique a permis d'identifier une population hétérogène de lymphocytes Tfh circulants (cTfh). Sur la base de l'expression des marqueurs membranaires CXCR3 (caractéristique des Th1) et CCR6 (caractéristique des Th17) on distingue une population CXCR3⁺ CCR6⁻ Th1-like, une population CXCR3⁻ CCR6⁺ Th17-like et une population double négative CXCR3⁻ CCR6⁻ Th2-like (Bentebibel *et al.*, 2015 ; Schmitt *et al.*, 2014). Bien que partageant les caractéristiques communes des Tfh, les cTfh présentent des modifications dans l'expression des marqueurs canoniques du profil Tfh. Comparativement aux Tfh retrouvés dans les organes lymphoïdes secondaires, les cTfh Bcl6⁺ expriment CXCR5, PD-1 et ICOS dans de moindres mesures (Choi *et al.*, 2015 ; He *et al.*, 2013 ; Simpson *et al.*, 2010 ; Morita *et al.*, 2011). Basé sur l'expression membranaire de CXCR5, CXCR3, ICOS, PD-1 et CCR7, sept sous-types de cTfh ont été décrits. Il apparaît que l'expression de CCR7 est inversement proportionnelle à celle

de PD-1 (Varricchi *et al.* 2016). Les cTfh conservent leur fonction d'aide au développement des lymphocytes B notamment via la sécrétion de leurs cytokines effectrices (Morita *et al.*, 2011 ; MacLeod *et al.*, 2011).

D'après Cannons *et al.*, 2013 ; Varricchi *et al.*, 2016 ; Bentebibel *et al.*, 2015 ; Schmitt *et al.*, 2014 ; Fang and Zhu 2017.

Détail de la Figure 10 : **(a) Modèle 1.** La capacité des cellules Tfh à produire de l'IFN- γ , l'IL-4, l'IL-17 ou de l'IL-10 est acquise après leur développement. Les faibles niveaux de T-bet, GATA3, ROR γ t ou FOXP3 induits par l'environnement cytokinique des Tfh est responsable de la production d'IFN- γ , d'IL-4, d'IL-17 ou d'IL-10, respectivement. **(b) Modèle 2.** Au stade précoce du développement des Tfh, l'expression transitoire de T-bet, GATA3, ROR γ t ou FOXP3 préconditionne les Tfh à devenir des Tfh sécréteurs d'IFN- γ , d'IL-4, d'IL-17 ou d'IL-10 au sein des follicules B en laissant des marques de « mémoire épigénétique » au niveau des loci de ces cytokines. **(c)** Les neuf profils Tfh mémoire du sang humain. Panel de gauche : Stratégie de fenêtrage (gating) par cytométrie en flux pour définir les différents profils Tfh (sur la base des marqueurs membranaires CXCR5, CXC3, CCR6). Panel de droite : La combinaison matricielle des paramètres définissant les neuf profils Tfh mémoires du sang humain. Chacun présentant des propriétés fonctionnelles distinctes. **(d)**. Les cellules Tfh du sang humain (CXCR5⁺) peuvent être séparées en quatre sous-ensembles en fonction de l'expression de CXCR3 et de PD-1. L'expression de CCR7 est quant à elle inversement corrélée à l'expression de PD-1. Les cellules PD-1⁺ exprimant ICOS représentent les Tfh périphériques « activées ». Les Tfh « quiescent » PD-1⁺ CXCR3⁻ sont les cellules les plus efficaces pour le développement des lymphocytes B. Les cellules CXCR3⁺ aident les cellules B lorsqu'elles sont activées (cellules ICOS⁺ PD-1⁺). Cependant, leur capacité d'aide est limitée aux cellules B mémoires.

4. Fonctions canoniques des Tfh

4.1. Profil sécrétoire des Tfh

La sécrétion de cytokines est un des moyens de communication intercellulaire utilisé par les Tfh pour agir sur ces cibles. La fonction majeure des lymphocytes Tfh - détaillée dans la section suivante - est d'initier et de soutenir le développement des lymphocytes B au cœur des CGs. Bien qu'il soit actuellement admis que le phénotype Tfh représente un profil lymphocytaire T CD4⁺ à part entière, il apparaît de plus en plus que ces cellules possèdent la capacité de sécréter des cytokines canoniques d'autres sous-types T CD4⁺. L'expression et la production d'IFN- γ , d'IL-17 et d'IL-4, cytokines signature des lymphocytes Th1, Th17 et Th2 respectivement a été décrit (Lu *et al.*, 2011). Plus précisément, il a été démontré que la sécrétion de ces cytokines par des Tfh isolés (Tfh *ex vivo*) est possible mais dépendante du microenvironnement cytokinique *in vitro* (Cannons *et al.*, 2013). Ainsi, il est envisageable que les Tfh puissent produire différents facteurs solubles nécessaires à leur fonction de chaperon du développement des lymphocytes B.

4.1.1. IL-21

La fonction majeure des Tfh est principalement attribuable à leur production d'IL-21. Cette cytokine est le facteur soluble effecteur majeur produit par les Tfh. Il est responsable de la prolifération des lymphocytes B des CGs ainsi que de la formation des plasmocytes, lymphocytes B effecteurs extra-folliculaires producteurs des anticorps spécifiques de la réponse immune mise en place (Nurieva *et al.*, 2008 ; Vogelzang *et al.*, 2008). Via la production d'IL-21, les Tfh maintiennent à la fois l'expression de BCL6 au sein des lymphocytes B des CGs et par extension la spécificité des réponses humorales (Zotos *et al.*, 2010). Comme évoqué précédemment, la régulation transcriptionnelle de l'IL-21 au sein des Tfh est dépendante du facteur de transcription c-Maf et des voies de signalisation issus du marqueur membranaire ICOS (Bauquet *et al.*, 2009).

4.1.2. IFN- α et IL-17

Dans le cas d'infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire chronique (LCMV), il a été observé que les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs et mémoires présentent un profil Tfh (cellules « Tfh-like ») sécréteurs d'IFN- γ (Marshall *et al.*, 2011). S'ajoutant à ces données, des preuves expérimentales de production d'IL-17 par des lymphocytes « Tfh-like » ont été relevées dans un modèle murin de sclérose en plaque : modèle d'EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis). Il apparaît que cette production d'IL-17 est dépendante de la signalisation liée au marqueur membranaire ICOS (Bauquet *et al.*, 2009).

4.1.3. IL-4

Bien que l'IL-4 ne joue pas de rôle important dans la polarisation Tfh, cette cytokine est toutefois un acteur clé de la maturation des lymphocytes B et de la commutation isotypique IgG1 en réponse aux infections parasitaires (King *et al.*, 2009 ; Fairfax *et al.*, 2015). Il a également été démontré que l'IL-4 est requise pour la différenciation de lymphocytes B mémoires en plasmocytes immatures (plasmablasts) lors d'une seconde immunisation (Fairfax *et al.*, 2015). D'autres données obtenues dans ce même modèle expérimental laissent apparaître que les Tfh producteurs d'IL-4 expriment les marqueurs caractéristiques du phénotype Tfh, à savoir CXCR5, ICOS, PD-

1, BTLA, BCL6, et IL-21 et se trouvent spécifiquement localisés au sein des follicules B et des CGs des ganglions actifs (King *et al.*, 2009). Toutefois, à l'extérieur de ces organes lymphoïdes, les cellules sécrétrices d'IL-4 ne présentent pas de caractéristiques Tfh (Glatman Zaretsky *et al.*, 2009). Les auteurs font donc la distinction entre les cellules productrices d'IL-4 au profil Tfh, présentes dans les ganglions, et les lymphocytes Th2 périphériques. Toutefois, dans un modèle d'immunisation par antigènes d'œufs de schistosomes (parasites), le niveau d'expression du facteur majeur de transcription des Th2, GATA3, est comparable entre les Tfh des follicules B et les cellules productrices d'IL-4 périphériques (Glatman Zaretsky *et al.*, 2009). Les auteurs suggèrent ici que les Th2 présents dans les ganglions possèdent la capacité de se polariser en Tfh et rester dans les follicules B et les CGs, ou migrer dans les tissus périphériques. Il apparaît donc qu'il existe, entre Tfh et Th2, une frontière étroite et encore floue en termes de mécanismes de polarisation. Cette frontière a également pu être observée plus récemment. Une étude montre que dans un modèle murin de sensibilisation pulmonaire aux acariens (house dust mites, HDM) les lymphocytes T CD4⁺ naïfs se différencient tout d'abord en Tfh producteurs d'IL-4 au sein des ganglions médiastinaux (ganglions drainant les poumons). Toutefois, lors de cette première immunisation, les Tfh ne présentent pas de capacité de trans-différenciation en Th2 pathogéniques ni de capacité migratoire au sein des poumons. Ainsi, après une première immunisation, les auteurs ne diagnostiquent aucun symptôme pulmonaire lié aux réponses Th2. Toutefois, après une seconde immunisation (re-challenge), il apparaît que les Tfh sécréteurs d'IL-4 se différencient rapidement en Th2, migrent dans les poumons et produisent de l'IL-4 qui est à l'origine du recrutement des éosinophiles et des signes caractéristiques d'une inflammation pulmonaire (Ballesteros-Tato *et al.*, 2016). De cette étude les auteurs en concluent que leurs résultats sont en accord avec d'autres données montrant que les Tfh possèdent la capacité de se différencier en un autres sous-types de cellules T effectrices après une seconde immunisation (Choi *et al.*, 2013 ; Lüthje *et al.*, 2012). Ce type de modèle ouvre de nouvelles perspectives quant à la compréhension de la mise en place des pathologies liées à l'action des Th2 (Ballesteros-Tato *et al.*, 2016). Le rôle de l'IL-4 produite par les Tfh apparaît d'autant plus important quand des preuves expérimentales démontrent que la co-production d'IL-4 et d'IL-21 est requise pour la production d'IgG1 (cf. section suivante sur le rôle physiologique des Tfh) (Fairfax *et al.*, 2015).

Il semblerait que de l'implication de nombreuses molécules de co-stimulation et de facteurs épigénétiques soient à l'origine de la régulation de l'expression de l'IL-4 par les Tfh. Ainsi, la perte de SAP impacte directement la production d'IL-4 et d'IL-21 par les Tfh (Yusuf *et al.*, 2010). Comme évoqué précédemment, il a été décrit que la signalisation liée à l'interaction de SLAM (SLAMF1, CD150) avec SAP est responsable de la production d'IL-4 par les GC Tfh (Yusuf *et al.*, 2010). De plus, il a été rapporté que l'inhibition d'ICOSL dans un modèle d'infection par *Leishmania major* limite la formation des CGs, réduit le nombre de Tfh producteurs d'IL-4 au sein des follicule B ainsi que le nombre de GC B. Toutefois, l'inhibition d'ICOSL n'affecte pas l'expression et la production d'IL-4 par les Th2. Ces données suggèrent qu'ICOSL n'est pas requis pour le développement Th2 mais est nécessaire à la production d'IL-4 par les Tfh des CGs (Reinhardt *et al.*, 2009).

Des analyses d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) au niveau du locus de l'IL-4 révèlent la présence de marques de modifications épigénétiques. En effet, une abondante acétylation des lysines 9 et 14 des histones 3 (H3K9/14) (marque de régulation positive) a été relevé au niveau des régions régulatrices HS2, HS5a et CNS2 (Conserved non-coding sequence 2). De plus, il apparaît que la lysine 4 des histones H3 est bi-méthylée (H3K4me2) (marque répressive) au niveau de la région CNS2 du locus IL-4 des Tfh (Vijayanand *et al.*, 2012 ; Harada *et al.*, 2012). Chez les souris déplétées pour le site CNS2 on note une profonde réduction de la production d'IgG1 et d'IgGE après immunisation (injection d'ovalbumine conjuguée à de l'alum). Cet effet est attribuable à une perte d'expression et de production d'IL-4 par les Tfh (Harada *et al.*, 2012). Ces données indiquent donc que CNS2 est un site d'induction de l'expression d'IL-4 (enhancer) au sein des Tfh.

4.2. Rôle physiologique des Tfh

La fonction majeure des lymphocytes Tfh est de promouvoir la formation, le maintien et les fonctions des CGs via la mise en place de cellules B mémoires de haute affinité et le développement de plasmocytes à longue durée de vie (lymphocytes B effecteurs). Ainsi, la régulation des Tfh et à plus forte raison de leur fonction d'auxiliaire à la différenciation B représente une pierre angulaire des réponses immunes dépendantes des CGs (Victoria and Nussenweig, 2012). Au sein des CGs, les lymphocytes B (GC B cells ou GC B) se répartissent dans deux zones : une zone claire

(ou light zone, LZ) et une zone sombre (ou dark zone, DZ). Dans la LZ, les lymphocytes GC B entrent en contact avec un antigène « étranger », l'intègre et présente les peptides antigéniques aux cellules avoisinantes via leur CMH-II. A ce moment, les lymphocytes B occupent le rôle de CPA. Les Tfh interagissent physiquement avec les GC B via la reconnaissance par leur TCR du complexe CMH-II/peptide. Cette interaction est responsable de l'induction de signaux de survie et de prolifération pour les lymphocytes B. Les lymphocytes B qui reçoivent ces signaux vont alors entreprendre une migration depuis la LZ jusqu'à la DZ. C'est dans cette zone que les processus de prolifération et d'hypermutation somatique (HMS) auront lieu. Ces phénomènes ont pour but de permettre aux lymphocytes B d'élargir le spectre de spécificité pour l'antigène reconnu. Ce processus est à l'origine de la modulation, et dans certains cas, de l'augmentation de l'affinité des immunoglobulines (Ig) pour l'antigène considéré. La mise en place d'une réponse humorale spécifique ne s'arrête pas à cette étape. En effet, après que leur immunorécepteur (BCR) ait subi ces différentes étapes de mutation, les lymphocytes B retournent dans la LZ afin de subir d'autres étapes de sélection. De par leur interaction avec les Tfh de la LZ, les GC B traversent d'autres étapes de prolifération et de mutation afin d'affiner la spécificité de la réponse immune (Crotty *et al.*, 2011 ; Victoria and Nussenweig, 2012). Plus précisément, la sélection des lymphocytes B portant une Ig de forte affinité et la commutation de classe (ou commutation isotypique) (Allen *et al.* 2007) impliquent une compétition entre signaux de survie et signaux de mort. En effet, en absence de signaux de survie, les Tfh ont la capacité de tuer par apoptose les GC B via interaction Fas/FasL. Ce processus permet la production d'Ig de classes différentes, primordiale à la diversité fonctionnelle des réponses anticorps. En résumé, les lymphocytes Tfh régulent la taille des CGs (Hams *et al.*, 2011 ; Johnston *et al.*, 2009 ; Rolf *et al.*, 2010), limite l'entrée des lymphocytes B de faible affinité dans les CGs au profit de ceux présentant une forte affinité pour l'antigène (Schwickert *et al.*, 2011) et sélectionnent les meilleurs lymphocytes B de haute affinité durant la phase de maturation (Good-Jacobson *et al.*, 2010, Victoria *et al.*, 2010).

Sécrétion cytokinique (Cf. section précédente) et contacts intercellulaires, sont les deux modes de transmissions des signaux d'aide au développement des lymphocytes B fournis par les Tfh. Bien que les processus de signalisation entre Tfh et lymphocytes B ne soient pas encore tous caractérisés, il apparaît que CD40L, l'IL-21 et l'IL-4 en sont les molécules clés. Ces molécules produites par les GC Tfh déclenchent des signaux

de survie et de prolifération au sein des lymphocytes B des CGs (Crotty, 2011). Les cytokines IL-21 et IL-4 jouent un rôle important dans la commutation de classe IgG1 au sein des lymphocytes B humains (Avery *et al.*, 2008). Ces deux cytokines sont fortement régulées au sein des Tfh. Cette régulation est dépendante des contacts intercellulaires entre Tfh et lymphocytes B des CGs. La production d'IL-4 par les GC Tfh est dépendante de SLAM (Yusuf *et al.*, 2010) et SLAM est sélectivement surexprimé à la surface des lymphocytes B de la LZ (Victoria *et al.*, 2012). Il apparaît également que la signalisation SLAMF6 répressive limite le développement des lymphocytes B gouverné par les Tfh (Kageyama *et al.*, 2012). D'autre part il a été observé qu'ICOS est important pour la production de l'IL-21 par les Tfh (Morita *et al.*, 2011).

Pour aller plus loin, une étude montre que le profil cytokinique des GC Tfh est modifié au cours du temps (Weinstein *et al.*, 2016). Pour ce faire, les auteurs ont utilisé des modèles murins « double-reporter », *Il21-IRES-Katshka Il4-IRES-GFP*, leur permettant de suivre l'expression des deux cytokines (IL-21 et IL-4) grâce à leur fluorescence respective (IL-21 : rouge, IL-4 : vert). Il en ressort que les Tfh présentent trois profils cytokiniques différents : IL-21-Kat⁺ IL-4-GFP⁻, IL-21-Kat⁻ IL-4-GFP⁺ et IL-21-Kat⁺ IL-4-GFP⁺. Ils ont observé que les GC Tfh IL-21-Kat⁺ IL-4-GFP⁻ sont les premiers à apparaître lors d'une infection par l'helminthe *Nippostrongylus brasiliensis* et que ceux présentant un profil IL-21-Kat⁻ IL-4-GFP⁺ sont retrouvés plus tardivement. Ainsi, sur la base de transferts adoptifs, les auteurs ont pu établir la chronologie d'expression de ces deux cytokines au sein des GC Tfh. Pour résumer, ils démontrent que les GC Tfh expriment et sécrètent de manière séquentielle au cours du temps ces deux cytokines. Il apparaît que l'IL-21 est la première des deux à être produite par les GC Tfh. La production d'IL-4 étant plus tardive. Outre leur expression différentielle au cours du temps, les auteurs ont également pu mettre en évidence une différence dans la répartition spatiale de ces profils sécrétoires au sein des CGs. Ils suggèrent que les trois profils d'expression cytokinique ont des rôles différents au sein des CGs et démontrent que selon leur production d'IL-21 et/ou d'IL-4, les GC Tfh se « répartissent les tâches » quant au développement des lymphocytes B. Ainsi, ils ont observé que les GC Tfh IL-21-Kat⁺ IL-4-GFP⁻ promeuvent surtout les mécanismes d'hypermutation somatique au sein des GC B. Alors que ceux présentant un profil IL-21-Kat⁻ IL-4-GFP⁺ sont plutôt impliqués dans l'induction de la commutation isotypique IgG1 et dans la différenciation des plasmocytes. Enfin, le profil double positif IL-21-Kat⁺ IL-4-GFP⁺ aurait un spectre d'action un peu plus large dans les réponses dépendantes des CGs (Weinstein *et al.*, 2016).

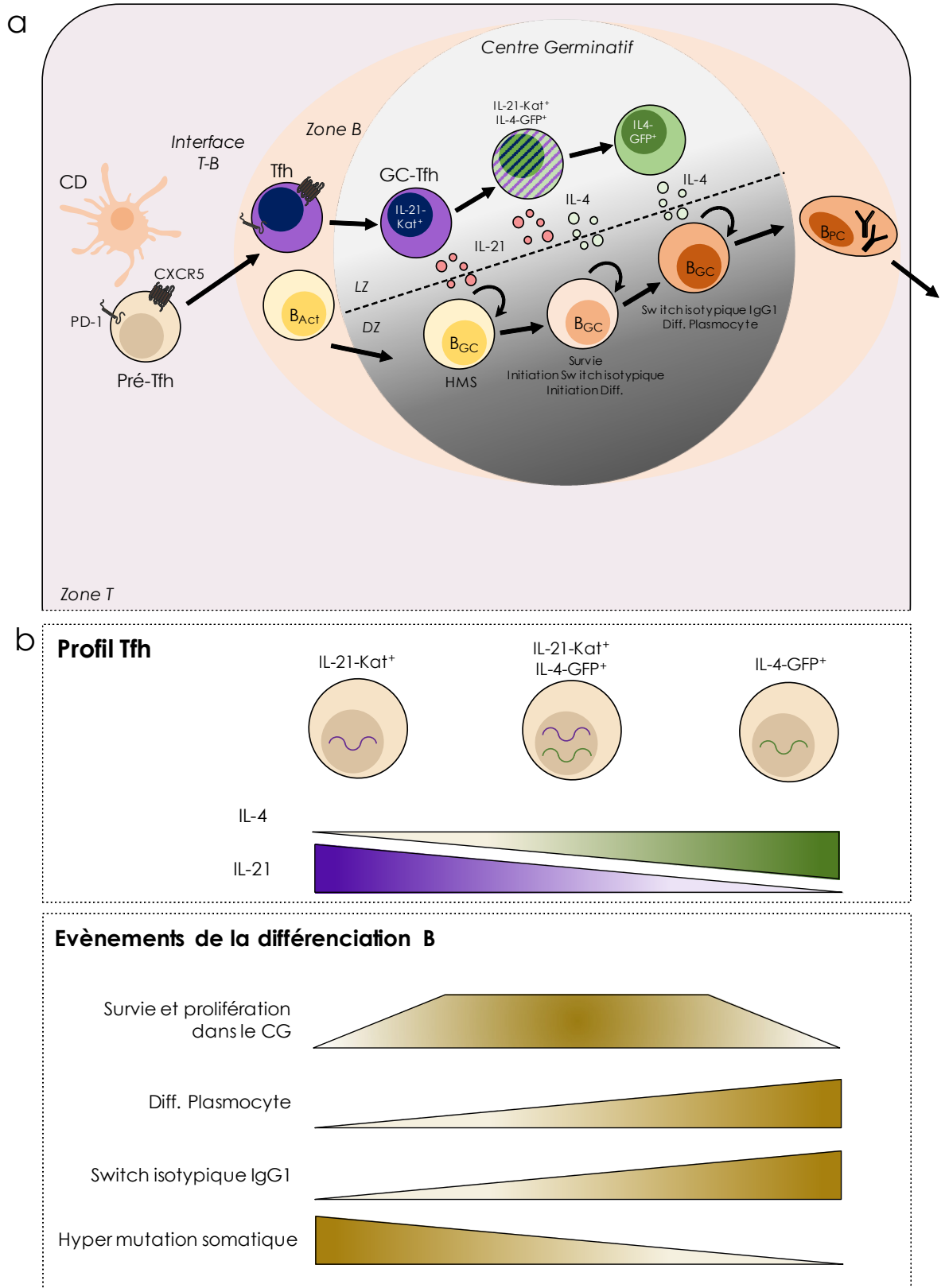


Figure 11 : Acquisition séquentielle de la production d'IL-21 et d'IL-4 par les Tfh des CGs (GC Tfh). Détails page suivante.

Détails de la Figure 11 : (a) Les cellules GC Tfh des souris IL21-IRES-Katushka IL4-IRES-GFP acquièrent pour la première fois l'expression de l'IL-21 – Kat (violet) au début de leur processus de différenciation. Au cours du temps, les GC Tfh IL-21 – Kat⁺ acquièrent l'expression de l'IL-4 – GFP (vert) et finissent par arrêter d'exprimer l'IL-21 – Kat pour ne conserver que l'IL-4 – GFP. Les GC Tfh IL-21 – Kat⁺ IL-4 – GFP⁺ ne sécrètent que de l'IL-21, résident à proximité immédiate de la zone sombre et sont de puissants inducteurs d'hypermutation somatique dans les cellules GC B. Les GC Tfh IL-21 – Kat⁺ IL-4 – GFP⁺ sécrètent de manière asynchrone IL-21 et IL-4. Ils sont situés près de la zone sombre et fournissent une grande variété de signaux d'aide aux cellules B des CGs (survie, changement de classe d'isotype, différenciation en plasmocytes). Les GC Tfh IL-4 – GFP⁺ ne produisent que de l'IL-4, sont les plus éloignées de la zone sombre et délivrent des signaux qui se traduisent par une commutation de classe isotypique et une différenciation plasmocytaire. (b) Cinétiques d'expression d'IL-21 et d'IL-4 dans les lymphocytes Tfh des CGs et leurs impacts séquentiels sur les différentes étapes de développement des lymphocytes B des CGs.
D'après Bélanger et Crotty, 2016.

Les freins au développement et aux fonctions des lymphocytes Tfh limitent fortement les réponses B. Dans le contexte du développement des CGs, les Tfh sont constamment sollicités et exposés aux antigènes étrangers. De ce fait et contrairement aux autres sous-types T CD4⁺, les Tfh ne doivent pas répondre à ces stimuli par une prolifération accrue mais rediriger leur réponse vers les lymphocytes B. Le but premier de la mise en place des CGs n'est pas de promouvoir le développement des Tfh (bien que ce soit le site de la mise en place de ce phénotype lymphocytaire) mais plutôt de permettre une prolifération rapide des lymphocytes B ainsi que la constitution d'un répertoire varié et spécifique d'Ig. Il apparaît que la régulation des voies de signalisation dépendantes du TCR et celles en aval est essentielle à la mise en place d'une balance au sein des Tfh. Cette balance s'opère notamment entre forte sensibilité de reconnaissance des complexes CMH-II/peptide par le TCR des Tfh et prolifération cellulaire contrôlée. Parmi ces points de contrôle commençons par PD-1. Une forte expression membranaire de PD-1 limite la prolifération des GC Tfh. Cette action de PD-1 cible la signalisation liée au TCR. Néanmoins, une disponibilité trop excessive de PD-1 pour son ligand (PD-L1) exprimé à la surface des lymphocytes B, est associée à une perte dramatique des fonctions Tfh (Cubas *et al.*, 2013). Ainsi, une forte proportion de PD-L1 à la surface des lymphocytes B des centres germinatifs est responsable d'une réduction de l'expression d'ICOS et d'IL-21 par les Tfh. Ceci a pour conséquence de limiter l'aide apportée par les Tfh aux lymphocytes B PD-L1^{hi} (Cubas *et al.*, 2013). L'importance des points de contrôle immunitaires (immune-checkpoints) tels que PD-L1 et LAG-3 (ligands respectifs de PD-1 et du CMH-II) sur la prolifération et les fonctions des Tfh a également

pu être observée dans un modèle murin de malaria (infection par *Plasmodium*). Dans ce modèle, l'infection prolongée des animaux mènent à un épuisement lymphocytaire et un défaut d'élimination du pathogène. Ainsi, pour rétablir une réponse immune efficace, les auteurs ont mis en place une stratégie d'immunothérapie basée sur l'injection d'anticorps monoclonaux bloquant l'interaction de PD-L1 et LAG-3 avec leur récepteur respectif présent à la surface des Tfh. Cette thérapie a démontré une augmentation conjointe du nombre de Tfh et de GC B. Succédant cette prolifération cellulaire, une production rapide d'anticorps anti-*Plasmodium* suivi de l'élimination du pathogène a été observée (Butler *et al.*, 2012). Pour résumer, l'aide apportée par les Tfh au développement des lymphocytes B des centres germinatifs est dû à l'action conjointe des cytokines qu'ils sécrètent et des marqueurs membranaires qu'ils expriment à leur surface. Ce sont ces modes de communications intercellulaires qui sont la cible d'une fine régulation. Ainsi, ces mécanismes de régulation peuvent affecter le niveau d'aide pourvu par les Tfh, la composition du cocktail cytokinique produit par ces cellules ainsi que la durée de leur interaction physique avec les lymphocytes B.

5. Physiopathologie des Tfh

Le rôle principal des Tfh est de contrôler la sélection clonale des lymphocytes B des centres germinatifs et de soutenir la synthèse d'immunoglobulines via la régulation de la commutation isotypique et l'hypermutation somatique des Ig. En somme, les Tfh sont impliqués dans la production d'anticorps protecteurs et spécifiques vis-à-vis d'agressions extérieures (virus, bactéries, parasites, allergènes). Ainsi, un défaut dans la régulation des lymphocytes Tfh est impliqué dans un large panel d'immunodéficiences perturbant l'homéostasie du système immunitaire. A ce jour, les Tfh occupent une place prépondérante dans divers désordres immunitaires. On les retrouve notamment impliqués dans la survenue et l'entretien de pathologies tels que le **lupus érythémateux systémique**, le **syndrome de Gougerot-Sjögren**, la **dermatomyosite juvénile** encore le **cancer**. Dans cette dernière pathologie, on distingue un rôle ambivalent des Tfh selon la nature des tumeurs. Alors que dans les **cancers d'origine lymphoïde** les Tfh sont plutôt associés à un mauvais pronostic, leur présence au sein ou en périphérie de **tumeurs « solides » (d'origine non-lymphoïde)**

est associée à un pronostic vital favorable. Dans cette partie, la place occupée par les Tfh dans le contrôle de la croissance tumorale sera abordée sous ces deux aspects.

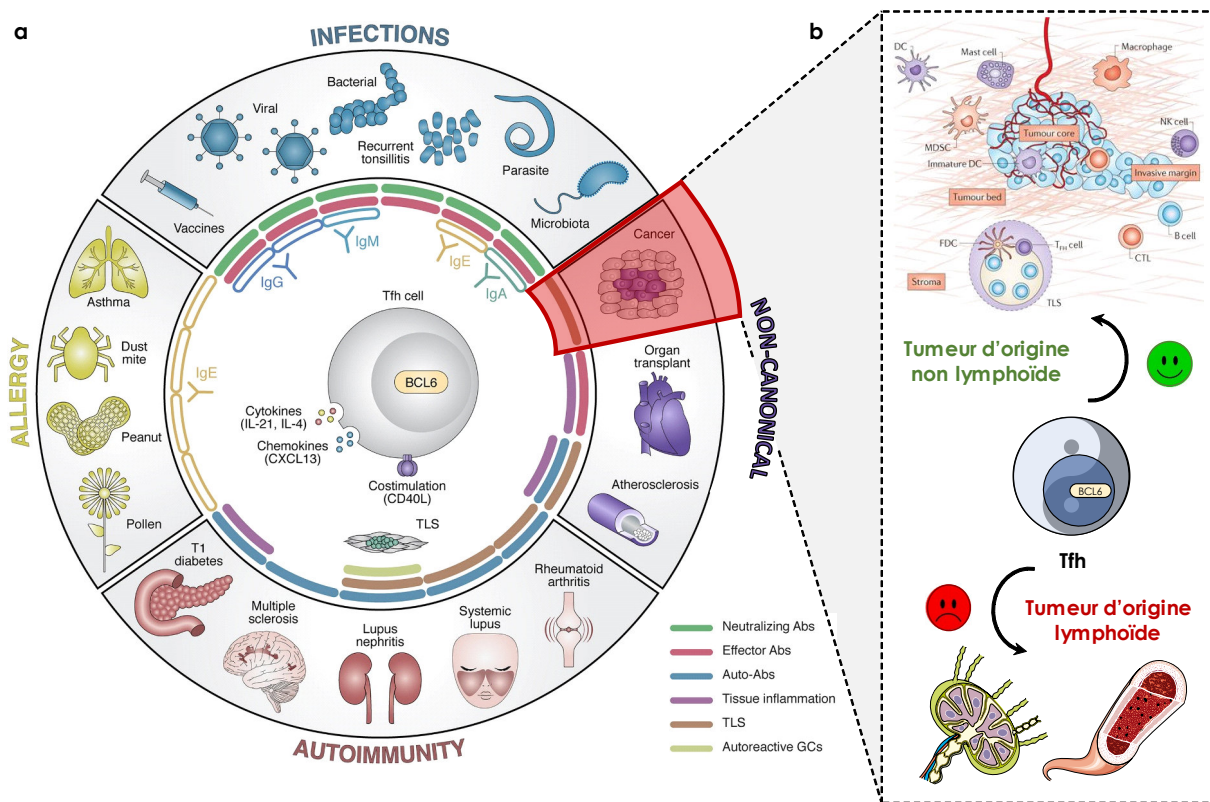


Figure 12 : Représentation schématique des de l'implication des Tfh dans diverses pathologies. (a) Au cours de la dernière décennie, les cellules Tfh ont été associées à un large éventail de maladies. Ceci étant dû au rôle protecteur ou pathogène de ces cellules dans différents contextes. (b) Zoom sur le rôle ambivalent des Tfh dans le context tumoral. Selon l'origine des cellules malignes, l'implication des Tfh sera différente. Son rôle pro- ou anti-tumoral est discuté dans les deux sections suivantes. D'après Crotty, 2019.

5.1. Tumeurs d'origine lymphoïde

De nombreuses études montrent que les Tfh sont impliqués dans les tumeurs d'origines lymphoïdes du fait de leurs impacts important sur la prolifération et la survie des lymphocytes B et d'autres sous-types de leucocytes. Notons que dans le **lymphome T angioimmunoblastique (AITL)**, les cellules T néoplasiques isolées sont phénotypiquement associées au profil Tfh car exprimant les marqueurs ICOS, CD40L, NFATC1 et CXCL13 (de Leval et al., 2007 ; Grogg et al., 2006, Vinuesa et al., 2005).

Le gène *RHOA* est touché par une mutation récurrente et spécifique des **lymphomes T périphériques (PTCL)**, qui entraîne la substitution en position 17 d'une glycine par une valine (G17V). De plus, cette mutation est connue pour induire la différenciation et l'activation des Tfh. Ici, il est suggéré que le développement de lymphome T périphérique dans le cas de mutation visant RoA G17V est liée à l'expansion des Tfh (Cortes *et al.*, 2018). Les mutations des gènes codant pour la TET2 (Ten-eleven-translocation 2) et la DNMT3A (DNA [cytosine-5-]-methyltransferase 3 alpha) ont déjà été observés dans le AITL et le lymphome T périphérique non spécifié (PTCL NOS) (Couronné *et al.*, 2012 ; Lemonnier *et al.*, 2012 ; Quivoron *et al.*, 2011 ; Cairns *et al.*, 2012). Les mutations de TET2 sont associées au phénotype Tfh (Lemonnier *et al.*, 2012). De manière intéressante, il a été rapporté que l'expression de RohA G17V accompagnée de la perte de fonction de TET2 est associée au développement du AITL chez la souris (Cortes *et al.*, 2018).

Dans les **lymphomes T folliculaires**, les lymphocytes T infiltrant présentent un phénotype apparenté au profil Tfh et produisent de l'IL-4, du TNF- α et β , de l'IFN- γ , du CCL17 et du CCL22. Ces médiateurs solubles jouent un rôle dans la régulation de la migration des Treg et Th2 ainsi que dans la modulation de l'activité des CGs. Une population de lymphocytes Tfr a également été retrouvée au sein des follicules néoplasiques. Il a été observé que leur nombre est en augmentation au cours de l'expansion de la maladie. La régulation de la pathologie semble être soumise à l'action d'une balance entre les deux sous-types. Toutefois, la survie des patients semblerait être liée à la localisation de ces cellules. Un mauvais pronostic vital est associé à une localisation folliculaires de Tfr alors qu'une distribution à l'extérieur des follicules semble être associée à un meilleur pronostic (Ochando *et al.*, 2017). Il reste cependant à éclaircir leurs rôles respectifs dans les processus de développement des lymphomes. De manière générale il semblerait que les Tfh soient associés à la progression tumorale dans les cas de tumeurs d'origines lymphoïdes.

5.2. Tumeurs d'origine non-lymphoïde

A l'inverse, dans les tumeurs dites « solides », les Tfh seraient plutôt associés à un bon pronostic chez les patients. Ainsi, dans le **cancer du sein**, les lymphocytes Tfh infiltrent fortement les tumeurs. Leur localisation au niveau des TLS est associée à une diminution des mécanismes d'immunosuppression et est corrélée à l'augmentation

de la survie des patientes (Gu-Trantien *et al.*, 2013). Il semblerait que l'IL-21 et CXCL13 occupent une place clé dans les fonctions protectives des Tfh notamment via la modulation du recrutement immunitaire au site tumoral (Gu-Trantien *et al.*, 2017).

Différentes études ont révélé l'accumulation de lymphocytes Tfh au niveau tumoral dans des cas de **cancer pulmonaire non à petites cellules** (Shi *et al.*, 2014), d'**ostéosarcome** (Xiao *et al.*, 2014) et de **cancer colorectal** (Bindea *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2014). Bien que dans ces cas les auteurs ne font état que de l'hétérogénéité des populations Tfh (Tfh1, Tfh2, Tfh17) infiltrantes, une étude focalisée sur le cancer colorectal associe la présence de Tfh à un bon pronostic vital des patients (Bindea *et al.*, 2013). Dans le cancer du poumon non à petites cellules, une étude révèle la diminution de la proportion de cTfh et de Tfh infiltrant les tumeurs primaires et les sites métastatiques. Dans ces deux cas, ils observent une augmentation de l'apoptose ainsi qu'une diminution de la prolifération des Tfh. Toutefois, après chirurgie, il apparaît que la survie des patients est positivement corrélée à la proportion de Tfh infiltrant les tumeurs (Ma *et al.*, 2016). Dans une autre étude, les auteurs montrent une augmentation des Tfh au niveau tumoral conjointement à une perte de fonctionnalité liée à la diminution de la sécrétion d'IL-21. Cette diminution est surtout observée dans les stades avancés (II et IV). De manière intéressante, les auteurs attribuent l'augmentation de Tfh avec l'expansion de Tfh2-PD-1⁺ et Tfh17-PD-1⁺. De plus, ils observent l'initiation de la différenciation de lymphocytes B régulateurs par les Tfh. Enfin, ils établissent une corrélation négative entre la survie sans progression après chirurgie et le taux de Tfh1 (Qiu *et al.*, 2018). Dans une autre étude, une augmentation des cTfh et cTfr (Tfr circulants) a été observé. Néanmoins, concernant les cTfh, aucune relation avec le stade des patient n'a pu être établi (Guo *et al.*, 2017).

Dans le **carcinome hépatocellulaire**, plusieurs études font état de la corrélation entre Tfh et survie des patients. Un faible taux de Tfh est associé à une faible survie sans progression et une faible survie globale des patients (Jia *et al.*, 2015) Chez les patients ayant développés un hépatocarcinome faisant suite à une infection par le virus de l'hépatite B, une augmentation des cTfr a été observé et est associée à l'entretien de l'infection chronique par le virus (Wu *et al.*, 2018). Dans ce même contexte, une autre étude révèle une modification dans la composition en sous-populations cTfh et dans leurs fonctions IL-21 dépendantes. Les auteurs observent une augmentation de la proportion en Tfh2 et une diminution en Tfh1 et Tfh17 ainsi qu'une diminution du taux d'IL-21 intratumoral. Enfin ils mesurent une augmentation sérique en CXCL13 après

chirurgie ainsi qu'une augmentation du pourcentage de cellules CXCR5⁺ CXCL13⁺ au site de tumeurs faiblement différenciées comparativement aux tumeurs plus fortement différenciées. Ici, il est proposé que CXCL13 pourrai représenter un biomarqueur prédictif de meilleur pronostic (Duan *et al.*, 2015). Dans une autre étude, les auteurs établissent une corrélation positive entre l'épuisement des Tfh chez les patients atteint de carcinome hépatocellulaire et le niveau d'expression membranaire de PD-1 (Tfh) et PD-L1 (cellules tumorales). La fonction des Tfh est également impactée en ce sens où les niveaux d'expression des cytokines effectrices IL-10 et IL-21 des Tfh sont inversement corrélés au niveau d'expression membranaire de PD-L1 des tumeurs. Par le biais d'interaction engageant le couple PD-1/PD-L1 les tumeurs contrôlent ainsi le développement et l'action des Tfh dans ce type de cancer (Zhou *et al.*, 2016). Un rôle pro-tumoral des Tfh a également été révélé. Les auteurs identifient une population de cellules T CD4⁺ IL21⁺ tissus résidents, de phénotype membranaire CXCR5⁻ PD-1⁻ BTLA⁻ CD69^{hi}. Il démontre que le développement de plasmocytes induit par l'IL-21 et l'IFN- γ produits par les Tfh favorise la mise en place d'une polarisation M2 des TAMs (Chen *et al.*, 2016). Enfin, un nouveau mécanisme par lequel les hépatocytes infectés par le virus de l'hépatite C exacerbent les réponses Tfr a été révélé. Dans cette étude, il a été observé que les exosomes hépatiques jouent un rôle central dans l'accumulation de Tfr et dans la suppression des réponses dépendantes des Tfh. Ces données décrivent un mode d'action pouvant entrer en jeu dans l'établissement et le contrôle de la carcinogenèse hépatocellulaire par les Tfh (Cobb *et al.*, 2018).

Enfin, dans un modèle de **mélanome murin**, il a été démontré que le traitement des tumeurs par cryothérapie permet de réduire la masse tumorale et de prolonger la survie à long terme des animaux sans apparition de métastases pulmonaires. Une réduction du pourcentage de Treg et de MDSC dans la rate, les poumons et le sang a également été observée. Cette méthode de cryothérapie a permis d'accroître les fonctions cytolytiques des lymphocytes T CD8⁺ et leur polarisation en lymphocytes T CD8⁺ cellules souches mémoires (CD8⁺ T cells into memory stem T cell (T_{SCM})) ainsi que la différenciation des T CD4⁺ en Th1 et Tfh. Ces cellules ont été identifiées dans le sang 90 jours après traitement (He *et al.*, 2017).

Partie IV. Thérapies anti-tumorales : place du système immunitaire

1. Prémices des traitements anti-tumoraux

Depuis l'Égypte ancienne jusqu'à la fin de XIX^{ème} siècle les traitements anti-cancéreux étaient basés sur un **mode de vie sain**, la pratique de la **cautérisation** (destruction des cellules anormales par la chaleur) et sur l'emploi de **techniques chirurgicales** pour les différentes formes de tumeurs superficielles. Toutefois, pour les formes les plus graves et incurables, des **traitements palliatifs** à base d'extraits de pavot (*Papaver somniferum*) étaient prescrits afin de soulager les douleurs (Faguet, 2015). Introduite par Hippocrate et affinée par Galien (129-216 ap J.C.), la théorie de l'origine des tumeurs fut la base de la réflexion des traitements anti-tumoraux. Dans ses écrits, Galien décrits les premières **stratégies chirurgicales** dans le traitement des tumeurs (Galen, 1565 ; Papavramidou *et al.*, 2010 ; Hajdu, 2016).

On considère actuellement que l'oncologie moderne est née au cours du XVIII^{ème} siècle durant lequel les premières études des effets carcinogènes de certaines substances ont été réalisées. Depuis le XVI^{ème} siècle et jusqu'à la fin du XIX^{ème} siècle, l'oncologie moderne a subi une révolution sans précédent en termes de prise en charge des patients, notamment grâce aux avancées **anatomiques, biologiques** et **épidémiologiques** des tumeurs.

Malgré ces avancées majeures, les approches médicales et thérapeutiques d'avant la seconde guerre mondiale se bornaient à l'emploi de méthodes radicales visant à juguler le développement de la maladie et la formation de métastases. Ainsi, les **interventions chirurgicales** représentaient le plus souvent la seule alternative thérapeutique malgré le traumatisme physique généré, l'inefficacité de la résection totale des tumeurs et le bénéfice limité chez les patients atteints de cancers avancés (Hajdu, 2011 ; Hajdu et Vadmal, 2013).

De nos jours, l'exérèse de tumeur (tumorectomie) représente encore le premier traitement effectué après le diagnostic de la tumeur. Toutefois d'autres stratégies peuvent être mises en œuvre telles que la radiothérapie ou la chimiothérapie afin d'augmenter les chances d'élimination des cellules tumorales.

2. Avancées thérapeutiques anti-cancéreuses : Radiothérapie, Chimiothérapies et Hormonothérapie

2.1. Radiothérapie

L'intérêt de la radiothérapie réside dans son mode d'action. L'utilisation de rayonnements électromagnétiques focalisés tels que les rayons X ou gamma permet de détruire les cellules cancéreuses. Les particules élémentaires générées traversent la peau et les tissus superficiels afin de créer des altérations de l'ADN (cassures simple/double brin et modifications de bases) et mener à la mort des cellules ciblées. Une limite majeure de cette stratégie thérapeutique réside dans le degré de modifications induites dans les cellules cibles. En cas d'altérations insuffisantes, les cellules ciblées peuvent présenter des modifications fonctionnelles et structurelles. Cette limite est d'autant plus importante que cette technique de traitement loco-régionale peut toucher les cellules saines avoisinantes. Ainsi, l'avènement de la radiothérapie moderne ne commence qu'en 1920 grâce à la mise au point par Claudius Regaud du fractionnement de la dose d'irradiation dans le traitement de divers cancers humains, réduisant ainsi les effets secondaires néfastes du traitement lui-même (Deloch *et al.*, 2016 ; Moulder et Seymour, 2017). L'efficacité de cette stratégie thérapeutique réside donc dans la maîtrise de la quantité des rayonnements utilisés.

2.2. Chimiothérapie

Un nouveau virage dans l'histoire des traitements anti-tumoraux a été entrepris dans les années 1940 : c'est l'avènement de la chimiothérapie. Cette stratégie consiste en l'emploi de composés cytotoxiques ciblant les cellules en prolifération à différents stades du cycle cellulaire.

Ainsi, on répertorie différentes classes et effets de composés :

- Les agents alkylants, dont le **gaz moutarde**, sont les premiers composés à avoir ouvert la voie pour ce domaine thérapeutique. Le premier essai clinique sur l'efficacité thérapeutique de l'utilisation de gaz moutarde a été considéré comme la première stratégie de chimiothérapie anticancéreuse de l'histoire

de l'oncologie moderne (Goodman and Wintrobe, 1946 ; Rhoads, 1946 ; Faloon and Gorhan, 1948). Ces composés forment des liaisons covalentes avec les nucléotides de la chaîne ADN et inhibent ainsi la réplication. Parmi cette classe d'agents anti-cancéreux on peut citer la **méchloréthamine**, le **cyclophosphamide** ou encore les **sels métalliques** (cisplatine) (Puyo *et al.*, 2014).

- Les anti-métabolites ont été développés sur la base de l'utilisation de molécules mimant la structure de métabolites physiologiques et ont pour finalité d'inhiber la prolifération cellulaire. On y retrouve les **analogues foliques** (aminoptérine et méthotrexate) (Farber *et al.*, 1948 ; Thiersch, 1949 ; Meyer *et al.*, 1950), les **analogues de base puriques** (Adénine et Guanine) (6-mercaptopurine) (De Abreu *et al.*, 2000 ; Wei *et al.*, 2018) et les **analogues de bases pyrimidiques** (Tyrosine, Uracile et Cytosine) (5-fluorouracile (5-FU), gemcitabine, capécitabine) (De Abreu *et al.*, 2000 ; Wei *et al.*, 2018 ; Kaye, 1998 ; Tiwari, 2012).
- Les antimitotiques d'origine naturelle sont utilisés dans le traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides. Ces composés perturbent la formation des microtubules et inhibent de ce fait les mécanismes mitotiques nécessaires à la prolifération cellulaire (van Vuuren *et al.*, 2015). Parmi ceux-ci, on trouve la **vinblastine**, ou la **vincristine**. Une autre classe de poison du fuseau (stabilisateurs des microtubules) a également été décrite : les **taxanes** (paclitaxel, et docetaxel) (Oberlies and Kroll, 2004). On retrouve également des inhibiteurs de topoisomérase I et II tels l'**irinotécan** et les **téniposide** (VM-26) et **étoposide** (VP-16).
- Les antibiotiques cytotoxiques présentent une activité cytotoxique basée sur des mécanismes d'interaction avec l'ADN notamment par la formation de liaisons covalentes avec les acides nucléiques. Ces interactions perturbent fortement la synthèse d'ADN. La **puromycine**, analogue d'adénine, les **dérivées d'anthracycline**, inhibiteur de topoisomérase II (Hortobagyi, 1997) et la **bléomycine** (Kersten *et al.*, 1966) sont des membres de cette autre famille de composés utilisés en chimiothérapie

- Les inhibiteurs de polyamines permettant de cibler la prolifération et la croissance tumorale (Miller-Fleming *et al.*, 2015). On peut citer l'**α-difluoromethylornithine** (DFMO) un **analogue d'ornithine décarboxylase**, inhibiteur de la synthèse de putrescine (Abdel-Monem *et al.*, 1974 ; Bacchi *et al.*, 1980 ; Dunzendorfer, 1981 ; Gerner and Meyskens, 2004 ; Damiani and Wallace, 2018 ; Muth *et al.*, 2014).
- Les chélateurs des ions fer s'inscrivent dans le contrôle de l'homéostasie du fer intracellulaire. On y retrouve la **desferrioxamine (DFX)** (Cao *et al.*, 2018), les **di-2-pyridylkenone-4,4,-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT)**, **ciclopirox**, **déferacirox** et **triapine** (Fischer-Fodor *et al.*, 2015).

Bien que la découverte et le développement de ces composés aient révolutionné la prise en charge et le traitement des cancers, leurs effets secondaires néfastes représentent une limite importante dans les stratégies thérapeutiques. Ces effets indésirables sont liés au mode d'action des composés employés. Ils ciblent majoritairement les cellules en prolifération telles que les cellules cancéreuses mais également plusieurs types cellulaires sains à fort pouvoir de renouvellement (celles de la moelle osseuse, des cheveux, de la peau, intestins, etc.).

2.3. Hormonothérapie

Dans le cas de cancers hormonosensibles (ou hormonodépendants) la stratégie thérapeutique consiste à rendre inopérantes les hormones qui influencent la croissance tumorale. Pour cela, les traitements mis en place emploient des antagonistes d'hormones en se fixant sur leurs récepteurs naturels. Dès lors, les hormones ne peuvent plus agir sur la prolifération des cellules cancéreuses. Dans le **cancer du sein**, des **anti-oestrogènes** tels que le **tamoxifène** sont prescrits. Dans le cadre du **cancer de la prostate** l'emploi d'**anti-androgènes** visent à inhiber l'action de la testostérone. Cette stratégie thérapeutique est le plus souvent associée à d'autres traitements tels que la chirurgie et la radiothérapie.

3. Thérapies ciblées

Notre époque voit l'avènement d'une médecine de précision employant de nouvelles petites molécules inhibitrices ciblant spécifiquement certains acteurs moléculaires impliqués dans les mécanismes de prolifération cellulaire. On note le développement de thérapies ciblées agissant sur des anomalies oncogéniques responsables à elles seules de la survie anormale d'une cellule. Ces cibles sont multiples : oncogènes clés, gènes suppresseurs de tumeur ou récepteur de facteurs de croissances sont impliquées dans la promotion de la croissance tumorale. De plus, ces nouveaux composés et cette nouvelle stratégie de traitement offre un avantage notable en terme de réduction d'effets secondaires (Hartmann *et al.*, 2009). On utilise le terme de « thérapie ciblée » pour qualifier ce type de stratégie thérapeutique.

Le début des années 1990 voit émerger l'emploi d'anticorps monoclonaux dans les thérapies ciblées. Le **Trastuzumab (Herceptin®)**, anticorps monoclonal ciblant spécifiquement le récepteur HER2/neu, le **Rituximab (Rituxan® et MabThera®)** et le **Tositumomab (Bexxar®)** ciblant spécifiquement le récepteur CD20 majoritairement exprimé à la surface des lymphocytes B, le **Cetuximab (Erbix®)** et le **Panitumumab (Vectibix®)** anti-EGFR, le **Bevacizumab (Avastin®)** antiangiogénique ciblant le VEGF-A, mais également l'**Ofatumumab (Arzerra®)** l'**Alemtuzumab (Campath®)** et le **Catumaxomab (Removab®)** sont utilisés dans le traitements de nombreux types de cancers.

Les limites des thérapies ciblées sont de différents types : il peut s'agir de toxicités cutanées, cardiaques, hématologiques, de troubles digestifs ou encore de toxicités ophtalmiques. Certains effets sont différents de ceux induits par la chimiothérapie conventionnelle et dépendent de la cible visée par le médicament.

4. Immunothérapie anti-tumorale

Les premières utilisations de stratégies d'immunothérapie cherchaient à cibler le système immunitaire de façon directe (BCG-thérapie, IL-2, IFN- α , vaccin thérapeutique anti-cancer APC8015 (Provence)). Aujourd'hui les nouvelles approches d'immunothérapie reposent sur la levée de mécanismes d'immunosuppression présents dans le microenvironnement tumoral, permettant ainsi d'activer secondairement le système immunitaire. De très nombreux mécanismes régulateurs

ont été décrits. Ils regroupent l'échappement tumoral *via* la perte de reconnaissance par le système immunitaire, la résistance des cellules tumorales vis-à-vis de l'activité cytolytique du système immunitaire ou la production de médiateurs/enzymes inhibant la réponse immunitaire (TGF- β , IDO, IL-10), ainsi qu'au recrutement de cellules immunosuppressives (Treg, MDSCs, TAMs M2). *Via* les mécanismes d'immunosuppression, les cellules cancéreuses manipulent le système immunitaire en estompant son action anti-tumorale. Un dernier mécanisme qui détourne et limite l'action bénéfique du système immunitaire réside dans l'augmentation de récepteurs membranaires inhibiteurs également appelés **points de contrôle immunitaire (« immune checkpoint »)**. D'un point de vue physiologique, ces récepteurs sont engagés dans les processus de régulation de la réponse immune après stimulation. Dans le contexte tumoral, la persistance de ces récepteurs mène au blocage fonctionnel et à l'épuisement des lymphocytes T (Zarour *et al.*, 2016). C'est ce dernier mécanisme qui est la cible d'une grande partie de l'attention des recherches actuelles. La levée de ce mécanisme d'immunosuppression *via* le ciblage des points de contrôle immunitaire a permis au domaine de l'immunothérapie de démontrer toutes ces potentialités cliniques (Topalian *et al.*, 2015).

Malgré la diversité des différentes stratégies employées, les immunothérapies dites non spécifiques, actives et adoptives ne montrent qu'une efficacité limitée. Ceci peut s'expliquer par l'activation massive du système immunitaire vis-à-vis de la tumeur. Le risque majeur encouru dans ce type de thérapie est le développement d'inflammation chronique et incontrôlée qui d'autre part favorise le maintien de la croissance tumorale. Toutefois, le système immunitaire met naturellement en place un système de régulation des cellules engagées dans la réponse immune. Les « immune-checkpoints », récepteurs membranaires inhibiteurs, limitent l'emballement des réponses immunitaires en bloquant l'activité des cellules participant à une réponse donnée. Néanmoins, dans un contexte de cancer, alors que les réponses cytotoxiques vis-à-vis des cellules tumorales sont grandement nécessaires pour leur élimination, l'engagement de ces récepteurs abolit cet effet bénéfique. Ainsi, après leur découverte, leur caractérisation et la mise en évidence de leurs rôles dans l'entretien de la croissance tumorale, les recherches se sont focalisées sur le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant ces récepteurs.

4.1. Immune-checkpoint : mode d'action

Les « immune-checkpoints » sont des récepteurs qui interviennent dans la modulation de l'activation des cellules immunitaires. Ils sont présents à la surface de certaines cellules immunitaires effectrices afin de moduler la durée et l'intensité de la réaction immune. Deux grandes familles de récepteurs coexistent à la surface d'une même cellule. On retrouve des **récepteurs co-activateurs** renforçant l'activation des cellules (ICOS, OX40, GITR, CD137, CD27) et des **récepteurs co-inhibiteurs** réduisant l'activation cellulaire (PD-1, CTLA-4, VISTA, LAG-3, TIM-3, TIGIT). L'initiation de l'activation d'une cellule immunitaire est donc gouvernée par une balance complexe entre signaux activateurs et inhibiteurs. De ce fait, après reconnaissance du complexe CMH/peptide via son TCR, le lymphocyte T ne sera activé que si les différents signaux provenant de ces points de contrôle sont en faveur d'une activation. D'un point de vue physiologique, les récepteurs inhibiteurs sont essentiels afin de prévenir le risque d'auto-immunité et d'emballement de la réaction immune. Les récepteurs activateurs permettent quant à eux de soutenir l'activation du système immunitaire en cas d'infection.

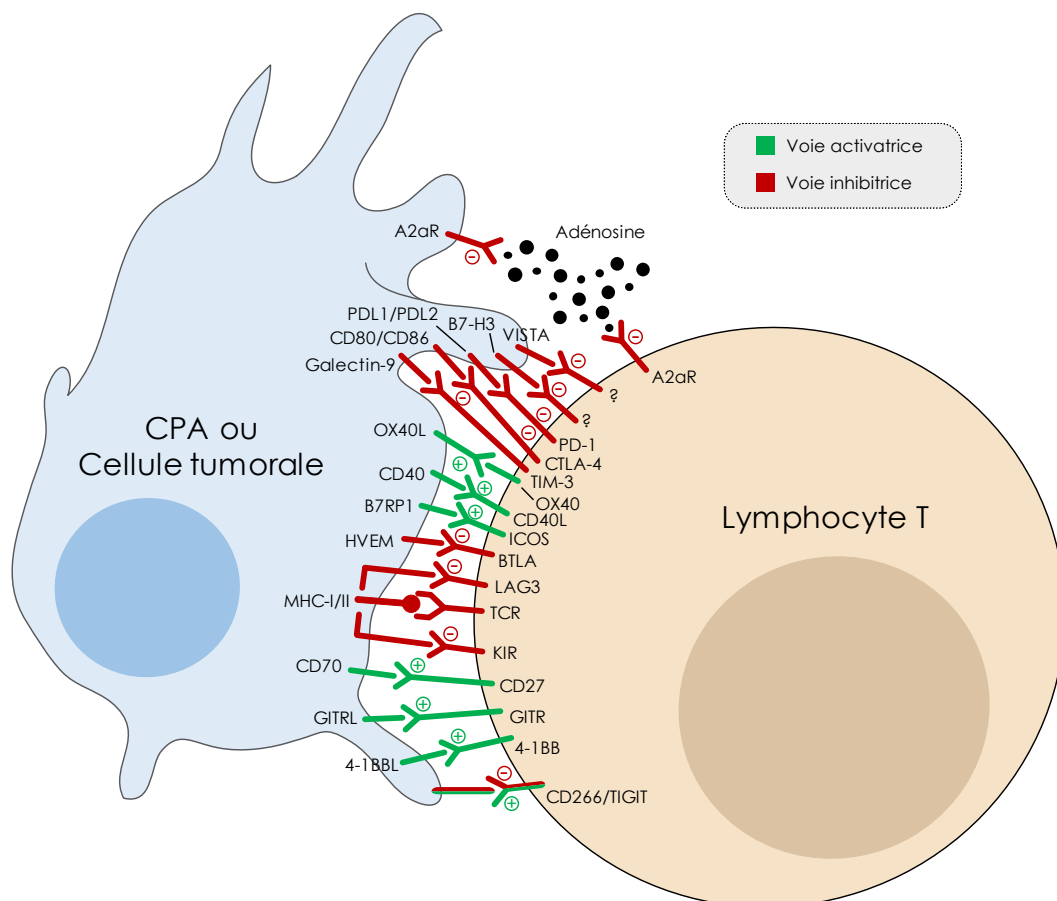


Figure 13 : Engagement des co-récepteurs immunitaires inhibiteurs et activateurs lors d'interactions impliquant des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) ou des cellules tumorales avec des lymphocytes T au sein du microenvironnement tumoral.

D'après Marin-Acevedo et al., 2018.

Dans un contexte tumoral, les cellules cancéreuses, par le biais de l'expression des ligands des récepteurs inhibiteurs, sont capables de détourner le système immunitaire à leur avantage et d'échapper à son contrôle.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'anticorps anti-immune checkpoint inhibiteurs (récepteurs et ligands) a permis de renverser l'immunosuppression induite par la tumeur. Les cibles majeures des traitements actuellement utilisés en clinique sont CTLA-4 (première cible historique) et le couple PD-1/PD-L1.

4.2. Immunothérapie ciblant les immune checkpoints (monothérapie)

CTLA-4

CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4, CD152), fut le premier récepteur inhibiteur à avoir été identifié (Brunet *et al.*, 1987) et la première cible thérapeutique anti-checkpoint à avoir été utilisée en oncologie. On retrouve ce récepteur à la surface des lymphocytes T (CD4⁺ et CD8⁺). Son rôle principal est de réguler l'amplitude de la signalisation induite par CD28. Il intervient donc précocement dans l'activation du lymphocyte T. L'adressage de CTLA-4 à la membrane du lymphocyte T est initié par la signalisation du TCR après reconnaissance du complexe CMH/peptide. CTLA-4 interagit avec les mêmes ligands que CD28 (CD80/B7.1 ou CD86/B7.2). Toutefois, l'affinité de CTLA-4 pour ces derniers est plus importante que celle de CD28 (Linsley *et al.*, 1994). Ainsi, la fixation de CTLA-4 à la place de CD28 mène à l'inhibition des signaux d'activation par l'intermédiaire de phosphatases régulant négativement les signalisations liées au TCR et à CD28 (Rudd *et al.*, 2009). CTLA-4 est un modulateur précoce de l'activation lymphocytaire en ce sens où la quantité de CTLA-4 produite et adressée à la membrane est proportionnelle à l'intensité de la signalisation du TCR.

D'un point de vue clinique, l'**ipilimumab (Yervoy®)** est le premier agent thérapeutique basé sur l'emploi d'anticorps monoclonaux ciblant les immune checkpoints. Son utilisation a été approuvée par la Food And Drug Administration (FDA) et l'European Medicines Agency (EMA) en 2011 dans le cadre du traitement du mélanome métastatique. Un autre anticorps thérapeutique ciblant CTLA-4 a été développé, le **tremelimumab (MedImmune/AstraZeneca)**. Il a été évalué dans le mélanome, le

cancer colorectal et dans le mésothéliome. Néanmoins, par manque d'efficacité en termes de survie globale, les traitements par tremelimumab furent rapidement arrêtés et l'anticorps ne reçut pas d'approbation par la FDA.

PD-1/PD-L1/2 :

PD-1 (Programmed cell Death-1, CD279)

PD-1 est exprimé à la surface des lymphocytes T (CD4⁺ et CD8⁺), B, des cellules NK et de certaines cellules myéloïdes (CDs, monocytes). La voie de signalisation liée à PD-1 est une autre voie de rétrocontrôle négatif de l'activation cellulaire. La voie PD-1 complète les signaux liés à CTLA-4. Contrairement à ces derniers qui interviennent précocement lors de l'activation lymphocytaires, la signalisation PD-1 est plus tardive et est déclenchée dans les tissus périphériques ou dans le microenvironnement tumoral. PD-1 agit lors de la phase effectrice de la cellule, en contact notamment avec la tumeur. Les voies de signalisation du TCR et de CD28 initient et soutiennent respectivement l'induction de l'expression de PD-1. Le microenvironnement cytokinique joue également un rôle dans l'initiation de son expression, notamment grâce à l'action de l'IFN- γ , l'IL-2, l'IL-7, l'IL-15 et l'IL-21.

La deuxième génération d'anticorps anti-immune checkpoint a donc ciblé le récepteur inhibiteur PD-1. On retrouve notamment le **nivolumab (Opdivo®)** qui a offert de très bon résultats dans le mélanome et le cancer bronchique comparativement à une stratégie de chimiothérapie classique (dacarbazine et docétaxel respectivement). Depuis ces premiers essais, le nivolumab a reçu son autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2014 dans le cadre du traitement du mélanome métastatique et en 2015 pour les cancers bronchiques non à petites cellules et du rein. D'autres anticorps anti-PD-1 ont également vues le jour tel que le **pembrolizumab (Keytruda®)** dans le mélanome métastatique, le **pidilizumab (CT-011)** dans les hémopathies malignes (lymphome folliculaire et leucémies aiguës myéloblastiques), le **MEDIO680 (AstraZeneca)** dans le cancer rénal et l'**AMP-224** dans le cancer colorectal.

PD-L1 (Programmed cell Death Ligand-1, CD279) et PDL-2 (Programmed cell Death Ligand-2, CD274)

PD-1 présente deux ligands naturels, PD-L1 (B7-H1) et PD-L2 (B7-DC). D'un point de vue physiologique, ces ligands ne sont pas exclusivement portés par les CPAs comme pour

CTLA-4 mais peuvent être exprimés par les lymphocytes T activés eux-mêmes, par les cellules myéloïdes mais également par des cellules non hématopoïétiques telles que les cellules endothéliales et épithéliales saines ou tumorales. Toutefois, l'expression de PD-L2 est un peu plus restreinte et se limite principalement aux CD8 et cellules cancéreuses (Freeman *et al*, 2000; Latchman *et al*, 2001; Obeid *et al*, 2016). Grâce à l'analyse des tumeurs, il a été observé que la voie PD-1/PD-L1 est souvent utilisée par les tumeurs afin d'échapper à l'action du système immunitaire. On retrouve PD-L1 à la surface des cellules tumorales de cancers avancés et est associée à un moins bon pronostic pour les patients (Ghebeh *et al*, 2006; Kim *et al*, 2013a).

L'utilisation d'anticorps dirigés contre ces ligands va permettre de juguler l'action inhibitrice du récepteur inhibiteur PD-1. En levant ce frein, on empêche de bloquer le système immunitaire et on réactive une réponse immunitaire anti-tumorale précédemment « endormie ». Dans la lignée des anti-CTLA-4 et anti-PD-1, on retrouve différents anticorps monoclonaux à visée thérapeutiques dirigés contre PD-L1. L'**atézolizumab (Tecentriq®)** a été testé dans les cas de cancers bronchiques non à petites cellules et rénaux et dans les carcinomes urothéliaux locaux, avancés ou métastatiques, le **BMS-936559 (MDX-1105)** qui a montré des réponses objectives dans le mélanome et les cancers bronchiques non à petites cellules, de l'ovaire et du rein (Brahmer *et al.*, 2012), le **durvalumab (MEDI4736)** pour les cancers de la tête et du cou (Fury *et al.*, 2014) et en développement pour le cancer bronchique non à petites cellules, le **MPDL3280A** offrant un bon taux de réponses objectives dans le cancer bronchique non à petites cellules et le mélanome (Herbst *et al.*, 2014) est en cours d'évaluation dans les cas de cancers du rein et de la vessie métastatique et enfin l'**avelumab (MSB0010718C)** actuellement en développement dans le cancer bronchique non à petites cellules.

Cf. **Annexe 2**, liste exhaustive des immunothérapies anti-CTLA-4 et PD-1/PDL-1 approuvées par la FDA (mise à jour octobre 2018).

Autres

CTLA-4, PD-1 et ses ligands ne sont pas les seuls checkpoints immunitaires à pouvoir être ciblés et faire l'objet d'études cliniques. Les autres corécepteurs activateurs (CD137, ICOS, GITR, OX40) comme inhibiteurs (TIM-3, LAG-3, VISTA) sont également pris pour cible dans les recherches actuelles (**Figure 13**). On observe notamment le

développement d'anticorps ciblant les checkpoints inhibiteurs **LAG-3** et **TIM-3**. Ces deux molécules sont exprimées par les lymphocytes T épuisés PD-1⁺. Ces anticorps semblent augmenter l'effet des anti-PD1 dans des modèles précliniques (Woo *et al.*, 2012 ; Sakuishi *et al.*, 2010).

4.3. Combinaisons thérapeutiques

Combinaisons d'inhibiteurs d'immune checkpoint

Des études précliniques dans plusieurs modèles de cancers murins et des études cliniques chez l'Homme ont démontré l'efficacité anti-tumorale de l'association **anti-CTLA-4** (ipilimumab) et **anti-PD-1** (nivolumab) (Uno *et al.*, 2006 ; Curran *et al.*, 2010). Afin d'expliquer cette efficacité de combinaison thérapeutique, il a été avancé que ces anticorps présentent une action synergique en permettant l'amplification de la prolifération des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes, favorisent leur infiltration tumorale, leur action effectrice (Ribas, 2012) et d'autres permettent l'élimination des lymphocytes Treg (Peggs *et al.*, 2009).

Les anticorps ciblant les checkpoints inhibiteurs **LAG-3** et **TIM-3** semblent augmenter l'effet des anti-PD1 dans des modèles précliniques (Woo *et al.*, 2012 ; Sakuishi *et al.*, 2010). Plus récemment, le récepteur **TIGIT** a été décrit comme un nouveau checkpoint. Des études précliniques employant des stratégies de combinaison anti-TIGIT et anti-PD-1/PD-L1 démontrent une potentielle synergie de ces candidats thérapeutiques (Johnston *et al.*, 2014).

Parmi les immune checkpoints activateurs, on observe le développement d'une nouvelle classe de stratégie d'immunothérapie. Des anticorps activateurs anti-**CD137**, **GITR**, **CD40** ou encore anti-**CD134** montrent un effet thérapeutique synergique avec des anti-PD1 chez la souris. Un de ces agonistes, l'anticorps anti-CD137 (4-1BB), a été testé en phase I mais cette étude a été interrompue parce que des cas d'hépatotoxicité sévères ont été observés (Ascierto *et al.*, 2013).

Autres combinaisons

L'association de checkpoints inhibiteurs et de chimiothérapies dites immunogènes ou de chimiothérapies immuno-modulatrices permet d'éliminer les cellules immunosuppressives afin d'induire ou d'amplifier une réponse immunitaire anti-

tumorale. Ces stratégies ont pour but de transformer les tumeurs dites froides de type II, III et IV (respectivement PD-L1⁻ sans TILs indiquant une ignorance immunitaire, PD-L1⁺ sans TILs indiquant une induction intrinsèque, PD-L1⁻ avec TILs indiquant le rôle d'autres voies suppressives dans la promotion de la tolérance immunitaire) en tumeur chaude de type I (PD-L1⁺ avec TILs conduisant la résistance immunitaire adaptative), ou d'augmenter son efficacité pour des maladies où l'immunothérapie en monothérapie fonctionne (tumeur de type I). Ces stratégies commencent à se développer notamment dans les cancers bronchiques. Des essais cliniques suggèrent des effets positifs des combinaisons de checkpoints inhibiteurs et de chimiothérapies. Dans des études de phase II, des améliorations de survie sans progression et de survie globale de patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules ont été observé dans des stades avancés (III/IV) (Lynch *et al.*, 2012 ; Rizvi *et al.*, 2016) (anti-CTLA-4 ; anti PD-1/PD-L1). Un autre exemple d'étude de phase II montre l'association de carboplatine (agents alkylants) et de pemetrexed (anti-métabolite) avec ou sans pembrolizumab (anti-PD-1) comme traitement de première ligne métastatique. Cette combinaison a montré une supériorité de l'association chimiothérapie et immunothérapie (Langer *et al.*, 2016).

En plus des associations de chimiothérapies et d'inhibiteurs d'immunes checkpoints, on retrouve d'autres types de combinaisons thérapeutiques ciblant les processus de croissance et prolifération tumorale telles que :

- Inhibiteurs d'immunes checkpoints + inhibiteurs de VEGFR
- Inhibiteurs d'immunes checkpoints + inhibiteurs de la voie MEK (inhibiteur de BRAF)
- Inhibiteurs d'immunes checkpoints + inhibiteurs de poly (ADP-ribose) polymérase (PARP)
- Inhibiteurs d'immunes checkpoints + radiothérapie

Cf. **Annexe 3**, liste non exhaustive d'autres combinaisons thérapeutiques utilisant les inhibiteurs d'immunes checkpoints et **Annexe 4**, liste exhaustive des thérapies ciblées (immunothérapies et autres) approuvées par la FDA et employées dans le traitement de 29 types de cancers différents (<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies/targeted-therapies-fact-sheet>).

4.4. Nouvelles stratégies

D'autres approches thérapeutiques ciblant le système immunitaire sont étudiées. Ces approches sont multiples et donneront peut-être lieu au développement de standards thérapeutiques. Parmi ces approches on peut lister :

- La modulation de l'activité des cellules de l'immunité innée (NK, TAM et CD40) :

Le développement d'anticorps anti-récepteur inhibiteur de cellules NK **KIR2DL1-3 (lirilumab)** est en cours. Le lirilumab est actuellement en cours d'évaluation en phase I/II en association avec le nivolumab (anti-PD-1) dans des cas de cancers de la tête et du cou. De la même manière, un agoniste de **CD40L (Recombinant Human CD40 Ligand, rhuCD40L)** est en cours de développement. CD40, le récepteur de CD40L est majoritairement exprimé à la surface des CPA, des lymphocytes B, des cellules non hématopoïétiques et des cellules tumorales. CD40L, principalement retrouvé à la surface des lymphocytes T activés permet via l'interaction avec son récepteur d'activer les CPA, d'augmenter l'expression des molécules de co-stimulation et de CMH, la production de cytokines pro-inflammatoires, l'activation des TAM M1 et l'induction de l'apoptose par les cellules tumorales (Vonderheide *et al.*, 2013).

Concernant les cellules NK, un autre anticorps anti-CD94/NKG2D (récepteur activateur), le monalizumab, est actuellement en cours d'évaluation. Cet anticorps cible l'interaction entre NKG2D exprimé par les cellules NK (et T CD8+ également) (Prajapati *et al.*, 2018) et HLA-E souvent surexprimé à la surface des cellules tumorales notamment. L'expression de cet antigène de la famille des HLA représente une stratégie importante d'échappement des tumeurs à la surveillance par le système immunitaire. Un travail mené par l'équipe du Pr. Eric Vivier présente les résultats préliminaires d'une étude clinique de phase II chez des patients atteints de carcinome à cellules squameuses de la tête et du cou (SCCHN) (André *et al.*, 2018). Le traitement consiste en l'association du monalizumab au cétuximab (anti-EGFR) connu pour induire de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (Taylor *et al.*, 2015). Dans cette analyse, les patients ont été sélectionnés selon le critère d'une forte expression d'HLA-E. Il en résulte un taux de réponse objective de 31%. Les auteurs proposent ici le ciblage du récepteur NKG2D par le monalizumab comme nouvel outil immuno-thérapeutique dans le but de booster l'activité cytolytique des cellules NK comme des cellules T CD8+ contre les cellules tumorales.

Enfin, une étude très récente présente des résultats encourageant de l'emploi du monalizumab dans la prise en charge de cancers gynécologiques notamment caractérisés par la stabilisation de la maladie (Tinker et al., 2019).

Parmi les récepteurs de signaux de dangers PRR (Pattern Recognition Receptors), les TLR (Toll Like Receptor) occupent une place centrale notamment dans l'activation des cellules pro-inflammatoires et de l'immunité innée. Dans ce contexte on dénombre le développement de différents agents thérapeutiques tels qu'un **agoniste des TLR7/8 (MEDI9197)** en cours d'évaluation en phase I et des agonistes de **TLR3 (hitonol)**, de **TLR4 (G100)** et de **TLR9 (IMO2125)** en cours d'étude.

- Le ciblage de voies métaboliques :

L'**IDO (Indoleamine-2,3-Dioxygenase)** est une enzyme catabolysant la dégradation du tryptophane en kynurénine. Cette action a pour effet d'inhiber la prolifération des cellules T, favoriser celle des Treg et créer un microenvironnement pro-tumoral (Selvan et al., 2016). La plupart des tumeurs expriment l'IDO, ce qui contribue à l'immunotolérance. Plusieurs études ont rapporté une relation inverse entre l'expression d'IDO et la survie (Godin-Ethier et al., 2011 ; Brochez et al., 2017). Le développement d'inhibiteurs IDO, **indoximod** et **epacadostat** a permis la mise en place d'études évaluant leurs effets en combinaison avec des chimiothérapies (gemcitabine-nab-paclitaxel) ou d'immunothérapie (pembrolizumab). L'**arginine** est un autre acide aminé nécessaire à l'activation et à la prolifération des cellules T. Les cellules tumorales produisent de grandes quantités d'arginase, enzyme dégradant l'arginine, responsable de la raréfaction de cet acide aminé dans le microenvironnement. En conséquence, l'activation immunitaire est altérée. Le **CB-1158, inhibiteur d'arginase**, est en cours d'évaluation en phase I seul ou en association avec un anti-PD-1. La voie des **ectonucléotidase CD39/ CD73** est impliquée dans les mécanismes d'immunosuppression au niveau tumoral. Leur mode d'action cible l'ATP. En effet, ils sont impliqués dans la dégradation de l'ATP en adénosine. L'adénosine s'accumule dans le microenvironnement et par sa présence stimule l'angiogenèse et dérégule l'infiltrat immunitaire tumoral. Une étude de phase I/II (CA013-004) évalue actuellement l'effet d'un **anti-CD73 (BMS-986179)** seul et en combinaison avec le nivolumab (anti-PD-1) dans le cadre de tumeurs solides avancées.

- L'utilisation d'anticorps conjugués (Antibody Drug Conjugated, ADC) :

Le Développement d'**anticorps humanisés** ciblant un antigène précis couplé à un **agent cytotoxique est en cours**. Ces anticorps modifiés ont été conçus pour délivrer directement l'agent cytotoxique sélectionné à l'intérieur des cellules ciblées portant l'antigène cible. Les deux molécules sont reliées entre elles par un « **linker** ». Les premiers ADC utilisaient des composés cytotoxiques classiques (5-FU, doxorubicine, etc.). Par manque d'efficacité car peu puissants, ils furent remplacés par des molécules cytotoxiques bien plus puissantes (maitansinoïdes, auristaines), préalablement écartées à cause de leurs forts effets indésirables (Tsuchikama *et al.*, 2018). Différents ADC sont utilisés à ce jour (Lambert *et al.*, 2017). On retrouve le **Brentuximab Védotin** (anti-CD-30), le **Trastuzumab Entasine** (T-DM-1) (anti-HER2) (Verma *et al.*, 2012), ou le **Rovalpituzumab Tesirine** (Rova-T) (anti-DLL-3) (Rudin *et al.*, 2017),

- L'utilisation d'anticorps bispécifiques (BiTE) :

Du fait de leur structure, les anticorps monoclonaux classiques mettent en relation des cellules portant l'antigène cible et des cellules pourvues de récepteur Fc gamma (FcγR) capables de fixer les anticorps administrés. Le développement d'anticorps bispécifiques (BiTE) étend cette relation aux cellules n'exprimant pas de FcγR (Lymphocytes T par exemple). On décrit deux classes de BiTE : **Les BiTEs dépourvus de fragment Fc** sont composés de deux fragments Fv de spécificité différente reliés par un « linker » peptidique. Un premier Fv est dirigé contre un antigène tumoral et le second Fv contre la chaîne *epsilon* des corécepteurs CD3 (CD3ε) des TCR. On dénombre différents BiTEs ciblant CD19 (Blinatumomab) (Wu *et al.*, 2015), EpCAM, HER2, ACE, CD33 et autres. Il existe également **des BiTEs pourvus de fragments Fc** : on peut citer le MCLA-117 (anti-CD3/anti-CLEC12A) (Loo *et al.*, 2015) ou le Catumaxomab (anti-EpCAM/anti-CD3).

- L'utilisation de lymphocytes T chimériques pour leur TCR (Chimeric Antigen Receptor T-cell, CAR T-cell) :

Ce sont des lymphocytes T portant un TCR génétiquement modifié (Chimeric Antigen Receptor, CAR) composé d'un fragment Fv dirigé contre un antigène spécifique, d'un domaine transmembranaire de liaison et d'un domaine intracellulaire de signalisation

activant les lymphocytes T. Ces cellules sont obtenues par insertion de vecteurs viraux contenant les CAR dans des lymphocytes T autologues. L'utilisation des CAR T-cells est réalisée par transfert adoptif. On décrit quatre générations de CAR-T cells. La **première génération** est constituée d'un simple fragment Fv spécifique de l'antigène couplé à un domaine transmembranaire inerte CD8 lié au CD3. Les **deuxième** et **troisième générations** sont conçues avec l'ajout d'un domaine de co-stimulation (souvent CD28, CD137 ou OX40). Des CAR-T cells de deuxième et troisième génération sont en cours d'évaluation tels qu'un anti-HER2 (glioblastome), un anti-MUC16 (carcinome séreux de haut grade) et un anti-mésothéline (mésothéliomes pleuraux malins). Toutefois, ces CAR T-cells peuvent présenter des toxicités imprévisibles pouvant mener à la mort du patient (exemple du décès d'un patient traité par un CAR-T anti-HER2. La cause du décès a été attribuée à une détresse respiratoire aiguë du fait de l'expression de l'antigène HER2 par les tissus cardiopulmonaires). Enfin, on décrit une **quatrième génération** de CAR T-cells. Cette dernière génération s'est enrichie de gènes additionnels codant par exemple pour des cytokines anti-tumorales (IL-12) (Geyer *et al.*, 2016 ; Mirzaei *et al.*, 2017).

In vivo, les CAR T-cells exercent leur activité anti-tumorale via la formation d'une synapse immunologique avec la cellule cible permettant la production de cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , IL-2), la prolifération des lymphocytes T modifiés et le déclenchement d'une activité cytotoxique dirigé contre les cellules portant l'antigène reconnu. Les résultats exceptionnels qu'arborent certaines utilisations de CAR T-cells telles que celle d'un anti-CD19 (leucémie aiguë lymphoblastique à précurseurs B) se font conjointement au prix de toxicité importante (syndrome de relargage cytokinique, troubles neurologiques, aplasies en lymphocytes B). L'activité des CAR T-cells est majeure en hémato-oncologie (leucémies lymphoïdes chroniques et lymphomes B non hodgkiniens) mais plus nuancée en oncologie des tumeurs solides (manque de spécificité antigénique, difficulté d'expansion *ex vivo*, difficulté d'adressage au site de la tumeur, effet immunosuppresseur du microenvironnement [TGF- β notamment]). Des **CAR-T cells trivalents** ciblant HER2, le récepteur à l'IL-13 (IL-13R) et EphA2 sont actuellement en étude clinique dans le glioblastome mais semblent s'accompagner d'une forte toxicité (Bielamowicz *et al.*, 2018). Des essais de combinaison CAR T-cells avec des anti-PD-1 sont attendus (John *et al.*, 2013).

- L'emploi de virus oncolytiques :

Les virus oncolytiques présentent un effet immunostimulant en ce sens où ils augmentent la mort cellulaire et le relargage d'antigènes tumoraux des cellules cancéreuses qu'ils infectent. Natifs ou génétiquement modifiés, ces virus infectent préférentiellement les cellules tumorales car ne présentant pas de mécanisme de protection antivirales. De nombreux virus ont été testés, dont les plus étudiés sont le **virus herpès simplex de type 1 (HSV-1)**, le **virus coxsackie**, les **rétro-** et **adénovirus**. Le premier virus oncolytique à avoir été accrédité par la FDA et l'EMA est le Talimogène Laherparepvec (T-VEC) dans le mélanome avancé (stade IIIb/IV) (Antbacka *et al.*, 2015 ; Rehman *et al.*, 2016). Des stratégies de combinaison avec les inhibiteurs d'immunité checkpoint sont également envisagées. On peut citer l'association de virus coxsackie A21 avec le pemrolizumab (anti-PD-1) dans le traitement de tumeurs solides (cancers de la vessie, de la prostate, du poumon non à petite cellules) (Pandha *et al.*, 2017) et dans le mélanome métastatique.

- La vaccination :

Bien que longtemps décevants, les vaccins anti-tumoraux sont toujours en cours de développement afin de lever les limites d'aspécificité. Le but actuel des vaccins anti-tumoraux est de déclencher une immunité protectrice via la stimulation de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques spécifiques des tumeurs (Blanc *et al.*, 2017). Différents types de vaccins sont décrits à ce jour tels que les vaccins génétiques employant des plasmides, des virus ou des bactéries pour insérer un ARNm codant pour un antigène tumoral. Par exemple, l'**INVAC-1** est un vaccin à ADN codant pour une forme inactive de la télomérase humaine. D'autres stratégies vaccinales consistent en l'utilisation d'un pool d'antigènes tumoraux. Cette stratégie est toutefois limitée du fait du faible nombre d'épitopes utilisés, de l'hétérogénéité tumorale et de la mutation des épitopes au cours de la croissance des tumeurs. Une étude de phase II a évalué l'association d'un vaccin **anti-WT1** à l'utilisation de **gemcitabine** (anti-métabolite) dans le cancer pancréatique (Nishida *et al.*, 2016). Un type de vaccination personnalisé a également vu le jour grâce à la vaccination contre des **néoantigènes secondaires** (essai UVAC MUTANOME dans le mélanome). Enfin, l'optimisation des vaccins anti-tumoraux vise également l'utilisation d'adjuvants (GM-CSF pour faire maturer les CPA), de vecteurs plus performants et de combinaisons

thérapeutiques avec des agents impactant le microenvironnement tumoral tels que les inhibiteurs d'IDO ou les agonistes de TNFR (Butterfield, 2015).

- Thérapies cytokiniques :

Un des acteurs clés de la réponse immunitaire et à *fortiori* de la réponse immunitaire anti-tumorale sont les lymphocytes T CD4⁺. L'activité anti-tumorale de ces cellules passe par la production de cytokines effectrices Th1 notamment telles que l'IL-2, l'IL-12, l'IFN- γ et, le TNF- α . Ces cytokines présentent une action directe *via* leurs propriétés cytotoxiques ou indirectes *via* l'activation et la persistance d'autres types cellulaires tels que les lymphocytes T CD8⁺. L'IL-12, par exemple, stimule à la fois l'immunité innée (cellules NK) et adaptative (cellules T) mais les résultats cliniques de son utilisation restent décevants (Lasek *et al.*, 2014).

Néanmoins, les thérapies employant les cytokines ressentent un regain d'intérêt avec le développement de nouvelles stratégies telles que l'**Ad-RTS-hIL-12** (adénovirus modifié exprimant l'IL-12, le **NKTR-214** (forme pégylée d'IL-2) en combinaison avec le nivolumab (anti-PD-1) dans les cancers du rein, du poumon et des mélanomes métastatiques, les **immunocytokines** tel que le **DI-Leu16-IL-2** (protéines de fusion anticorps/cytokine anti-CD20) offrant une spécificité de ciblage tumoral (lymphome B) et le relargage d'une forte dose de cytokines au site de la tumeur (Neri *et al.*, 2016). Cette dernière stratégie permet d'augmenter l'effet thérapeutique sans la contrainte des effets indésirables dose dépendant. Des immunocytokines concentrées sur l'IL-2 et le TNF sont actuellement en cours de développement.

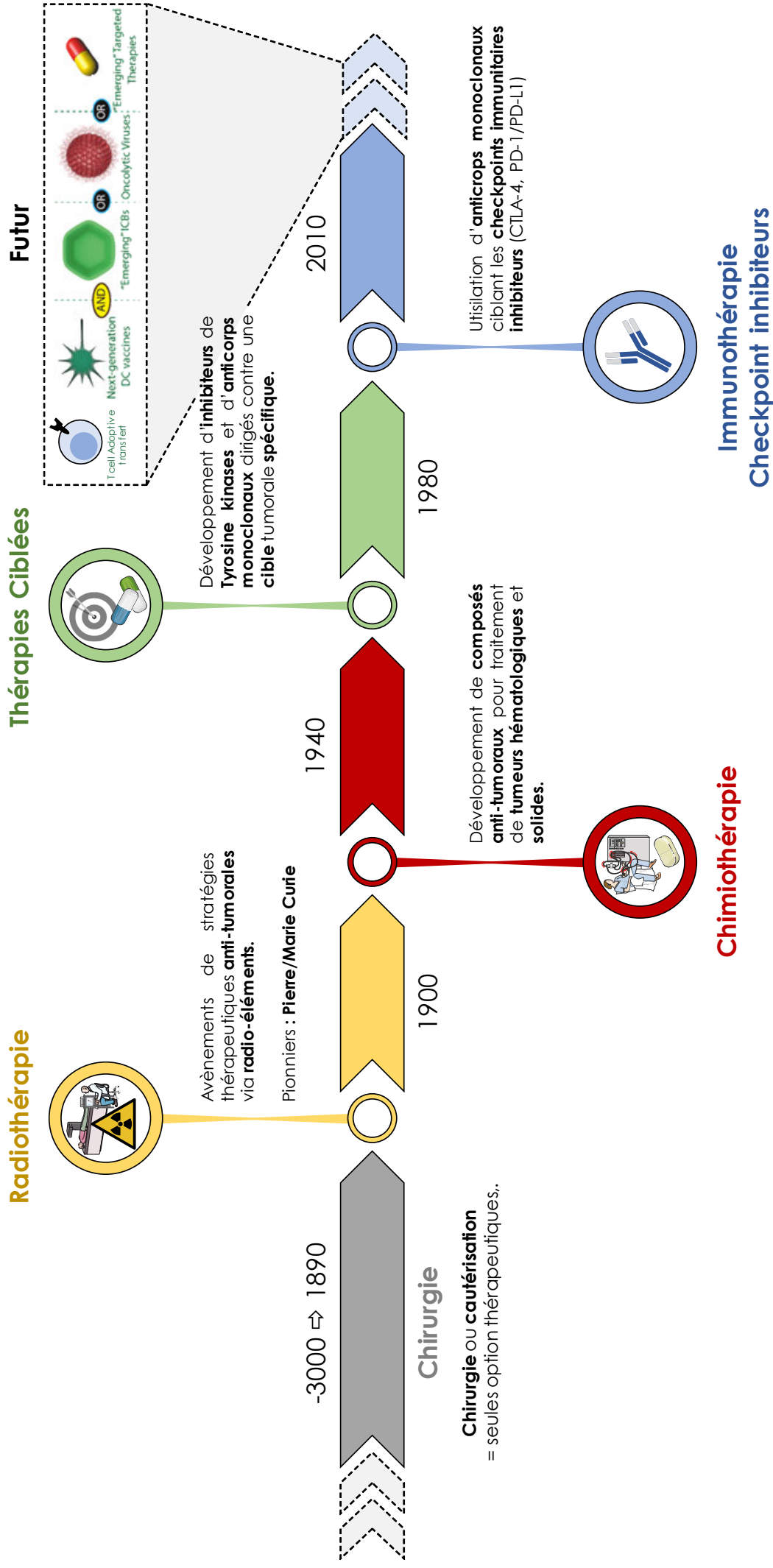


Figure 14 : Chronologie des événements décisifs du domaine de l'oncologie moderne. Après le développement de la radiothérapie au début des années 1900, l'oncologie s'est radicalement modifiée en profondeur vers 1940 avec la découverte des premiers agents chimiothérapeutiques. Plus tard, dans les années 1980, le domaine a subi une avancée importante avec le développement des thérapies ciblées. Ce nouveau type de stratégies thérapeutiques a été déterminant dans l'amélioration de l'efficacité des traitements anti-cancéreux. La dernière avancée majeure a eu lieu en 2010 avec l'introduction d'anticorps monoclonaux ciblant les points de contrôle immunitaires inhibiteurs dans le cadre de traitements de tumeurs avancées et métastatiques. Les stratégies actuelles et futures visent à contourner les limites des thérapeutiques conventionnelles notamment via le développement de nouveaux composés, de cellules et virus modifiés mais également de combinaisons thérapeutiques.
D'après Falzone et al., 2018 ; Garg and Agostinis, 2017

Objectif du Projet de Thèse

Objectif du Projet de Thèse

Au cours de l'Histoire du cancer, l'amélioration du diagnostic, de la prise en charge des patients et de l'efficacité des traitements sont fortement liés au progrès théoriques et techniques de la compréhension des mécanismes gouvernant la tumorigenèse. Les bases de la biologie cellulaire et moléculaire sont en perpétuelles modifications et s'enrichissent de jour en jour de nouveaux mécanismes. C'est dans cette dynamique que les recherches en cancérologie et à *fortiori* celles axées sur la compréhension de l'influence du système immunitaire des tumeurs s'est installée et a pris une place prépondérante dans les thérapies anti-tumorales. Néanmoins, l'amélioration des stratégies thérapeutiques se heurtent, à chaque nouvelle avancée, à des limites de plus en plus complexe. Même si, à l'heure actuelle, certains patients peuvent tirer un réel bénéfice des thérapies ciblées et des immunothérapies spécifiques, ils n'en restent pas moins confrontés à plusieurs défis tels que ceux rencontrés dans les autres stratégies thérapeutiques (chimiothérapie conventionnelle, radiothérapie, chirurgie). Ainsi, aspécificité, toxicité, résistance aux traitements, effets secondaires non désirés sont autant de limites que ces nouvelles stratégies thérapeutiques anti-tumorales souhaitent contourner.

C'est dans cette optique d'amélioration perpétuelle des traitements anticancéreux que notre équipe de recherche concentre ses efforts. Pour ce faire, un axe majeur développé dans l'équipe est d'étudier et d'améliorer les connaissances fondamentales de la biologie des lymphocytes T CD4⁺ dans la réponse immunitaire anti-tumorale. Parmi l'ensemble de nos travaux, une étude a notamment démontré le rôle délétère des lymphocytes Th2 dans un modèle d'envahissement pulmonaire de cellules de mélanome murin B16-F10 (Bruchard *et al.*, 2015). Dans ce modèle, l'équipe a relié le rôle pro-tumoral des Th2 à leur sécrétion d'IL-4. Ces données sont en adéquation avec le concept de contexte immunitaire (immune contexture) tumoral exposé quelques années plus tôt (Fidman *et al.*, 2012). Ce concept établit une relation entre le type de tumeur, la nature de l'infiltrat immunitaire et son effet sur la progression tumorale. Ainsi, les Th2, par le biais de la sécrétion d'IL-4, sont majoritairement associés à l'entretien de la croissance tumorale et à un mauvais pronostic vital pour les patients. L'IL-4 est notamment responsable de la mise en place d'un microenvironnement immunosuppresseur, d'une augmentation de l'angiogenèse et

d'une réduction de la sensibilité des cellules tumorales à l'apoptose. C'est dans ce contexte que nous nous sommes interrogés sur l'évolution de la composition du système immunitaire dans le modèle préclinique de tumeurs B16-F10 pulmonaires. Nos données préliminaires ont laissé apparaître une augmentation concomitante des sous-populations Tfh et Th2.

Ainsi l'objectif de ce travail a été :

- 1- D'expliquer pourquoi nous observons une augmentation de Tfh positivement corrélée à celle des Th2 et quel pouvait être le lien entre ces deux sous-types T CD4⁺. Dans ce contexte nous avons identifié l'enzyme hPGDS (Hematopoietic Prostaglandin D2 synthase) au sein des Tfh comme facteur commun. En effet, cette enzyme est impliquée dans la voie de biosynthèse des eicosanoïdes et plus précisément dans la conversion de la prostaglandine H2 (PGH2) en prostaglandine D2 (PGD2) (Giles and Leff, 1988). La PGD2 est notamment impliquée dans le recrutement et l'activation des fonctions effectrices des lymphocytes Th2 par le biais de l'expression du récepteur spécifique CRTH2 (Nagata *et al.*, 1999). C'est à partir de ces observations que nous avons émis l'hypothèse d'une communication intercellulaire PGD2 dépendante gouvernant l'évolution de ces deux sous-populations T CD4⁺ dans notre modèle tumoral.
- 2- De définir les mécanismes moléculaires dirigeant l'expression de l'*Hpgds* au sein des Tfh et valider les effets biologiques de la PGD2 sur la migration et les fonctions effectrices des Th2.
- 3- De déterminer si cette observation peut servir de cible thérapeutique, dans un premier temps en ciblant l'axe PGD2-CRTH2 dans notre modèle préclinique et dans un deuxième temps en évaluant le caractère transposable de ce mécanisme aux tumeurs humaines.

Plus globalement, l'objectif de mon travail de thèse a donc été de mettre en évidence la communication intercellulaire entre Tfh et Th2 et le moyen par lequel elle avait lieu. Outre l'apport que représentent ces résultats d'un point de vue fondamental, ils ouvrent des perspectives thérapeutiques grâce à l'évaluation de l'impact de cette communication dans le cancer et la mise en avant de la PGD2 comme nouveau biomarqueur pronostic et cible thérapeutique.

Contexte et Stratégie d'Etude

I. Contexte de l'étude

Le concept d'immunosurveillance des tumeurs décrit un processus inhérent au système immunitaire par lequel il reconnaît et modifie par lui-même le développement des tumeurs (Dunn *et al.*, 2004). Grâce à la compréhension grandissante des mécanismes engagés dans la réponse immune anti-tumorale, le domaine de l'immunothérapie des cancers fait de la stimulation du système immunitaire dans la destruction des cellules cancéreuses son cheval de bataille. Les travaux actuels s'entendent sur la description d'un microenvironnement hétérogène en termes d'infiltrat immunitaire. En effet, les tumeurs sont le site de convergence d'un large panel de cellules appartenant aux deux composantes de l'immunité (innée et adaptative). Parmi elles, les lymphocytes T CD4⁺ occupent de jour en jour une place prépondérante dans les mécanismes d'élimination et d'entretien des tumeurs. Cette double facette d'action des lymphocytes T CD4⁺ est due à la grande diversité de leurs sous-populations et de leurs fonctions effectrices associées. Le rôle des lymphocytes T CD4⁺ est donc complexe. On décrit un mécanisme anti-tumoral direct des lymphocytes T CD4⁺ via la production de cytokines, de granules cytotoxiques ou leur interaction physique avec les cellules tumorales (engagement du couple ligand/récepteur de mort Fas-L/Fas). Dans la majorité des cas, leur rôle est indirect. Ainsi, il a été montré que les lymphocytes T CD4⁺ producteurs de cytokines Th1 (IL-2, IFN γ) jouent un rôle essentiel dans l'induction et la persistance des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques anti-tumoraux. A l'inverse, un rôle pro-tumoral a été assigné à certaines sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ de type T régulateurs ou avec une production cytokinique particulière (Th2, Th17...).

A l'instar de la majorité des lymphocytes T CD4⁺, les **Th2** n'exercent pas leurs fonctions effectrices directement. L'action de ces cellules est principalement due à l'activation d'autres types cellulaires immunitaires (éosinophiles, macrophages) (Anthony *et al.*, 2006 ; Lorvik *et al.*, 2016). Le panel de cytokines qu'ils sécrètent leur procure des propriétés effectrices propres. Dans le contexte tumoral, les cytokines Th2 sont notamment liées à la suppression des réponses anti-tumorales et corrélées à un mauvais pronostic vital (Fridman *et al.*, 2012 ; Kusuda *et al.*, 2005 ; Ubukata *et al.*, 2010). Toutefois, le rôle des Th2 dans le développement tumoral reste encore contrasté. Cette ambiguïté est notamment attribuable à l'action de l'une de leurs cytokines signature, l'**IL-4**. Le rôle de l'IL-4 dans l'immunité des tumeurs peut être encore débattu

lorsque certaines preuves attribuent à cette cytokine un effet **anti- ou pro-tumoral**. Cette dichotomie peut être attribuable à la source de sa production, à ses cellules cibles, sa concentration, sa cinétique d'expression, et d'autres facteurs environnementaux (Olver *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2009). Toutefois, les études démontrant un rôle protecteur de l'IL-4 sont à pondérer (Tepper *et al.*, 1989 and 1992 ; Noffz *et al.*, 1998 ; Stopacciaro *et al.*, 1997 ; Eguchi *et al.*, 2005 ; Hock *et al.*, 1993 ; Pericle *et al.*, 1994 ; Golumbeck *et al.*, 1991). En effet, elles se basent sur une stratégie commune où l'on force les cellules tumorales à sécréter de l'IL-4. De ce fait, des résultats conflictuels sont apparus lorsque d'autres études, utilisant des approches d'analyses différentes, montrent un rôle délétère de l'IL-4 dans la promotion tumorale. On relève une **promotion des TAMs de type M2** (DeNardo *et al.*, 2009 ; Gocheva *et al.*, 2010 ; Sica *et al.*, 2012), l'initiation de la polarisation de **lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques de type 2 (Tc2)** (Kienzle *et al.*, 2002 and 2005 ; Helmich *et al.*, 2001 ; Kemp *et al.*, 2001), une augmentation de la cytotoxicité T CD8⁺ et une **diminution de la croissance tumorale en absence d'IL-4** (Stremmel *et al.*, 1999 ; Baschuk *et al.*, 2007), la stimulation de l'**angiogenèse** (Fukushi *et al.*, 1998 et 2000), ou une action directe sur les cellules tumorales (Puri *et al.*, 1994 ; Leland *et al.*, 2000 ; Kawakami *et al.*, 2002 ; Shimamura *et al.*, 2007 ; Ishige *et al.*, 2008 ; Koller *et al.*, 2010 ; Prokopchuk *et al.*, 2005) notamment en les **protégeant des mécanismes d'apoptose** (Conticello *et al.*, 2004 ; Todaro *et al.*, 2006 and 2008 ; Li *et al.*, 2008). Une grande quantité de cytokine Th2, dont l'IL-4, est retrouvée dans le microenvironnement tumoral ou dans le sang périphérique de patients atteints de cancers de la prostate, de la vessie et du sein (Elsasser-Beile *et al.*, 1998 ; Wise *et al.*, 2000 ; Camp *et al.*, 1996). De plus, il a été démontré *in vitro* que l'IL-4 induit la prolifération de cellules de cancers du côlon, du sein, de la tête et du cou, de l'ovaire et de la prostate (Zang *et al.*, 2008 ; Roca *et al.*, 2012 ; Koller *et al.*, 2010) et présente *in vivo* la capacité d'activer les MDSCs (Roth *et al.*, 2012) et d'inhiber la polarisation Th1 et les réponses anti-tumorales associées.

L'accumulation de lymphocytes Th2 a été observée dans certains types de cancers humains dont ceux du sein (Verma *et al.*, 2013), de l'ovaire (Candido *et al.*, 2013) et du pancréas (De Monte *et al.*, 2011) et de modèles expérimentaux tels que l'invasion pulmonaire de cellules B16-F10 de mélanome murin (Kobayashi *et al.*, 1998). C'est dans ce contexte et dans ce dernier modèle murin que mon équipe a publié, en 2015, ses travaux relatifs à l'impact des Th2 sur la croissance tumorale afin de justifier la pertinence biologique et pathologique de la découverte d'une nouvelle

propriété d'NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 ou CIAS1) dans la régulation de la polarisation des Th2 (Bruchard *et al.*, 2015). Dans cette étude ils démontrent le rôle essentiel de NLRP3 comme facteur de transcription dans la régulation de l'expression de l'IL-4. Ils relient l'effet pro-tumoral des Th2 au « boost » de sécrétion d'IL-4 gouvernée par NLRP3. Ces données sont en accord avec les preuves démontrant que la polarisation Th2 et leur production d'IL-4 sont étroitement liées à la promotion de la croissance tumorale dans différents modèles de tumeurs *via* une action directe de l'IL-4 sur les cellules tumorales ou *via* l'inhibition de l'immunité cellulaire anti-tumorale (Kobayashi *et al.*, 1998 ; Hallet *et al.*, 2012 ; Powrie *et al.*, 1993). Nous avons notamment démontré que la déplétion en IL-4 (anticorps anti-IL-4), dans ce modèle murin, réduit fortement le nombre de foyers tumoraux, ce qui souligne l'implication de l'IL-4 dans la promotion de la croissance tumorale (Bruchard *et al.* ; 2015). Néanmoins, ce projet ne rentre pas dans le détail de la modulation de l'infiltrat immunitaire et des liens possibles entre les Th2, l'effet de l'IL-4 et la croissance tumorale. De ce fait et afin de combler ce vide, nous nous sommes notamment intéressés à la composition de l'infiltrat T CD4⁺ dans ce même modèle. Nos données préliminaires tendent à indiquer une modification de la proportion en Th1, Tfh et Th2 avec une corrélation de l'augmentation des Tfh et des Th2. **C'est à partir de ce constat que nous avons voulu déterminer par quel(s) moyen(s) Tfh et Th2 étaient liés et quels pouvaient être les effets de cette relation sur la croissance tumorale.**

II. Stratégie d'étude

1. Les lymphocytes Tfh induisent une accumulation de Th2 dans les tumeurs murines

Dans cette première partie nous avons souhaité évaluer la composition de l'infiltrat immunitaire T CD4⁺ dans le modèle d'envahissement pulmonaire de cellules de mélanome murin B16-F10. Pour ce faire nous avons tout d'abord choisi de valider le modèle d'étude (Bruchard *et al.*, 2015) en évaluant l'effet de la déplétion de l'IL-4 sur la croissance tumorale. Parallèlement, cette analyse fut réalisée dans un modèle de carcinogenèse pulmonaire chimio-induite par l'uréthane (Bruchard *et al.*, 2015) après validation histologique. La proportion de chaque sous-population lymphocytaires T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17, Tfh et Treg) a été évaluée par cytométrie en flux sur la base de l'expression membranaire de leurs marqueurs respectifs (Th1 [FOXP3⁻ CXCR3⁺ CCR6⁻], Th2 [FOXP3⁻ CXCR3⁻ CCR6⁻ ST2⁺], Th17 [FOXP3⁻ CXCR3⁻ CCR6⁺], Tfh [FOXP3⁻ CXCR5⁺ PD-1⁺], Treg [FOXP3⁺]). Cette analyse a été réalisée dans les poumons de souris sauvages (WT) et porteuses de tumeurs B16-F10 et traitées à l'uréthane. Ces premières analyses révèlent une augmentation de lymphocytes Tfh positivement corrélée à celle des Th2. Dans l'optique de comprendre dans quelle mesure ces deux sous-types sont liés, nous avons analysé l'état de la réponse anti-tumorale après transfert adoptif de Tfh spécifiques (Tfh OT-II) des tumeurs transplantées (B16-OVA) couplé ou non à une déplétion en IL-4. Ces données préliminaires ont permis d'asseoir les bases de notre étude, s'articulant autour de la compréhension du lien entre Tfh et Th2 dans ce modèle tumoral.

2. Les lymphocytes Tfh produisent de la PGD2

Afin de comprendre comment les Tfh et les Th2 sont liés et impactent la croissance tumorale, nous avons évalué, dans les Tfh, l'expression de facteurs impliqués dans le recrutement et/ou l'activation des lymphocytes Th2 (CCL17, CCL22, IL33, CCL11 [Eotaxin], hPGDS, ADCYAP1 [PACAP]). Des données de séquençage à ARN de Tfh obtenues *in vitro* et de Tfh et Th1 isolés de tumeurs (*in vivo*) ont été utilisées pour ces analyses. L'*Hpgds* ressort majoritairement exprimée dans les Tfh. La PGD2, produit de l'action de l'hPGDS dans la voie de biosynthèse des eicosanoïdes, nous a permis

d'émettre l'hypothèse d'une communication intercellulaire Tfh/Th2 gouvernée par cet acide gras.

Pour valider cette hypothèse nous avons souhaité confirmer l'expression d'*Hpgds* par PCR quantitative (qPCR) *in vitro* et *in vivo* dans l'ensemble des sous-types T CD4⁺. Puis valider la présence de l'enzyme par Western Blot et immunofluorescence, évaluer sa fonctionnalité grâce à la quantification de la production de PGD2 par ELISA et enfin observer par immunofluorescence la co-localisation des sites d'expression de l'hPGDS et de production de PGD2.

3. La PGD2 produite par les Tfh présente des effets biologiques sur les Th2

Dans un contexte inflammatoire, la PGD2 est connue pour induire le recrutement des Th2 et booster leurs fonctions effectrices. Partant de ces éléments, nous avons souhaité apprécier l'effet biologique de la PGD2 produite par les Tfh sur les lymphocytes Th2. Pour ce faire, nous avons mesuré *in vitro* l'expression et la production d'IL-4 par les Th2 en présence de PGD2 recombinante ou de surnageant de culture de Tfh WT, déficients pour hPGDS (siRNA, souris *Hpgds*^{-/-}) ou associé à un inhibiteur pharmacologique spécifique de CRTH2 (TM30089). Nous avons ensuite évalué la pertinence biologique d'une telle communication PGD2 dépendant *via* l'analyse *in vivo* de la localisation pulmonaire des Tfh OT-II et Th2 OT-II dans les souris porteuses de tumeurs B16-OVA. Enfin nous avons analysé le pouvoir chémoattractant de la PGD2 sur les Th2 *via* des expériences de « Transwell ».

4. Le complexe STAT1/STAT3 régule l'expression d'*Hpgds* au sein des Tfh

Dans l'optique d'élucider les mécanismes régulant l'expression d'*Hpgds* au sein des Tfh nous avons tout d'abord évalué l'impact des cytokines IL-6 et IL-21 engagées dans la polarisation Tfh. Les voies de signalisation liées à l'IL-6 et l'IL-21 partagent deux facteurs de transcription communs : STAT1 et STAT3. Grâce à la mesure de l'activation par phosphorylation de STAT1 et STAT3, l'inhibition pharmacologiques de ces deux facteurs et l'analyse de leur fixation sur le promoteur de l'*Hpgds*, nous avons évalué dans quelle mesure l'expression de l'enzyme pouvait être modulée au sein des Tfh.

Enfin, nous avons évalué par Duolink® (Proximity Ligation Assay, PLA) et gène rapporteur (Luciferase Assay) la conformation grâce à laquelle STAT1 et STAT3 régulent l'expression d'*Hpgds*.

5. Cibler l'axe PGD2-CRTH2 limite la croissance tumorale

Afin de justifier de la pertinence pathologique de notre modèle de communication intercellulaire, nous avons tout d'abord évalué l'effet de la déficience en *Hpgds* sur la croissance tumorale de souris porteuses de tumeurs B16-F10 ou traitées par l'uréthane. Dans ces mêmes conditions, nous avons affiné le mécanisme en évaluant le rôle spécifique des lymphocytes T CD4⁺ puis, plus précisément, des Tfh ainsi que l'IL-4 via l'utilisation d'anticorps bloquant anti-CD4, anti-IL-4, l'utilisation de souris déficientes en mastocytes (*Kit^{W-sh}*), source importante de PGD2 ou déficientes en Tfh (*Bcl6^{f/f} CD4^{Cre+}*). Parallèlement, nous avons mesuré l'évolution de la proportion des sous-populations T CD4⁺.

Enfin, nous avons voulu évaluer le potentiel thérapeutique du ciblage spécifique de la voie de communication gouvernée par la PGD2. Dans ce contexte, nous avons traité les souris avec un inhibiteur pharmacologique spécifique de CRTH2 (TM30089) et observé l'effet sur la croissance tumorale. Les données ont été comparées à celles obtenues dans les animaux déficients pour *Hpgds*.

6. L'axe PGD2-CRTH2 a également des répercussions dans les tumeurs humaines

L'ultime objectif de ce projet est double. Premièrement nous avons démontré le caractère transposable du mécanisme de communication intercellulaire PGD2 dépendante entre Tfh et Th2. Ainsi, à la lumière des données murines, nous avons évalué *in vitro* l'expression d'*Hpgds* dans différents sous type T CD4⁺, la production de PGD2 et l'effet de celle produite par les Tfh sur l'expression d'IL-4 par les Th2.

Deuxièmement, nous avons passé en revue les preuves *in vivo* de la pertinence pathologique de notre mécanisme de communication. Pour ce faire et sur la base de l'analyse de données bio-informatiques du TCGA (The Cancer Genome Atlas Program) issus de séquençage à ARN de 20 types de tumeurs humaines, nous avons

d'une part évalué différentes variables telles que les Tfh, les Th2 et l'*Hpgds*. Enfin, pour l'ensemble des types tumoraux analysés, nous avons déterminé la valeur pronostic sur la survie globale des patients quant à la composition en Tfh et/ou Th2.

III. Article soumis

hPGDS controls Tfh/Th2 communication and dropped Tfh cells anti-tumor properties.

Romain Mary, Fanny Chalmin, Emeric Limagne, Valentin Derangère, Mélanie Bruchard, Marion Thibaudin, Etienne Humblin, Joséphine Melin, Marjolaine Li Cavoli, Malaury Granell, Romain Boidot, Sandy Chevrier, Laurent Arnould, Corentin Richard, Quentin Klopfenstein, Antoine Bernard, Théo Accogli, Amelia Trimarco, Yoshihiro Urade, Lionel Apetoh, François Ghiringhelli, Frédérique Végran.

Soumission : Journal of Clinical Investigation

Matériel et Méthodes

1. Souches murines

Les souris B6.CgKit^{W-sh}/HNihrJaeBsmJ et OT-II ont été achetées auprès du CDTA (cryoconservation, distribution, dactylographie et archivage d'animaux, Orléans, France). Les souris BALB/cJ et C57BL/6J ont été achetés chez Charles River Laboratories (Saint Germain sur l'Arbresle, France). Un couple de souris *Hpgds*^{-/-} a été gracieusement fourni par Amelia Trimarco (Milan, Italie) mais généré à l'origine par Yoshihiro Urade (Tsukuba, Japon) (Mohri *et al.*, 2006). Tous les animaux ont été élevés et maintenus conformément aux directives FELASA et du comité d'éthique d'expérimentation animale (Université de Bourgogne, France). Des animaux femelles âgés de 6 à 10 semaines ont été utilisés dans des expériences.

2. Culture cellulaire

2.1. Lignées cellulaires tumorales et tumeurs transplantables

Les lignées cellulaires ont été cultivées à 37° C sous 5% de CO₂ dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (B16F10, LLC1 et MC-38) ou dans du milieu RPMI-1640 (CT26) additionné de 10% (vol/vol) de sérum fœtal, de pénicilline-streptomycine/amphotéricine B (PSA) et de 4 mM d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazéthanesulfonique (HEPES).

Pour induire une invasion pulmonaire tumorale, les cellules de mélanome murin B16F10 (origine : C57BL/6), les cellules de carcinome de colon CT26 murines (origine : BALB/cJ), les cellules murines de carcinome de poumon de Lewis (LLC1) (origine : C57BL/6) et les cellules d'adénocarcinome murin du colon MC -38 (origine : C57BL/6) ont été injectées par voie intraveineuse (rétro-orbitale) à des souris C57BL/6 (B16F10 et LLC1) et BALB/cJ (CT26). Pour induire la formation de tumeurs solides, 8 10⁵ cellules MC38 ont été injectées par voie sous-cutanée à des souris C57BL/6. Toutes les manipulations ont été conduites selon les directives du comité d'éthique de l'Université de Bourgogne.

2.2. Purification des cellules T et différenciation *in vitro*

Des cellules T CD4⁺ isolées ou des cellules T CD4⁺ naïves ont été cultivées dans du milieu RPMI-1640 complété avec 10% (vol/vol) sérum foetal additionné d'acides aminés non essentiels MEM (MEM-NEAA), de pyruvate de sodium, de PSA et de 4 mM d'HEPES.

Souris

Des cellules T CD4⁺ naïves (CD4⁺ CD62L^{hi}) ont été isolées à partir de rates et de ganglions lymphatiques de souris C57BL/6 sauvage (WT). Les cellules ont ensuite été purifiées à l'aide du système de séparation cellulaire MACS (kit d'isolation de cellules T CD4⁺ CD62L⁺, Miltenyi Biotec) ou par tri cellulaire en cytométrie en flux (MicroBead CD4 (L3T4), Miltenyi Biotec et BD ARIA III avec logiciel FACSDiva). La pureté des populations de cellules T isolées dépasse régulièrement 90 à 95%. Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs ont été stimulés avec des anticorps dirigés contre les co-récepteur CD3 (145-2C11, 2 mg / ml) et CD28 (PV-1, 2 mg / ml) en présence d'aucune cytokine et d'anticorps bloquants anti-IL-4 et anti-IL-12 (**Th0**); 10 ng/ml d'IL-12 + anti-IL-4 (**Th1**); 10 ng/ml d'IL-4 + anti-IFN- γ (**Th2**); 4 ng/ml d'anticorps TGF- β + anti-IL-4 et anti-IFN- γ (**Treg**); 2 ng/ml de TGF- β et 20 ng/ml d'anticorps anti-IL-6 + anti-IL-4 et anti-IFN- γ (**Th17**); 2 ng/ml de TGF- β et 20 ng/ml d'anticorps anti-IFN- γ IL-4 (**Th9**); et 50 ng/ml d'IL-6 et 50 ng/ml d'anticorps anti-IL-21 + anti-IL-4, anti-IFN- γ et anti-TGF- β (**Tfh**). L'IL-4, l'IL-6, l'IL-12, l'IL-21 et le TGF- β recombinant murin ont été achetés chez R & D Systems. Les anticorps bloquants l'IL-4 (clone 1B11), l'IFN- γ (XMG1.2) (10 mg/ml) et le TGF- β (1D11.16.8) (20 mg/ml) ont été obtenus auprès de BioXcell (West Lebanon, NH, USA).

Humain

Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs (CD4⁺ CD62L^{hi}) et les sous-populations T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17, Tfh et Treg) ont été isolés à partir de poche de sang de donneurs sains (buffy coat). Comme décrit pour la souris, les cellules ont été purifiées par cytométrie en flux (BD ARIA III avec logiciel FACSDiva) et re-stimulées *in vitro* en présence d'anticorps anti-CD3 (145-2C11, 2 mg / ml) et CD28 (PV-1, 2 mg / ml). ml).

3. Quantification de la production de cytokines

Les cytokines sécrétées ont été mesurées par ELISA après 72h de culture cellulaire pour l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 (BD Biosciences) et l'IL-13 (eBioscience) murins conformément aux instructions du fabricant. Pour le marquage intracellulaire des cytokines, les cellules ont été cultivées comme décrit ci-dessus, puis stimulées pendant 4h à 37°C dans un milieu de culture contenant de la PMA (50 ng / ml; Sigma), de la ionomycine (1 mg / ml; Sigma) et de la monensine (GolgiStop; 1 ml/ml; BD Biosciences). Après marquages des marqueurs de surface (voir la section Cytométrie en flux), les cellules ont été fixées et perméabilisées conformément aux instructions du fabricant (BD Biosciences), puis les produits moléculaires intracellulaires ont été marqués (voir la section Cytométrie en flux).

4. Immunoblot (Western Blot)

Des extraits protéiques ont été préparés en lysant les cellules pendant 10 min à 4°C dans un tampon composé d'1% de SDS, d'1 mM d'orthovanadate de sodium et de 10 mM de Tris (pH 7,4) (Boiling buffer) en présence d'inhibiteurs de protéase (Roche Diagnostics). La viscosité de l'échantillon a été réduite par sonication. La concentration en protéines a été mesurée avec un kit de dosage de protéines Bio-Rad DC. Les lysats protéiques ont été incubés dans du tampon de charge (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, β -mercaptoéthanol à 10%, SDS à 4,6%, glycérol à 20% et bleu de bromophénol à 0,003%), chauffés à 95°C pendant 5 min, séparés par du sodium Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et transférés par électroblot sur une membrane de nitrocellulose (Amersham™ Protran™; GE Healthcare Life Science). Après 2 h d'incubation à température ambiante avec 5% de BSA dans une solution saline tamponnée au Tris (TBS) et 0,1% de Tween 20 (TBS-Tween), les membranes ont été incubées pendant une nuit avec un anticorps primaire (identifié ci-dessous et détaillé dans le tableau des ressources). L'anticorps primaire est dilué dans un tampon TBS + 5% de BSA et 0,1% de Tween. Les membranes ont été ensuite lavées et incubées pendant 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire (identifié ci-dessous et détaillé dans le tableau des ressources) puis lavées à nouveau avant révélation au luminol (ImmunoCruz: Santa Cruz Biotechnologies ou SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrat: ThermoFisher Scientific).

Les anticorps suivants ont été utilisés pour l'immunoblot; Anticorps primaires: : Rabbit mAbs anti-BCL6 (D65C10), Rabbit anti-STAT1 (D1K9Y), Rabbit anti-Phospho-STAT1 (Tyr701) (D4A7), Rabbit anti-STAT3 (124H6) and anti-Phospho-STAT3 (Tyr705) ont été acheté chez Cell Signaling. Le Mouse mAb anti-Phospho-STAT1 (Tyr701) (M135) a été acheté auprès d'abcam. Le Goat pAb anti-hPGDS (D-17) a été acheté chez Santa Cruz Biotechnology. Anticorps secondaires: Peroxidase AffiniPure Goat polyclonal Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch), Peroxidase AffiniPure Goat polyclonal Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch), Rabbit polyclonal anti-Goat IgG Antibody, HRP conjugate (Sigma Aldrich).

5. Cytométrie en flux

5.1. Anticorps et procédure

Souris

Pour phénotyper et trier des populations distinctes de cellules T CD4⁺ par cytométrie en flux, les poumons, les ganglions lymphatiques, les rates et les tumeurs de souris ont été prélevés et dissociés grâce à un kit de dissociation d'organes ou de tissus spécifiques (Miltenyi). Les cellules ont été marquées dans un tampon de coloration de cytométrie en flux (« Flow Cytometry Staining Buffer », eBioscience) et un tampon spécifique «Brilliant Stain Buffer» (BD Bioscience). L'anticorps anti-CD4-FITC (H129.29) et le marqueur de viabilité (FVS700) ont été achetés auprès de BD Bioscience. Les anticorps anti-CD62L (PE), anti-CD45-VioGreen (30-F11), anti-CXCR3 (CD183)-APC (CXCR3-173) et anti-CCR6(CD196)-PE-Vio770 (REA277) ont été achetés chez Miltenyi Biotec. . L'anti-CXCR5(CD185)-BV421 (L138D7) et l'anti-PD-1 (CD279)-APC-Cy7 (29F.1A12) ont été achetés chez Biolegend. L'anticorps anti-T1/ST2 (IL-33R) -PE (DJ8) a été acheté auprès de mdbiosciences. L'anti-FOXP3-PerCP-Cy5.5 (FJK-16s) a été acheté chez eBioscience (ThermoFisher Scientific). Le marquage intracellulaire FOXP3 a été réalisé selon le protocole du fabricant en utilisant la solution de fixation/perméabilisation (eBioscience). Tous les événements ont été acquis par un analyseur de cellules BD LSR II™, FACSCanto™ 10 couleurs ou LSRFortessa™ ou triés par un trieur de cellules FACSAria™ (BD Bioscience) équipé du logiciel BD FACSDiva (BD Biosciences). Les données ont été analysées à l'aide du logiciel FlowJo. (Tree Star).

Humain

Pour phénotyper et trier des populations distinctes de cellules T CD4⁺ par cytométrie en flux, des tumeurs gracieusement fournies par le centre anticancéreux George François Leclerc (Dijon, France) et des buffy-coat de donneurs sains (Etablissement Français du Sang, Besançon, France) ont été respectivement dissociées grâce au kit de dissociation de tumeurs humaines (Miltenyi) ou purifiées grâce au cocktail d'enrichissement de cellules T CD4⁺ humaines RosetteSep™ (STEMCELL™ Technologies). Les cellules ont été marquées dans un tampon de coloration de cytométrie en flux («Flow Cytometry Staining Buffer», eBioscience) et un tampon spécifique «Brilliant Stain Buffer» (BD Bioscience). Les anticorps anti-CD45RA-BV510 (HI100), anti-CD4-FITC (RPA-T4), anti-CXCR3(CD183)-APC-Cy7 (G025H7), anti-CCR6(CD196)-BV605 (G034E3), anti-PD-1(CD279)-PE (EH12.2H7) et anti-IL7-Ra(CD127)-PerCP-Cy5.5 ont été achetés chez Biolegend. Les anticorps anti-CD62L-PE (DREG-56), anti-CD4-BV421 (L200), anti-CD25-BV421 (2A3), anti-CXCR5(CD185)-AlexaFluor647 (RF8B2), anti-CCR4(CD194)-PE-Cy7 et le FVS700 ont été achetés chez BD Bioscience. L'anti-CD45RA-APC (REA562) a été acheté chez Miltenyi Biotec. Tous les événements ont été acquis par un analyseur de cellules BD LSRII™, FACSCanto™ 10 couleurs ou LSRFortessa™ ou triés par un trieur de cellules FACSAria™ III (BD Bioscience) équipé du logiciel BD FACSDiva (BD Biosciences), et les données ont été analysées à l'aide du logiciel d'analyse FlowJo. (Tree Star).

5.2. Procédure d'identification des sous-populations de cellules T CD4⁺

Pour le tri de cellules naïves T CD4⁺, nous avons respectivement utilisé le panel d'anticorps murins CD45-VioGreen, CD62L-PE, CD4-FITC et FVS700 et le panel d'anticorps humains CD45RA-APC, CD62L-PE, CD4-BV421 et FVS700. Pour l'analyse des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺, les stratégies de fenêtrage (gating) sont décrites dans les Figures supplémentaires S1 (souris) et S23 (humaine).

6. Immunofluorescence (IF) et test de proximité *in situ* (Proximity Ligation Assay, PLA)

1 x 10⁶ cellules par condition ont été utilisées. Les cellules ont été lavées, fixées pendant 10 minutes à la température ambiante avec de la PFA à 4% et perméabilisées pendant 10 minutes sur de la glace avec du méthanol 100% glacial (pour le marquage d'hPGDS et la PLA) ou pendant 45 minutes avec un tampon de 3% de BSA et 0,2% de saponine (Sigma-Aldrich) dans du PBS (pour le marquage de la PGD2). Les marquages aspécifiques ont été bloqués par incubation à la température ambiante pendant 1 heure dans un tampon PBS + 5% de sérum veau fœtal (FBS) (pour IF) ou pendant 30 minutes à la température ambiante dans un tampon PBS + 0,5% BSA (pour du PLA). Les échantillons ont ensuite été incubés pendant une nuit à 4°C avec des anticorps primaires (identifiés ci-dessous et détaillés dans le tableau des ressources clés), préalablement dilués dans leur tampon de blocage respectif (IF ou PLA).

Pour les expériences d'IF, les cellules ont été lavées deux fois avec une solution de PBS + 0,05% Tween 20 (PBS-Tween) puis incubées pendant 1 heure à la température ambiante avec l'anticorps secondaire (identifié ci-dessous et détaillé dans le tableau de ressources clés) dilué dans le tampon de blocage de l'IF. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec une solution de PBS-Tween et deux fois avec de l'eau ultrapure. Pour les expériences de PLA, après élimination des anticorps primaires par lavage, les cellules ont été incubées pendant 1 heure à 37°C avec les sondes appropriées (sonde PLA® Duolink® *in Situ* anti-lapin PLUS et anti-souris MINUS; Sigma Aldrich) et lavées deux fois avec du tampon de lavage Duolink *In Situ* Wash Buffer A (Tris 0,01 M, NaCl 0,15 M et Tween 20 0,05%; pH = 7,4). Les sondes ont ensuite été liées pendant 30 min à 37°C, lavées deux fois dans du tampon A, amplifiées pendant 100 min à 37°C à l'obscurité avec de la polymérase (Sigma-Aldrich), puis ont été lavées une fois avec du tampon de lavage Duolink *In Situ* Wash Buffer B (Tris 0,2 M et NaCl 0,1 M; pH = 7,5) et deux fois avec de l'eau ultrapure.

Pour les deux expériences, les cellules ainsi marquées sont remises en suspension dans de l'eau ultrapure puis déposées sur des lames de microscopie (Superfrost Ultra Plus®, ThermoFisher Scientific) et incubées à température ambiante dans l'obscurité jusqu'à évaporation de l'eau. Les lames séchées ont ensuite été montées avec une goutte de milieu de montage contenant du DAPI (Molecular Probes) et recouvertes d'une lamelle (Knittelglass). Les lames ont été observées avec un microscope droit équipé

d'un dispositif à couplage de charge (Zeiss) et un objectif 40x ou 63x avec une ouverture numérique de 1,4 en utilisant le système Zeiss ApoTome (pour un grossissement de 63x). Les images ont été analysées par le logiciel ImageJ.

Les anticorps suivants ont été utilisés pour les expériences d'IF et de PLA : Anticorps primaires: Goat anti-hPGDS (dilution 1:250), rabbit anti-PGD2 (dilution 1:50), rabbit anti-Phospho-STAT1 (Tyr701) (D4A7) (dilution 1:50), mouse anti-Phospho-STAT1 (Tyr701) (M135) (dilution 1:100), rabbit anti-Phospho-STAT (Tyr705) (D3A7) (dilution 1:50), mouse anti-Phospho-STAT3 (Tyr705) (M9C6) (dilution 1:100). Anticorps secondaires: Donkey polyclonal anti-Goat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Alexa Fluor 488 (dilution 1:1000), Goat polyclonal anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Alexa Fluor 568 (dilution 1:1000).

7. Test de traçage cellulaire (Cell tracking Assay)

En bref, cellules B16F10 couplées à l'ovalbumine (B16-OVA) ont été injectées par voie intraveineuse à des souris C57BL/6. Sept jours après, les cellules Th2 et Tfh polarisées *in vitro* à partir de lymphocytes T CD4⁺ naïfs issus de souris OT-II ont respectivement été marquées avec un traceur cellulaire rouge (CellTrace™ Far Red) et vert (CFSE) (ThermoFisher Scientific) et injectées (IV) dans les souris porteuses de tumeurs B16-OVA. Le lendemain, les souris ont été sacrifiées et les poumons ont été prélevés, inclus dans une matrice OCT (Leica Biosystems), congelés dans de l'azote liquide, découpés (4µm), montés sur des lames de microscopie (Superfrost Ultra Plus®, ThermoFisher Scientific), colorés au DAPI (Sigma Aldrich), recouvert d'une goutte de milieu de montage (Southern Biotech) et d'une lamelle. Les lames ont ensuite été examinées à l'aide de la station spectrale Mantra (Perkin Elmer) et analysées à l'aide du logiciel inForm (Perkin Elmer).

8. Analyse par PCR quantitative (qPCR)

L'ARN total des cellules T a été extrait en utilisant du Trizol (Invitrogen). 300 ng d'ARN ont été utilisés pour réaliser la transcription inverse en ADNc par transcriptase inverse M-MLV, Random Primers et inhibiteur de RNaseOUT (Invitrogen). Les ADNc ont été quantifiés par PCR en temps réel (qPCR) en utilisant un kit de qPCR SYBR Green (Applied Biosystems) et un thermocycleur Fast7500, SepOne ou ViiA™ 7 (Applied

Biosystems, France). Les taux relatifs d'ARNm ont été déterminés avec la méthode du calcul du ΔCt . Les valeurs ont été exprimées par rapport à la β actine. Les séquences d'oligonucléotides utilisées sont décrites dans le tableau des ressources.

9. Test d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

La fragmentation de la chromatine a été réalisée avec le kit truChIPTM de fragmentation de la chromatine (Covaris) à l'aide du dispositif Focused-Ultrasonicator M220 (Covaris). L'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) a été réalisé grâce au kit ChIP-IT (Active Motif Europe, Rixensart, Belgique) conformément aux instructions du fabricant. En résumé, la chromatine fragmentée a été immunoprécipitée avec 1 mg d'anticorps pSTAT1 ou pSTAT3 (Cell Signaling) ou 1 μ g d'immunoglobuline G (IgG) de contrôle (lapin) à 4°C pendant une nuit. Après addition de billes magnétiques de protéine G, le mélange protéine G/anticorps/chromatine a été lavé et élué avec les tampons fournis. Ensuite, les liaisons facteurs de transcription/chromatine ont été cassées et les échantillons analysés par qPCR. Les séquences d'oligonucléotides utilisées sont décrites dans le tableau des ressources.

10. Expériences de Transwell

Les cellules Th2 ont été cultivées dans un insert disposant d'une grille (8,0 μ m) (greiner bio-one) chargées dans une plaque 24 puits. Les cellules ont été placées au sommet d'une matrice de Matrigel (Corning) chargée au-dessus de la grille de Transwell. Les autres conditions (produits et/ou cellules Th0/Tfh) ont été placées au fond des puits de la plaque 24 puits. Après 24h d'incubation à 37°C sous 5% de CO₂, la grille de Transwell était retirée de l'insert, placée sur une lame de microscopie (Superfrost Ultra Plus®, ThermoFisher Scientific), montée avec une goutte de milieu de montage contenant du DAPI (sondes moléculaires) et recouvert d'une lamelle (Knittelglass). Les lames ont été observées *via* un microscope droit équipé d'un dispositif à couplage de charge (Zeiss) et un objectif 40x avec une ouverture numérique de 1,4. Les images ont été analysées par le logiciel ImageJ.

11. Knockdown *Hpgds*

Des expériences de déplétion par siRNA ont été réalisées avec un siRNA contrôle validé et un siRNA spécifique d'*Hpgds* (Life Technologies). Les cellules T CD4⁺ naïves ont été transfectées pendant 48h avec le réactif de transfection Lipofectamine 2000 conformément aux instructions du fabricant (Invitrogen). Les cellules ont ensuite été incubées dans les conditions de différenciation appropriées décrites ci-dessus.

12. Transfections transitoires et test de transactivation par gène rapporteur luciférase

Les constructions de plasmide luciférase contenant une partie du promoteur de l'*Hpgds* (*pHpgds*) ont été obtenues en insérant 677 pb de ce dernier dans le site de multiclonaage du vecteur de base pGI3 (Promega). Les fragments ont été amplifiés par PCR haute fidélité avec l'ADN génomique (ADNg) de souris C57BL/6 comme matrice et des amorces spécifiques (détaillés dans le tableau des ressources).

Des cellules 4T1 de souris ont été transfectées de manière transitoire pendant 6 h avec des plasmides rapporteurs (*pHpgds* ou *pGI3 basic*) et le vecteur de contrôle *pSV-β-Galactosidase* (Promega) en utilisant de la Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific). L'activité de la β-galactosidase a été mesurée à l'aide du système de dosage enzymatique de la β-galactosidase (Promega) à 420 nm après 30 min d'incubation à 37°C. La luciférase a été mesurée à l'aide du système de dosage de la luciférase (Promega) conformément aux instructions du fabricant. L'activité luciférase a été mesurée avec un lecteur de plaque multimode EnVision 2105 (PerkinElmer).

13. Séquençage d'ARN

Pour la préparation de la banque d'ARN à séquencer (ARN-Seq), l'ARN total des cellules T a été extrait à l'aide de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Les ARNr ont été éliminés à l'aide du kit d'élimination d'ARNr Ribo-zéro (Illumina, San Diego, Californie, États-Unis). Un total de 100 ng d'ARN appauvri en ARNr a été utilisé pour la préparation de la banque à l'aide du kit TruSeq Stranded Total RNA Library Prep

(Illumina) en suivant les instructions du fabricant. Le séquençage de l'ARN a été réalisé sur le dispositif NextSeq (Illumina). Les banques d'ARN-Seq ont été séquencées avec des lectures de 75 pb d'extrémité appariée. Les fichiers FASTQ ont été cartographiés à l'aide de BWA (version mm10 du génome de *Mus Musculus*) pour Illumina (Ghiringhelli *et al.*, 2009, *J. Immunol*). L'analyse a été réalisée à l'aide de TopHat pour Illumina (Trapnell *et al.*, 2009, *Bioinformatics*). Les fichiers générés ont été traités avec le logiciel Cufflinks (Trapnell *et al.*, 2010, *Nat. Biotechnol.*) pour obtenir des annotations de gènes exprimés dans chaque sous-type étudié. L'expression différentielle entre les échantillons a ensuite été analysée avec Cuffdiff (Trapnell *et al.*, 2010, *Nat. Biotechnol*).

14. Profil d'expression génétique cohortes de cancer

Les profils cliniques et d'expression génique de cancer BLCA, BRCA, CESC, COAD, GBM, HNSC, KICH, KIRC, KIRP, LHC, LUAD, LUC, OV, PAAD, PRAD, READ, SKCM, STAD, THCA et UCEC issus du de la base de données TCGA (The Cancer Genome Atlas Program, National Cancer Institute) ont été téléchargés en utilisant le package TCGA2STAT R (Wan YW *et al.*, 2016). Les données avaient été préalablement normalisées à l'aide de l'algorithme RSEM (Li B. *et al.*, 2011).

15. Méthode de calcul des Métagènes

Les gènes utilisés pour établir les métagènes correspondant aux différentes populations de cellules ont été extraits d'articles déjà publiés (Angelova M. *et al.*, 2015). Pour chaque échantillon de tumeur, la valeur en métagène d'une population de cellules a été obtenue en calculant l'expression moyenne des gènes correspondants.

16. Analyse de survie

La valeur pronostic de l'estimation du métagène a été testée à l'aide de modèles cox pour la survie globale (SG). Les probabilités de survie ont été estimées à l'aide de la méthode de Kaplan-Meier et la courbe de survie à l'aide du test du log-rank. Les seuils permettant de constituer différents groupes de patients ont été définis à l'aide de

l'algorithme « cutoff finder » (Budczies J *et al.*, 2012). La version 3.3.3 de R a été utilisée pour l'analyse statistique. Les figures ont été réalisées avec la version 7.03 de GraphPad.

17. Quantification et analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD ou SEM, et l'ensemble des données ont été comparées en utilisant le test t de Student non apparié (groupe test par rapport au groupe témoin) ou une ANOVA (2 way) le cas échéant. Les différences de nombre de foyers tumoraux ont été évaluées à l'aide du test de Kruskal – Wallis en fonction du nombre de groupes. Les calculs statistiques ont été effectués à l'aide de GraphPad Prism 6. Une p value $<0,05$ a été considéré comme statistiquement significatif pour toutes les expériences.

18. Informations supplémentaires

Tableau des ressources détaillées.

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Rat monoclonal PE anti-mouse CD62L (clone MEL14-H2.100)	Miltenyi Biotec	Cat#130-102-543; RRID: AB_2660515
Rat monoclonal FITC anti-mouse CD4 (clone H129.29)	BD Biosciences	Cat#553650; RRID: AB_394970
Rat monoclonal VioGreen anti-mouse CD45 (clone 30-F11)	Miltenyi Biotec	Cat#130-102-412; RRID: AB_2659927
Hamster monoclonal APC anti-mouse CXCR3 (CD183) (clone CXCR3-173)	Miltenyi Biotec	Cat#130-102-242; RRID: AB_2655753
Rat monoclonal PE anti-mouse T1/ST2 (IL-33R) (clone DJ8)	mbiosciences, bioproducts division	Cat#101001PE; N/A
Monoclonal PE-Vio770 anti-mouse CCR6 (CD196) (REA277)	Miltenyi Biotec	Cat#130-103-888; RRID: AB_2655947
Rat monoclonal BV421 anti-mouse CXCR5 (CD185) (clone L138D7)	Biolegend	Cat#145511; RRID: AB_2562127
Rat monoclonal APC-Cy7 anti-mouse PD-1 (CD279) (clone 29F.1A12)	Biolegend	Cat#135223; RRID: AB_2563522
Rat monoclonal PerCP-Cy5.5 anti-mouse FOXP3 (clone FJK-16s)	eBioscience	Cat#45-5773-82; RRID: AB_914351
Fixable Viability Stain 700	BD Biosciences	Cat#564997

Mouse monoclonal PE anti-human CD62L (clone DREG-56)	BD Biosciences	Cat#555544; RRID: AB_395928
Monoclonal APC anti-human CD45RA (clone REA562)	Miltenyi Biotec	Cat#130-108-715; RRID: AB_2658309
Mouse monoclonal BV510 anti-human CD45RA (clone HI100)	Biolegend	Cat#304102; RRID: AB_314406
Mouse monoclonal FITC anti-human CD4 (clone RPA-T4)	Biolegend	Cat#300502; RRID: AB_314070
Mouse monoclonal BV421 anti-human CD4 (clone L200)	BD Biosciences	Cat#562842; N/A
Mouse monoclonal APC-Cy7 anti-mouse CXCR3 (CD183) (clone G025H7)	Biolegend	Cat#353722; RRID: AB_2561423
Mouse monoclonal BV421 anti-human CD25 (clone 2A3)	BD Biosciences	Cat#564033; N/A
Mouse monoclonal BV605 anti-human CCR6 (CD196) (clone G034E3)	Biolegend	Cat#353420; RRID: AB_2561449
Rat monoclonal Alexa Fluor 647 anti-human CXCR5 (CD185) (clone RF8B2)	BD Biosciences	Cat#558113; N/A
Mouse monoclonal PE anti-human PD-1 (CD279) (clone EH12.2H7)	Biolegend	Cat#329906; RRID: AB_940483
Mouse monoclonal PerCP-Cy5.5 anti-human IL7-Ra (CD127) (clone A019D5)	Biolegend	Cat#351322; RRID: AB_10897104
Mouse monoclonal PE-Cy7 anti-human CCR4 (CD194) (clone 1G1)	BD Biosciences	Cat#557864; RRID: AB_396907
Rat monoclonal PE-Cy7 anti-mouse CD45 (clone 30-F11)	BD Biosciences	Cat#552848; RRID: AB_394489
Mouse monoclonal BV510 anti-mouse CD45.2 (clone 104)	Biolegend	Cat#109837; RRID: AB_2561393
Rabbit monoclonal anti-human/mouse BCL6 (clone D65C10)	Cell Signaling	Cat#5650; RRID: AB_10949970
Rabbit monoclonal anti-human/mouse/rat/monkey STAT1 (clone D1K9Y)	Cell Signaling	Cat#14994; N/A
Rabbit monoclonal anti-human/mouse/rat/monkey STAT3 (clone 124H6)	Cell Signaling	Cat#9139; RRID: AB_331757
Rabbit monoclonal anti-human/mouse/rat Phospho-Stat1 (Tyr701) (clone D4A7)	Cell Signaling	Cat#7649; RRID: AB_10950970
Mouse monoclonal anti-human/mouse Phospho-Stat1 (Tyr701) (clone M135)	abcam	Cat#ab29045; RRID: AB_778096
Rabbit monoclonal anti-human/mouse/rat Phospho-Stat3 (Tyr705) XP® (clone D3A7)	Cell Signaling	Cat#9145; RRID: AB_2491009
Goat polyclonal anti-human/mouse/rat PGD synthase (clone D-17)	Santa Cruz Biotechnology	Cat#sc-14816; RRID: AB_670850
Rabbit polyclonal anti-human/mouse/rat CRTH-2/GPR44	Novus Biologicals	Cat#NBP1-76755; RRID: AB_11018469
Rabbit polyclonal anti-human/mouse DP (clone M-47)	Santa Cruz Biotechnology	Cat#sc-67278; RRID: AB_2174485
Rabbit polyclonal species independent anti-PGD2	Enzo Life Sciences	Cat#ADI-905-047; RRID: AB_2039492

Donkey polyclonal anti-Goat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	ThermoFisher Scientific	Cat#A-11055; RRID: AB_2534102
Goat polyclonal anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	ThermoFisher Scientific	Cat#A-11011; RRID: AB_143157
Rabbit polyclonal anti-Goat IgG Antibody, HRP conjugate	Sigma Aldrich	Cat#AP106P; RRID: AB_92411
Peroxidase AffiniPure Goat polyclonal Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	Cat#111-035-144; RRID: AB_2307391
Peroxidase AffiniPure Goat polyclonal Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	Cat#115-035-146; RRID: AB_2307392
<i>InVivoMab</i> anti-mouse CD3 ϵ (clone 145-2C11)	BioXCell	Cat#BE0001-1; RRID: AB_11070634
<i>InVivoMab</i> anti-mouse CD4 (clone GK1.5)	BioXCell	Cat#BE0003-1; RRID: AB_11070636
<i>InVivoMab</i> anti-mouse CD28 (clone PV-1)	BioXCell	Cat#BE0015-5; RRID: AB_11070628
<i>InVivoMab</i> anti-mouse IL-4 (clone 11B11)	BioXCell	Cat#BE0045; RRID: AB_1107707
<i>InVivoMab</i> anti-mouse IL-6 (clone MP5-20F3)	BioXCell	Cat#BE0046; RRID: AB_1107709
<i>InVivoMab</i> anti-mouse IFN- γ (clone XMG1.2)	BioXCell	Cat#BE0055; RRID: AB_1107694
<i>InVivoMab</i> anti-mouse/human/rat/hamster/canine/bovine TGF- β (clone 1D11.16.8)	BioXCell	Cat#BE0057; RRID: AB_1107757
<i>InVivoMab</i> anti-human CD3 ϵ (clone OKT-3)	BioXCell	Cat#BE0001-2; RRID: AB_11070632
<i>InVivoMab</i> anti-human CD28 (clone CD28.2)	BioXCell	Cat#BE0291; RRID: AB_2687814
Bacterial		
Bacterial Strain JM109	Promega	Cat#P9751
Stellar Competent Cells	Takara	Cat#636763
Biological Samples		
Human Buffy Coat	Etablissement Français du Sang (EFS)	N/A
Human Breast Cancer (sample)	Centre George François Leclerc (CGFL)	N/A
Sheep Red Blood Cells, Packed 100%	Innovative™ Research	Cat#IC100-0210
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Cryptotanshinone (CAS n° 35825-57-1)	Selleckchem	Cat#S2285
Epigallocatechin gallate (EGCG) (CAS n° 989-51-5)	Sigma-Aldrich	Cat#E4143
Fludarabine (CAS n° 21679-14-1)	Selleckchem	Cat#S1491
G418 (Geneticin) (CAS n°108321-42-2)	InvivoGen	Cat#ant-gn-1
Prostaglandin D2 (CAS n° 41598-07-6)	Cayman Chemical	Cat#12010
Saponin (CAS n°8047-15-2)	Sigma-Aldrich	Cat#SML2160
STA-21 (CAS n° 111540-00-2)	Sigma-Aldrich	Cat#47036
TM30089 (CAS n° 844639-57-2, 627865-18-3)	ChemieTek	Cat#CT-AT002

Urethane (CAS n°51-79-6)	Sigma-Aldrich	Cat#94300
Recombinant Mouse IL-4	R&D SYSTEMS	Cat#404-ML-010
Recombinant Mouse IL-6	R&D SYSTEMS	Cat#405-ML-005
Recombinant Mouse IL-12	R&D SYSTEMS	Cat#419-ML-010
Recombinant Mouse IL-21	R&D SYSTEMS	Cat#594-ML-010
Recombinant Human TGF-β1 (Premium grade)	Miltenyi Biotec	Cat#130-095-067
RPMI 1640 with L-Glutamine - 500 ml	Dominic Dutscher	Cat#L0500-500
HEPES (1M)	gibco	Cat#15630080
Sodium pyruvate (100mM)	gibco	Cat#11360071
Penicillin-Streptomycin/Amphotericin B Mix, 10,000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin, 25µg/ml Amphotericin B in 0,85% Saline	PAN Biotech	Cat#P06-07300
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	gibco	Cat#11140035
Fetal Bovine Serum (South America) - 500ml	Dominic Dutscher	Cat#S1810-500
Lymphocytes Separation Medium	Eurobio Abcys	Cat#CMSMSL01-01
SYBR™ Green PCR Master Mix	ThermoFisher Scientific	Cat#4309155
M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/µL)	ThermoFisher Scientific	Cat#28025013
Set of dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Promega	Cat#U1420
eBioscience™ Flow Cytometry Staining Buffer	ThermoFisher Scientific	Cat#00-4222-26
Brilliant Stain Buffer	BD Bioscience	Cat#563794
CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, for flow cytometry	ThermoFisher Scientific	Cat#C34570
CellTrace™ Far Red Cell Proliferation Kit, for flow cytometry	ThermoFisher Scientific	Cat#C34564
eBioscience™ Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set	ThermoFisher Scientific	Cat#88-8824-00
ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI	ThermoFisher Scientific	Cat#P36941
Matrigel® Matrix Basement Membrane	ThermoFisher Scientific	Cat#354234
Frozen Section Media	Leica Biosystems	Cat#3801480
Critical Commercial Assays		
In-Fusion® HD Cloning Plus	Takara	Cat#638909
Mouse IL-4 ELISA Set	BD Biosciences	Cat#555232
Mouse IL-5 ELISA Set	BD Biosciences	Cat#555236
Mouse IL-10 ELISA Set	BD Biosciences	Cat#555252
Mouse IL-13 ELISA Ready-SET-Go! kit	eBioscience	Cat#15571067
Prostaglandin D2 ELISA Kit	Cayman Chemical	Cat#512031
CD4+ CD62L+ T Cell isolation Kit II, Mouse	Miltenyi Biotec	Cat#130-106-643
CD4 (L3T4) MicroBead, Mouse	Miltenyi Biotec	Cat#130-049-201
Tumor dissociation Kit, Mouse	Miltenyi Biotec	Cat#130-096-730
Tumor dissociation Kit, Human	Miltenyi Biotec	Cat#130-095-929
Lung dissociation Kit, Mouse	Miltenyi Biotec	Cat#130-095-927
LS Columns	Miltenyi Biotec	Cat#130-042-401
MS Mini MACS Separation Columns	Miltenyi Biotec	Cat#130-042-201
MACS SmartStreiners (70µm)	Miltenyi Biotec	Cat#130-098-462
Pre-Separation Filters (30µm)	Miltenyi Biotec	Cat#130-041-407
QuadroMACS Separator	Miltenyi Biotec	Cat#130-091-051

OctoMACS Separator	Miltenyi Biotec	Cat#130-042-109
Gentle Macs C tubes	Miltenyi Biotec	Cat#130-096-334
Duolink® flowPLA Detection Kit - Green	Sigma Aldrich	Cat#DUO94002
Luciferase Assay System	Promega	Cat#E1500
β-Galactosidase Enzyme Assay System	Pomega	Cat#E2000
RosetteSep™ Human CD4+ T Cell Enrichment Cocktail	STEMCELL™ Technologies	Cat#15062
Experimental Models: Cell Lines		
B16-F10	ATCC	Cat#CRL-6475; RRID: CVCL_0159
LL/2 (LLC1)	ATCC	Cat#CRL-21642; RRID: CVCL_4358
CT26.CL25	ATCC	Cat#CRL-2639; RRID: CVCL_7255
MC-38		Cat#?; RRID: CVCL_B288
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse: C57BL/6J	The Jackson Laboratory	Cat#000664; RRID:IMSR_JAX:000664
Mouse: BALB/cByJ	The Jackson Laboratory	Cat#000651; RRID:IMSR_JAX:000651
Mouse: B6.Cg-KitW-sh/HNhrJaeBsmGlij	The Jackson Laboratory	Cat#012861; RRID:IMSR_JAX:012861
Mouse: B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J	The Jackson Laboratory	Cat#004194; RRID:IMSR_JAX:004194
Mouse: <i>Hpgds</i> ^{-/-} : C57BL/6- <i>Hpgds</i> ^{-/-}	Ref	
Oligonucleotides		
Mouse <i>βactin</i> , forward	ThermoFisher Scientific	GAAGATCAAGCG AGGCTCCA
Mouse <i>βactin</i> , reverse	ThermoFisher Scientific	CCTTCCTGCATTCC ATCGTA
Mouse <i>Il4</i> , forward	ThermoFisher Scientific	CGAGCTCACTCTC TGTGGTG
Mouse <i>Il4</i> , reverse	ThermoFisher Scientific	TGAACGAGGTCA CAGGAGAA
Mouse <i>Il5</i> , forward	ThermoFisher Scientific	CATTCCACAGTAC CCCCAC
Mouse <i>Il5</i> , reverse	ThermoFisher Scientific	GCAATGAGAGAT GAGGCTT
Mouse <i>Il10</i> , forward	ThermoFisher Scientific	TGTCAAATTCATTCA TGGCCT
Mouse <i>Il10</i> , reverse	ThermoFisher Scientific	ATCGATTCTCCCC TGTGAA
Mouse <i>Il13</i> , forward	ThermoFisher Scientific	ATGTTGGTCAGGG AATCCAG

Mouse <i>Il13</i> , reverse	ThermoFisher Scientific	TGTGTCTCTCCCTCT CGACCC
Mouse <i>Hpgds</i> , forward	ThermoFisher Scientific	AGGTGCTTGATGTG TGAGCA
Mouse <i>Hpgds</i> , reverse	ThermoFisher Scientific	ATGTCAAGCTGAT GCAGTGG
ChIP Mouse pan-STATs <i>pHpgds</i> , forward	ThermoFisher Scientific	GCTAGTCAATGATT ATTCTGGTCT
ChIP Mouse pan-STATs <i>pHpgds</i> , reverse	ThermoFisher Scientific	GATCAGGCAACT GACAGATATTTT
ChIP Mouse STAT3 <i>pHpgds</i> , forward	ThermoFisher Scientific	CAGTCCTCTCTCCT CACCTT
ChIP Mouse STAT3 <i>pHpgds</i> , reverse	ThermoFisher Scientific	GGAGGACTTCAA GCTTAGCG
Human β actin, forward	ThermoFisher Scientific	GTTGTTCGACGACG AGCG
Human β actin, reverse	ThermoFisher Scientific	GCACAGAGCCTC GCCTT
Human <i>Hpgds</i> , forward	ThermoFisher Scientific	CACAGAATTGCAC CATGCCA
Human <i>Hpgds</i> , reverse	ThermoFisher Scientific	TTGCTAGGCTCTGG TGAAGA
Recombinant DNA		
pSV- β -Galactosidase Control Vector	Promega	Cat#E1081
pGL3 Luciferase Reporter Vectors	Promega	Cat#E1751
Duolink [®] In Situ PLA [®] Probe Anti-Rabbit PLUS	Sigma Aldrich	Cat#DUO92002
Duolink [®] In Situ PLA [®] Probe Anti-Mouse MINUS	Sigma Aldrich	Cat#DUO92004
Software and Algorithms		
7500 Fast System SDS Software (v1.4.0.25)	ThermoFisher Scientific	N/A
Image Lab [™] Software (v5.0)	Bio-Rad	N/A
FlowJo v10	FlowJo	N/A
ImageJ Software	ImageJ	N/A
ZEN system	Carl Zeiss Microscopy	N/A
GraphPad Prism Software (v6.00)	GraphPad Prism	N/A
DigiRead, ScanPlus Software (v1.8.0.2)	Biochrom	Cat#G01906590
Other : Devices and Cell culture system		
iCycler iQ [™] Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad	Cat#170-8740
7500 Fast Real-Time PCR System	ThermoFisher Scientific	Cat#4351107
LSRII [™] Cell Analyser	BD Biosciences	N/A
FACSCanto [™] 10-Color Cell Analyser	BD Biosciences	Cat#657338
LSRFortessa [™] Cell Analyzer	BD Biosciences	Cat#649225
FACSAria [™] III Cell Sorter	BD Biosciences	N/A
Asys UVM 340 Microplate Reader	Biochrom	Cat#G01906590
EnVision 2105 Multimode Plate Reader	PerkinElmer	Cat#2105-0010
Microscope Zeiss		
Microscope Mantra		
Transwell insert ThinCert [™] , 24 wells, 8 μ m	greiner bio-one	Cat#662638

Résultats

1. Les lymphocytes Tfh induisent une accumulation de Th2 dans les tumeurs murines

Nous avons précédemment démontré que les cellules Th2 productrices d'IL-4 avaient une activité pro-tumorale (Bruchard *et al.*, 2015). En utilisant un anticorps bloquant l'IL-4 (aIL-4), nous avons observé dans le modèle de tumeurs pulmonaires B16-F10 mais également dans le modèle de carcinogénèse pulmonaire chimio-induite par l'uréthane (**Fig. Supplémentaire 1**) une diminution du nombre de foyers tumoraux chez les souris traitées avec l'aIL-4 (**Fig. 1a** et **1b**). En comparant les sous-populations T CD4⁺ dans les poumons sains porteurs de tumeurs (selon la stratégie décrite dans la **Fig. Supplémentaire 2**), nous avons observé une augmentation significative de Th1 (CD4⁺ CXCR3⁺ CCR6⁻), Th2 (CD4⁺ CXCR3⁻ CCR6⁻ ST2⁺) et Tfh (CD4⁺ CXCR5⁺ PD-1⁺ sans discrimination des « sous-populations » Tfh (Tfh1, Tfh2, Tfh17) toutefois de plus en plus décrites, notamment parmi les cellules circulantes du sang)(Cannons *et al.*, 2013 ; Bentebibel *et al.*, 2015 ; Fang *et al.*, 2017 ; Schmitt *et al.*, 2014 ; Varricchi *et al.*, 2016) (**Figure supplémentaire 3**) dans les poumons de souris porteuses de tumeurs (**Fig. 1c** et **1d**) dans les modèles B16-F10 et traitées à l'uréthane mais également dans les modèles CT26 et LLC1 (carcinome colorectal et cancer du poumon de Lewis respectivement) (**Figure supplémentaire 4**). L'analyse de la proportion des différentes sous-populations de cellules T CD4⁺ a montré une forte corrélation entre les nombres de Tfh et de Th2 dans les poumons de souris porteuses de tumeurs B16-F10 et induite par l'uréthane (**Fig. 1** et **Fig. Supplémentaire 5**). Toutefois, cette corrélation n'est pas retrouvée avec les autres sous-types (**Tableaux Supplémentaires 1 et 2**). Les cellules CD4⁺ PD-1⁺ CXCR5⁺ de ganglions drainant les tumeurs ou de tumeur, ont été nommées Tfh et présentent un profil d'expression canonique de ce sous-type T CD4⁺. Ces cellules expriment *il21*, *Bcl6* et *Ascl2* mais n'expriment pas de taux significatifs d'*il-4*, d'*il-17*, d'*ifng*, de *Rorc*, de *Tbx21* et de *gata3*, confirmant l'état de différenciation (**Fig. Supplémentaire 6**).

Nous avons utilisé une technique de transfert adoptif pour confirmer le lien potentiel entre Tfh et Th2. Les cellules Th1, Th2 et Tfh spécifiques de l'ovalbumine ont été générées *in vitro* par stimulation de lymphocytes T CD4⁺ naïfs de souris OT-II (hébergeant des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques des acides aminés 323-339 de l'ovalbumine de poulet) par l'IL-12, l'IL-4 ou l'IL -6 et l'IL-21 respectivement. L'analyse transcriptomique des cellules Tfh générées *in vitro* a été comparée au profil transcriptomique des cellules Tfh isolées de souris porteuses de tumeurs. Ces cellules

partagent une forte similitude dans leur programme de transcription, avec seulement 13,2% de gènes augmentés ou réprimés (facteur 2) de manière significative entre chaque condition (**Fig. Supplémentaire 7**). L'analyse de l'ensemble de gènes Tfh isolés *in vitro* et issus de tumeurs a permis de les regrouper et de démontrer que les cellules Tfh obtenues *in vitro* expriment un profil génétique signature des Tfh mais différent de celui caractérisant les profils Th1, Th2 et Th17 (**Fig. Supplémentaire 8**). En outre, une analyse d'enrichissement de gènes exprimés de manière différentielle (Kuleshov *et al.*, 2016) montre que les cellules Tfh différenciées *in vitro* ne possèdent pas de profil transcriptomique Th1, Th2, Th17 ou Treg (**Fig. Supplémentaire 9**). En utilisant le modèle de foyers tumoraux pulmonaires de cellules B16-OVA, (modèle de mélanome murin exprimant l'ovalbumine), nous avons suivi l'impact d'un transfert adoptif cellulaire sur le microenvironnement tumoral. Nous avons observé que les cellules Th2 ainsi que le niveau d'IL-4 était augmenté dans les poumons après le transfert adoptif de cellules Tfh (**Fig. 1f** et **Fig. Supplémentaire 10**), alors que le transfert de Th1 n'induit pas une telle modification (**Fig. Supplémentaires 10** et **11**). Peu de modifications ont été observées dans d'autres sous-populations cellulaires (**Figure 1f** et **Fig. Supplémentaire 11**). En utilisant le marqueur CD45.1, nous avons pu isoler les cellules Tfh OT-II et observer qu'elles ne sont pas transdifférenciées en cellules « Th2-like » exprimant l'*il-4* et *Gata3* (**Fig. Supplémentaire 12**).

Après injection intraveineuse de cellules Tfh ou Th1 spécifiques à l'ovalbumine, nous avons observé que des cellules Tfh et Th1 étaient retrouvées dans les poumons, la rate et les ganglions médiastinaux (drainant les poumons porteurs de tumeurs) (**Fig. Supplémentaire 13**) et partageaient une efficacité anti-tumorale similaire, tandis que le transfert de cellules Th2 montre l'effet pro-tumoral (**Fig. 1g**). Les cellules Th2 ont été décrites comme ayant une activité pro-tumorale dépendante de l'IL-4 (Bruchard *et al.*, 2015). Le traitement des souris avec un anticorps bloquant l'IL-4 (αIL-4) a augmenté l'efficacité anti-tumorale du transfert de Tfh par rapport au traitement avec l'IL-4 ou au transfert adoptif Th1 seul (**Fig. 1h**). Ces données suggèrent que la production d'IL-4 par les cellules Th2 limite les propriétés anti-tumorales des Tfh.

Ensemble, ces données montrent que les cellules Tfh s'accumulent au niveau tumoral dans les organes lymphoïdes dans les modèles de tumeurs B16-F10 transplantables et spontanées (uréthane). Cette accumulation est corrélée à l'accumulation de cellules Th2, ce qui limiterait l'activité anti-tumorale des cellules Tfh de manière dépendante de l'IL-4.

Fig. 1. Les lymphocytes Tfh induisent une accumulation de Th2 dans les tumeurs murines

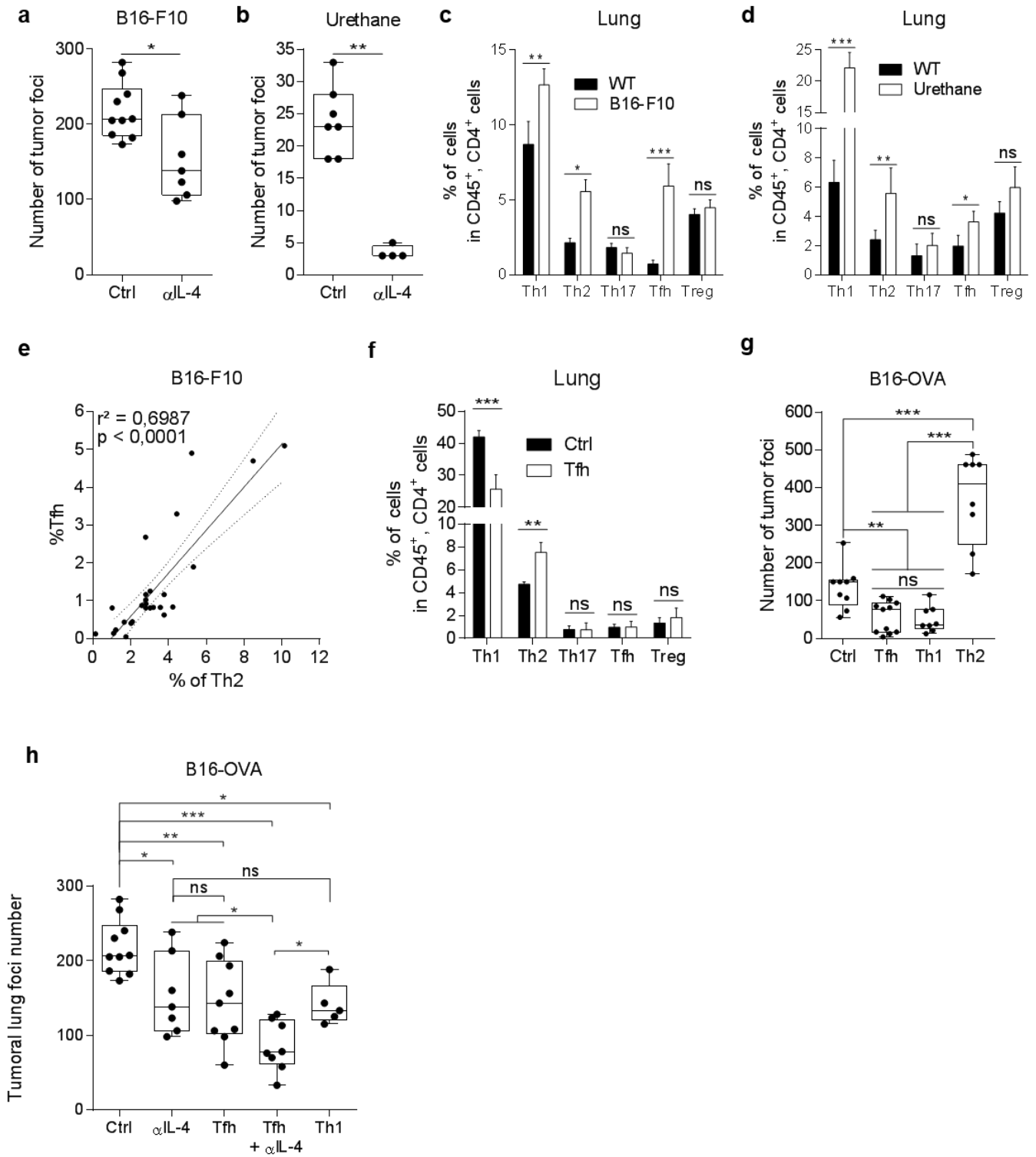


Fig. 1. Les lymphocytes Tfh induisent une accumulation de Th2 dans les tumeurs murines.

(a) Des souris C57BL/6 ont été traitées par injection intraveineuse de cellules B16F10 (mélanome murin) et ont été sacrifiées 13 jours après. Les poumons de souris contrôle (Ctrl) et traitées par un anticorps bloquant l'IL-4 (aIL-4) ont été prélevés et les foyers tumoraux ont été dénombrés. (b) Des souris C57BL/6 ont été traitées par injection intrapéritonéale d'uréthane, une fois par semaine pendant 10 semaines. Les souris ont été sacrifiées 5 mois après la première injection. 15 jours avant leur sacrifice, un groupe de souris a été traité avec de l'aIL-4. Les poumons de souris Ctrl et traitées avec l'aIL-4 ont été prélevés et les foyers tumoraux ont été dénombrés. (c et d) Proportion des sous-populations T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17, Tfh, Treg) dans les poumons de souris porteuses de tumeurs B16-F10 (c) et traitées à l'uréthane (d). Les sous-types T CD4⁺ ont été discriminés conformément à la stratégie décrite dans la Fig. Supplémentaire 2. (e) Corrélation entre les proportions de cellules Th2 et Tfh dans les poumons de souris porteuses de tumeurs B16-F10. (f) Transfert adoptif de Tfh OT-II différenciés *in vitro* dans des souris porteuses de tumeurs B16-OVA. Proportion des sous-types T CD4⁺ dans les poumons de souris Ctrl et ayant reçu les Tfh OT-II. (g). Transfert adoptif de cellules Th1 et Th2 et Tfh OT-II différenciés *in vitro* dans des souris porteuses de tumeurs B16-OVA. 13 jours après l'injection des cellules tumorales, les poumons des souris Ctrl et ayant reçu les Th1, Th2 et Tfh OT-II ont été prélevés et les foyers tumoraux ont été dénombrés. (h) Transfert adoptif de Th1 et Tfh OT-II différenciés *in vitro* dans des souris porteuses de tumeurs B16-OVA. Les souris ont été divisées en cinq groupes: B16-OVA sans traitement (Ctrl), B16-OVA + anticorps bloquant l'IL-4 (aIL-4), B16-OVA + Tfh OT-II (Tfh), B16-OVA + Tfh + aIL-4 (Tfh + aIL-4) et B16-OVA + Th1 OT-II (Th1). A j13, les poumons ont été prélevés et les foyers tumoraux ont été dénombrés.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM pour au minimum trois expériences représentatives et indépendantes; * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001.

2. Les lymphocytes Tfh produisent de la PGD2

Comme le nombre de cellules Th2 augmentait après le transfert adoptif de Tfh générés *in vivo*, nous nous sommes demandé si ces cellules pouvaient attirer les Th2 au niveau du site tumoral. A l'aide de nos données de « RNA Sequencing », nous avons analysé l'expression de gènes codant pour des protéines connues pour attirer les cellules Th2 (*Ccl17*, *Ccl22*, *il33*, *Eotaxin*, *Hpgds* et *Pacap*) (Azazi *et al.*, 2007; Delgado *et al.*, 2004; Hammad *et al.*, 2004). ., 2003; Komai-Koma *et al.*, 2007). Parmi ces gènes, nous avons observé que seul l'*Hpgds* est exprimé dans les cellules Tfh générées *in vitro* ou isolées de tumeurs, mais pas dans les cellules Th1 (**Fig. 2a** et **Fig. Supplémentaire 14**). De plus, en analysant par qPCR, nous avons démontré que les Tfh isolés de tumeurs et différenciés *in vitro* expriment l'*Hpgds* dans des proportions plus importantes que les autres sous-types T CD4⁺. Les cellules Th2 ne montrent pas d'expression significative d'*Hpgds* (**Fig. 2b** et **2c**). Par immunoblot et immunofluorescence, nous avons montré que les cellules Tfh expriment l'HPGDS au niveau protéique (**Fig. 2d** et **2e**). L'HPGDS est l'enzyme qui catalyse la conversion de la PGH2 en PGD2 dans la voie de biosynthèse des eicosanoïdes. Pour nous assurer que l'HPGDS est fonctionnelle dans les cellules Tfh, nous avons quantifié la production de PGD2 à l'aide d'un EIA. Les cellules Tfh différenciées *in vitro* (**Fig. 2f**) et les cellules Tfh isolées de souris porteuses de tumeurs restimulées pendant 24 heures en présence d'anti-CD3 et d'anti-CD28 (**Fig. 2g**) présentent une quantité significative de PGD2 par rapport à des cellules Th0 (*in vitro*) ou Th1 (*ex vivo*). Enfin, pour nous assurer que l'HPGDS des cellules Tfh était responsable de la production de PGD2, nous avons effectué un marquage par immunofluorescence dans les Tfh et observé une colocalisation du site d'expression de l'HPGDS et du site de production de la PGD2 dans des cellules Tfh (**Fig. 2h**). De plus, le niveau d'expression d'HPGDS est corrélé à la production de PGD2 dans les cellules Tfh (**Fig. 2i**).

Ensemble, ces données montrent que les cellules Tfh expriment une HPGDS biologiquement active, responsable de la production de PGD2.

Fig. 2 Les lymphocytes Tfh produisent de la PGD2

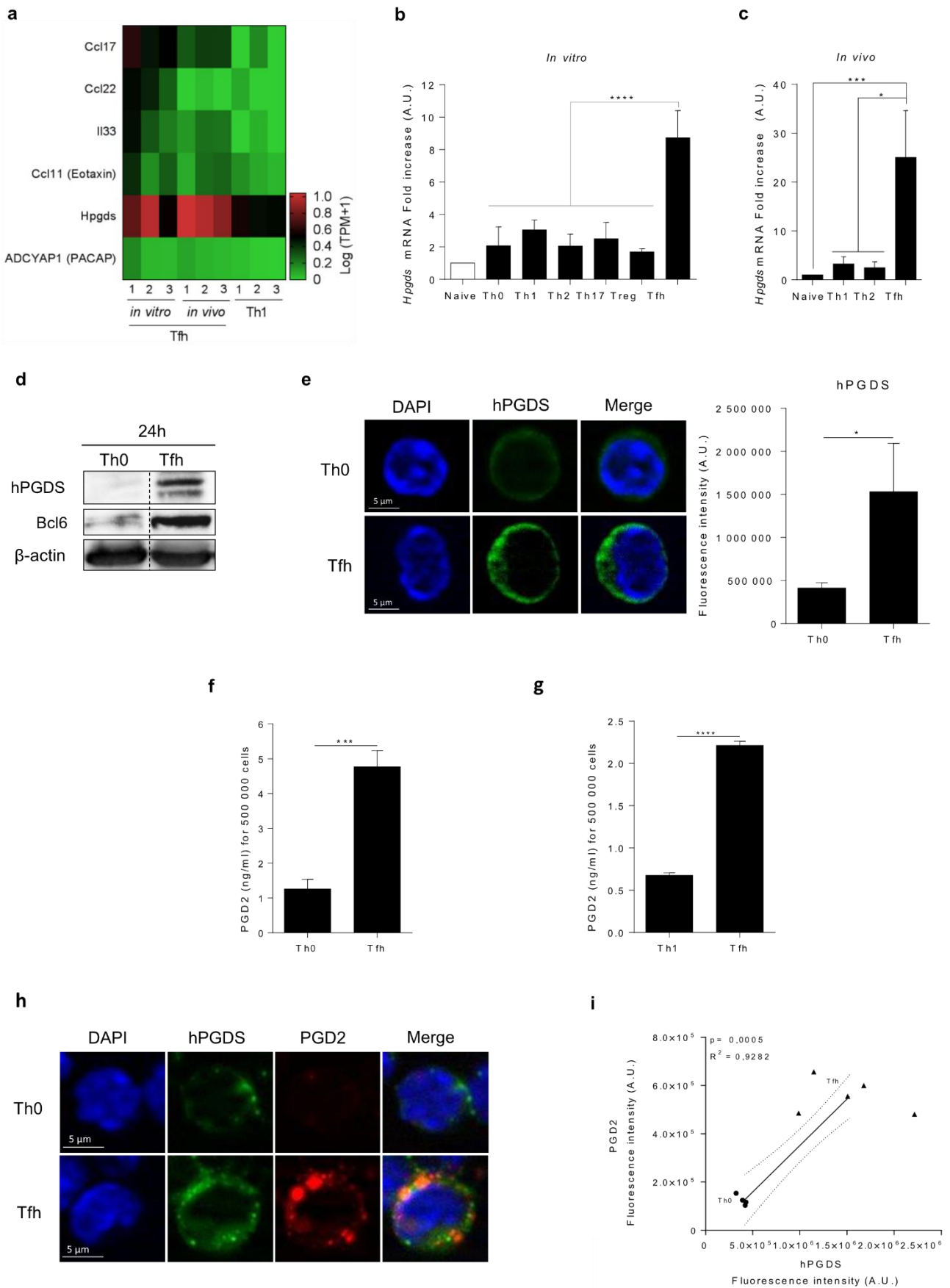


Fig. 2 Les lymphocytes Tfh produisent de la PGD2.

(a) « Heat map » réalisé à partir des données de « RNA sequencing » des gènes codant des facteurs connus pour attirer les cellules Th2 (*Ccl17*, *Ccl22*, *il33*, *Eotaxin*, *Hpgds* et *Pacap*) dans des cellules Tfh et Th1 différenciés *in vitro* (48h après polarisation) et *in vivo*. (b et c) expression d'*Hpgds* dans les cellules T CD4⁺ naïves, les cellules Th0, Th1, Th2, Th9, Th17, Treg et Tfh 4h après polarisation *in vitro* (b) et les cellules T CD4⁺ naïves, Th1, Th2 et Tfh de tumeur (c). (d) Analyse de l'expression protéiques de Bcl6, HPGDS et de la β -actine par Western Blot dans les Th0 et les Tfh 24h après la polarisation *in vitro*. (e) Panel de gauche: immunolocalisation d'HPGDS par immunofluorescence dans les cellules Th0 et Tfh 24h après la polarisation *in vitro*. Panel de droite: Quantification de l'intensité de fluorescence de l'hPGDS. (f et g) Quantification par ELISA de la PGD2 (ng/ml) produite par les Th0 et Tfh 16h après polarisation *in vitro* (f) et Th1 et Tfh de tumeur restimulés sur la nuit avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (g). (h) Immunolocalisation (co-localisation) de l'hPGDS et de la PGD2 par immunofluorescence dans les cellules Th0 et Tfh 24h après la polarisation *in vitro*. Corrélation entre l'intensité de fluorescence d'hPGDS et celle de la PGD2 à partir des expériences d'immunofluorescence (e et h) dans des cellules Th0 et Tfh 24h après polarisation *in vitro*.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM pour au minimum trois expériences représentatives et indépendantes; * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001.

3. La PGD2 produite par les Tfh attire et booste les fonctions des cellules Th2.

La prostaglandine D2 est connue pour agir *via* les récepteurs CRTH2 ou DP1 (Pettipher *et al.*, 2007). Par conséquent, nous avons analysé par immunofluorescence la présence de ces récepteurs au niveau de la membrane des cellules Th2 générées *in vitro*. Nous avons observé que CRTH2 est exprimé sur les cellules Th2 et non sur les cellules Th1 ou Tfh. L'expression de DP1 n'a pas été retrouvée à la surface des Tfh, Th1 et Th2 (**Fig. Supplémentaire 15**).

Pour déterminer l'effet de la PGD2 produite par les Tfh, nous avons tout d'abord incubé des cellules Th2 différenciées *in vitro* avec des doses croissantes de PGD2 recombinante ou avec du surnageant de culture de cellules Tfh différenciées *in vitro*. Le surnageant de Th1 a été utilisé comme contrôle. Nous avons observé que la PGD2 de synthèse ainsi que le surnageant de Tfh augmentaient l'expression de l'*il-4*, (**Fig. 3a**), de l'*il10* et de l'*il5* (**Fig. Supplémentaire 16**) au sein des Th2 différenciées *in vitro*. Ces données ont été confirmées au niveau protéique par ELISA (**Fig. 3b** et **Fig. Supplémentaire 17**) et par marquage intracellulaire de l'IL-4 (**Fig. 3c**). Pour valider que l'effet du surnageant de Tfh sur la production de cytokines Th2 était dépendant de la PGD2, nous avons utilisé du TM30089, un inhibiteur pharmacologique spécifique du récepteur CRTH2 ou du surnageant de cellules de Tfh générées *in vitro* après transfection d'un siRNA ciblant le transcrite de l'*Hpgds* (*siHpgds*) (**Fig. Supplément 18**) ou générées à partir de souris déficientes pour l'*hPGDS* (*Hpgds*^{-/-}). Puisque les cellules Tfh produisent de l'IL-21, nous avons utilisé un anticorps bloquant l'IL-21 (aIL-21) comme témoin. En effet, il est connu que l'IL-21 affecte positivement les cellules Th2 (Lajoie *et al.*, 2014). Nous avons observé que le surnageant de Tfh provenant de cellules transfectées avec le *siHpgds*, de cellules *Hpgds*^{-/-} ou traités avec du TM30089 perdait sa capacité à augmenter l'expression et la production des cytokines Th2. Cette capacité n'est toutefois pas perturbée lorsque l'aIL-21 est additionné au surnageant de Tfh (**Fig. 3d, 3e** et **Fig. Supplémentaires 19** et **20**). On sait que la PGD2 agit par chimiotactisme et pourrait induire le recrutement de cellules exprimant CRTH2. *In vivo*, nous avons effectué des transferts adoptifs de Tfh OT-II et de Th2 OT-II chez des souris porteuses tumeurs B16-OVA au niveau pulmonaire. Pour suivre les cellules Tfh et Th2, chaque type de cellule a été marqué avec un traceur cellulaire différent (CFSE et FarRed respectivement). Nous avons observé qu'une petite fraction des cellules Tfh et

Th2 se trouvent dans les poumons. Par microscopie à fluorescence, nous avons observé que les cellules Tfh et Th2 se retrouvent co-localisées dans les poumons de souris porteuses de tumeurs, suggérant un mécanisme de chimio-attraction (**Fig. 3f**). Pour valider le rôle chimioattractant de la PGD2 produite par le Tfh sur les Th2, nous avons effectué des tests de migration par Transwell. Nous avons observé que la PGD2 recombinante seule est capable d'induire la migration des cellules Th2. Nous avons également pu observer que les cellules Tfh pouvaient attirer les cellules Th2, alors que ni les cellules T CD4⁺ naïves ni les Th0 n'étaient capables de le faire. Cette migration a été complètement supprimée lorsque les cellules Tfh ont été différenciées à partir de souris *Hpgds*^{-/-} ou lorsque que le TM30089 a été ajouté aux cellules (**Fig. 3g** et **Fig. Supplémentaire 21**).

Ensemble, ces données montrent que la PGD2 produite par les Tfh pourrait augmenter la production cytokinique des Th2 et induire leur recrutement au site de la tumeur.

Fig. 3 La PGD2 produite par les Tfh attire et booste les fonctions des cellules Th2.

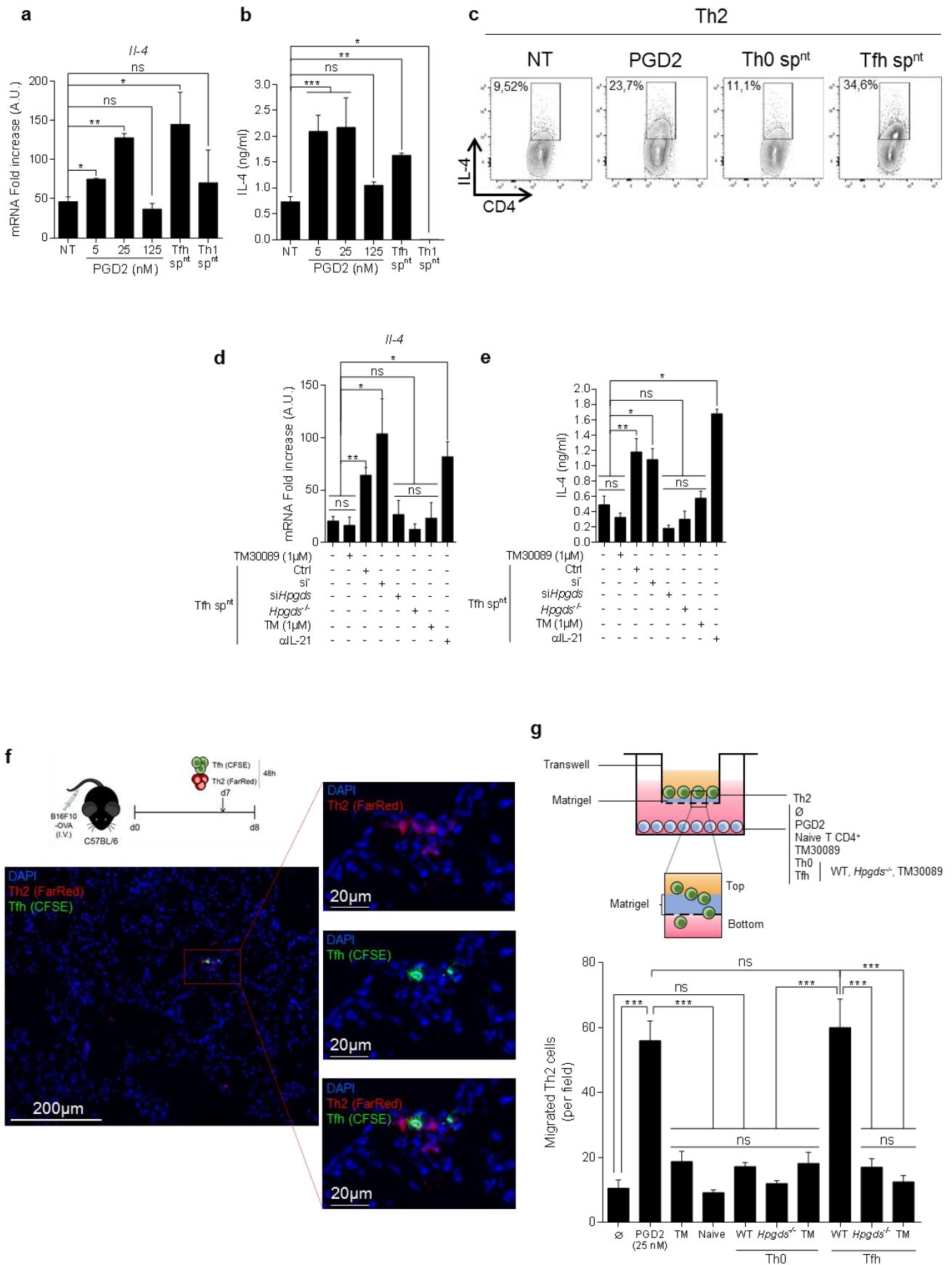


Fig. 3 La PGD2 produite par les Tfh attire et booste les fonctions des cellules Th2.

(a et b) Expression de l'*Il-4* (a) et quantification par ELISA de la production d'*IL-4* (b) produite par des cellules Th2 différenciées *in vitro* en présence ou non (NT) de PGD2 recombinante (5, 25 et 125 nM) ou de surnageant de Tfh ou Th1 différenciés *in vitro* (Tfh^{spnt} ou Th1^{spnt}). (c) Pourcentage de cellules CD4⁺ IL-4⁺ mesurées par cytométrie de flux à partir de Th2 différenciés *in vitro* en présence ou non (NT), de PGD2 recombinante (25 nM), ou de surnageant de Tfh ou Th1 différenciés *in vitro*. (d et e) Expression de l'*Il-4* (d) et quantification par ELISA de la production d'*IL-4* (e) produite par des cellules Th2 différenciées *in vitro* en présence ou non (NT) de TM30089 (1µM) (inhibiteur spécifique de la CRTH2) ou de surnageant de Tfh différenciés *in vitro*. Les Tfh polarisés *in vitro* sont issus de souris WT (Ctrl), de souris déficientes pour hPGDS (*Hpgds*^{-/-}) ou déficientes en *Hpgds* par stratégie de siRNA (*siHpgds*) supplémentée ou non avec du TM30089 (1µM) ou de l'*α*IL-21. (f) Panel supérieur: Résumé schématique du transfert adoptif de cellules Th2 et Tfh OT-II marquées avec un traceur cellulaire (CellTrace™ Far Red et CFSE respectivement) dans des souris porteuses de tumeurs B16-OVA pulmonaire. Un jour après le transfert de Th2 et de Tfh, les poumons des souris ont été prélevés, inclus dans du milieu OCT, congelés, coupés, chargés sur des lames de microscopie et marqués au DAPI. Panel inférieur: Image de microscopie à fluorescence d'un poumon: les cellules structurelles sont colorées en bleu (DAPI), les Th2 en rouge et les Tfh en vert. (g) Panel supérieur: Résumé schématique de l'expérience de migration par Transwell. Panel inférieur: Nombre de cellules Th2 ayant migrées à travers la matrice de Matrigel chargée dans l'insert. Les puits de la plaque 24 puits contiennent les différentes conditions T CD4⁺ naïfs, Th0 ou Tfh WT ou déficients pour hPGDS complémentés ou non (∅) avec de la PGD2 (25 nM) ou du TM30089. Les cellules Th2 qui ont migré ont été marquées au DAPI.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM pour au minimum trois expériences représentatives et indépendantes; * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001.

4. Le complexe STAT1/STAT3 régule l'expression d'*Hpgds* au sein des Tfh.

Puisque *Hpgds* est exprimé au sein des Tfh et non dans des cellules T CD4⁺ naïves ou d'autres sous-types T CD4⁺ (**Fig. 2b**), nous avons émis l'hypothèse que l'IL-6 et l'IL-21, utilisées pour générer les Tfh *in vitro*, sont nécessaires à l'induction de l'expression d'*Hpgds* dans les cellules Tfh. L'IL-6 et l'IL-21 seules ont un effet modeste sur l'expression d'*Hpgds*, mais lorsque les cellules ont été traitées à la fois avec l'IL-6 et l'IL-21, l'expression d'*Hpgds* a été fortement augmentée (**Fig. 4a**). Inversement, l'utilisation d'anticorps bloquants l'IL-6 et/ou l'IL-21 (αIL-6 et αIL-21) réduit l'expression d'*Hpgds* (**Fig. 4b**). Ces résultats ont indiqué que les deux signaux sont nécessaires pour induire *Hpgds* dans les cellules Tfh. Pour aller plus loin, il est connu que l'IL-6 et l'IL-21 peuvent induire une phosphorylation et une activation de STAT1 et STAT3 au cours de la différenciation du Tfh (Choi *et al.*, 2013; Nurieva *et al.*, 2008). Pour confirmer que les deux STATs sont activés dans les cellules Tfh, nous avons analysé leur statut de phosphorylation au cours des premières étapes de la différenciation Tfh *in vitro* en utilisant les Th1 et Th17 comme contrôles positifs. Nous avons observé que STAT1 et STAT3 sont phosphorylés respectivement sur les tyrosines 701 et 705 (Y701 et Y705) dès 3 min après l'induction de la polarisation Tfh (**Fig. 4c**). Nous avons également confirmé que STAT1 et STAT3 sont tous deux activés dans des cellules Tfh réactivées *ex vivo* (**Fig. 4d**). En utilisant des inhibiteurs pharmacologiques de STAT1 et STAT3 (EGCG et STA21 respectivement), nous avons bloqué l'induction de l'*Hpgds* au niveau transcriptionnel et de protéique (**Fig. 4e et 4f**). Nous avons ensuite réalisé une analyse bioinformatique du promoteur de l'*Hpgds* via la plateforme Genomatix et nous avons observé un site de liaison putatif pour STAT3 (-839 à -820) et pan-STAT (-394 à -375). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont montré que pSTAT3 et pSTAT1 sont tous deux liés aux deux sites de liaison identifiés, ce qui suggère qu'ils pourraient coopérer aux mêmes sites de fixation à l'ADN (**Fig. 4g**). Ceci a été confirmé par le test de proximité (Proximity Ligation Assay, PLA) montrant une co-localisation entre pSTAT1 et pSTAT3 dans les cellules Tfh et Th17, et non dans les Th1 utilisés comme contrôle négatif (**Fig. 4h et Fig. Supplémentaire 22**). Enfin, nous avons utilisé un test par gène rapporteur luciférase pour valider que la présence de STAT1 et de STAT3 est nécessaire pour une activation optimale du promoteur d'*Hpgds*. Pour ce faire, nous avons cloné le promoteur *Hpgds* en amont du gène de la luciférase dans des cellules 4T1. Dans

ces cellules, la phosphorylation de STAT1 et STAT3 peut être activée de manière exogène par traitement à l'IFN γ et l'IL-6 (**Fig. Supplémentaire 23**). Nous avons observé que l'activation des deux STATs permet une activité optimale du promoteur *Hpgds* (**Fig. 4i**).

Ensemble, ces données montrent qu'un complexe protéique formé au minimum par le complexe protéique pSTAT1/pSTAT3 est responsable de l'expression d'*Hpgds* dans les cellules Tfh.

Fig. 4 Le complexe STAT1/STAT3 régule l'expression d'*Hpgds* au sein des Tfh.

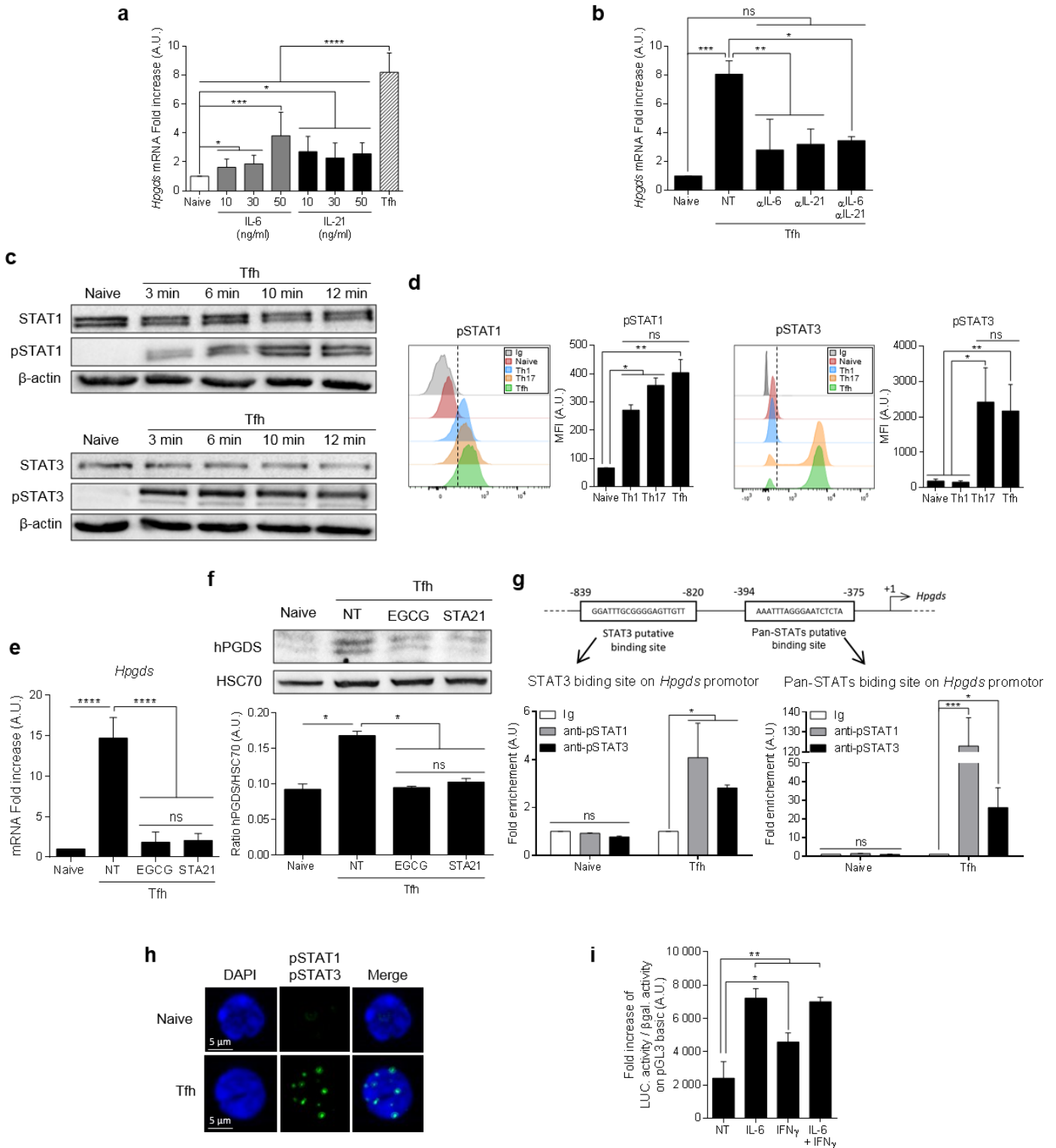


Fig. 4 Le complexe STAT1/STAT3 régule l'expression d'Hpgds au sein des Tfh.

(a) Expression d'Hpgds dans les cellules T CD4⁺ naïves, activées par stimulation aux anticorps anti-CD3 et anti-CD28 et traitées avec de l'IL-6 recombinante (10, 30 et 50 ng/ml), de l'IL-21 recombinante (10, 30 et 50 ng/ml) ou les deux ([IL-6] = 50 ng/ml; [IL-21] = 50 ng/ml) (Tfh) en comparaison avec les cellules T CD4⁺ naïves non activées et non traitées. (b) Expression d'Hpgds dans des cellules T CD4⁺ naïves et Tfh polarisées *in vitro* en présence d'anticorps bloquant l'IL-6 et/ou l'IL-21 (aIL-6 et/ou aIL-21). (c) Expression protéique de STAT1, STAT3 et leurs formes actives phosphorylées (pSTAT1 et pSTAT3) sur les tyrosines 701 (Y701) et 705 (Y705) respectivement, 3, 6, 10 et 12 minutes après l'induction de la polarisation Tfh. Des cellules T CD4⁺ naïves ont été utilisées comme contrôle négatif. (d) Analyse par cytométrie en flux de l'expression protéique de pSTAT1 et pSTAT3 dans des lymphocytes T CD4⁺ naïfs et Th1, Th17 et Tfh *ex vivo*. (e et f) Niveau d'expression transcriptionnelle (e) et protéique (f) d'hPGDS dans les lymphocytes T CD4⁺ naïfs et Tfh 24h après induction de la polarisation, traités ou non (NT) avec un inhibiteur pharmacologique de STAT1 (EGCG; 50µM) ou STAT3 (STA21; 50 µM). (g) Panel supérieur: représentation schématique des sites de liaison putatifs de STAT3 (-839 à -820) et pan-STAT (-394 à -375) sur le promoteur d'Hpgds obtenus *via* l'analyse MatInspector (Genomatic) au du promoteur d'Hpgds. Panel inférieur: Enrichissement de pSTAT3 et pSTAT1 sur les sites de liaison putatifs de STAT3 et pan-STAT du promoteur d'Hpgds par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) dans des cellules T CD4⁺ naïves et Tfh 4h après polarisation *in vitro*. (h) Mise en évidence de la proximité de pSTAT1 et de pSTAT3 grâce à un test de PLA (Proximity Ligation Assay; Duolink®) dans les lymphocytes T CD4⁺ naïfs et Tfh 4h après polarisation *in vitro*. (i) Test de gène rapporteur luciférase dans les cellules 4T1 exprimant constitutivement les facteurs STAT1 et STAT3. Les cellules ont été transfectées avec ou sans (∅) plasmide pGL3 basic ou un contenant les sites de liaison putatifs de STAT3 et pan-STAT du promoteur d'Hpgds. Ces cellules ont été traitées avec ou sans (NT) IFNγ recombinant, IL-6 recombinante ou les deux afin d'induire respectivement l'activation de STAT1 et STAT3 par phosphorylation.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM pour au minimum trois expériences représentatives et indépendantes; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

5. Cibler l'axe PGD2-CRTH2 limite la croissance tumorale

Nos données suggèrent que la PGD2 produite par les cellules Tfh favorise le recrutement et « booste » les fonctions des cellules Th2. Pour tester la pertinence pathologique d'une telle observation, des cellules de mélanome B16-F10 ont été injectées par voie intraveineuse à des souris WT et *Hpgds*^{-/-} C57BL/6. L'hPGDS est exprimée au niveau protéique uniquement dans la peau et les tissus hématopoïétiques (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000163106-HPGDS/tissue>). Afin de s'assurer que les Tfh et non les cellules cancéreuses utilisées dans notre modèle sécrètent de la PGD2, nous avons évalué la quantité de PGD2 présente dans le surnageant de culture de Tfh et de cellules B16-F10 (**Fig. Supplémentaire 24**). Dans notre modèle tumoral, nous avons observé une diminution significative du nombre de foyers tumoraux chez les souris déficientes pour hPGDS (**Fig. 5a**). Fait intéressant, les poumons de souris *Hpgds*^{-/-} présentent un infiltrat Th2 réduit par rapport aux souris WT ainsi qu'une accumulation similaire de Tfh (**Fig. 5b**). De plus, le traitement à l'uréthane montre un nombre de foyers tumoraux pulmonaires limité chez les souris *Hpgds*^{-/-} comparativement aux souris WT (**Fig. 5c**) avec un infiltrat de Th2 et Tfh similaire au modèle B16-F10 (**Fig. 5d**). Ces résultats démontrent que l'HPGDS présente un impact négatif sur la croissance tumorale et favorise l'accumulation de Th2. La déplétion en lymphocytes T CD4⁺ via l'utilisation d'un anticorps bloquant (αCD4) a réduit la croissance tumorale chez les souris WT. Contrairement aux souris déficientes en hPGDS, la déplétion en lymphocytes T CD4⁺ n'a pas eu d'impact sur la croissance tumorale, ce qui suggère que l'effet de l'hPGDS sur la croissance tumorale dépend de son expression par les lymphocytes T CD4⁺ et de leur production de PGD2 (**Fig. 5e**). De plus, il a été démontré que les cellules Tc2 (type 2 cytotoxic T cells), un phénotype « Th2-like » de cellules CD8⁺ notamment caractérisées par la production d'IL-4 (Croft *et al.*, 1994 ; Sad *et al.*, 1995 ; Vizler *et al.*, 2000), sont impliquées dans diverses pathologies telles que dans l'infection par le virus influenza (Cerwenka *et al.*, 1999), les désordres auto-immuns (Tang *et al.*, 2012), les allergies (Vizler *et al.*, 2000) et le cancer (Kemp *et al.*, 2001 ; Sheu *et al.*, 2001 ; Haghshenas *et al.*, 2016 ; Do *et al.*, 2004 ; Apte *et al.*, 2010). Dans ces contextes pathologiques, les Tc2 présentent des propriétés cytotoxiques réduites et sont impliqués dans l'aggravation de la maladie. Ainsi, afin de s'assurer que notre mécanisme n'implique pas, ni n'impacte directement les lymphocytes T CD8⁺, nous avons apprécié dans quelle mesure ces cellules expriment les récepteurs à l'IL-4 (IL-4R) (Danushka *et al.*, 2013) et à la PGD2 (CRTH2 et DP1) (**Fig.**

Supplémentaire 25) ainsi que leur proportion et leur profil cytotoxique au sein des poumons de souris WT ou déficiente pour *Hpgds* dans notre modèle de foyers pulmonaires B16-F10. Nous n'avons pas détecté d'expression basale des récepteurs IL-4Ra, CRTH2 et DP1 à la surface des lymphocytes T CD8⁺ ni de variation de proportion et de cytotoxicité dans ce modèle (**Fig. Supplémentaire 26**).

Nous avons précédemment montré que l'IL-4 était responsable de l'effet pro-tumoral des cellules Th2 dans certains modèles de cancer murins, tels que le modèle B16-F10 (Bruchard *et al.*, 2015). Comme on pouvait s'y attendre, nous avons observé ici que l'anticorps bloquant l'IL-4 (aIL-4) présente un effet anti-tumoral sur le modèle de foyers tumoraux pulmonaire B16-F10. En revanche, l'anticorps aIL-4 perd son effet anti-tumoral chez les souris déficientes pour hPGDS (**Fig. 5f**), ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle la PDG2 est nécessaire afin d'obtenir un effet pro-tumoral de l'IL-4. De même, l'inhibiteur pharmacologique spécifique du récepteur CRTH2 (TM30089), bloquant la fonction de la PDG2, réduit la croissance tumorale uniquement chez les souris WT et non chez les souris *Hpgds*^{-/-} (**Fig. 5g**). Il est intéressant de noter que la combo-thérapie associant l'inhibiteur de CRTH2 et l'aIL-4 n'a aucun effet synergique, ce qui suggère que ces deux molécules agissent sur la même voie (**Fig. 5h**).

Les mastocytes étant une autre source potentielle de PGD2, nous avons utilisé des souris Kit^{W-sh}. Ces souris portent la mutation spontanée Kit "sash" associée à un déficit en mastocytes. Dans ce modèle murin, l'inhibiteur de CRTH2, la déplétion de CD4 et l'anticorps bloquant l'IL-4 ont le même effet que chez les souris WT, ce qui suggère que le rôle de la PGD2 dans notre modèle est imputable aux cellules T CD4⁺ et non aux mastocytes (**Fig. 5i**).

Afin de tester le rôle spécifique des Tfh, nous avons utilisé des souris déficientes en Tfh (Bcl6 flox CD4cre (Bcl6^{f/f} CD4^{Cre+})) et leur contrôle (**Fig. Supplémentaire 27**). Tout d'abord, nous nous sommes assuré que les souris déficientes en Tfh présentent un taux réduit de PGD2 produit par les lymphocytes T CD4⁺ (**Fig. Supplémentaire 28**). Nous avons ensuite observé, dans le modèle de foyers tumoraux pulmonaires B16-F10, une accumulation de cellules Tfh dans le poumon de souris porteuses de tumeurs par rapport à des souris Bcl6^{f/f} CD4^{Cre-} saines. Une telle augmentation n'a pas été observée chez les souris Bcl6^{f/f} CD4^{Cre+} (**Fig. 5j**). De la même manière, une accumulation de cellules Th2 a été observée chez les souris Bcl6^{f/f} CD4^{Cre-} comparativement aux souris Bcl6^{f/f} CD4^{Cre+} (**Fig. 5k**). De plus, la croissance tumorale est limitée comparativement

aux souris contrôles et l'inhibiteur de CRTH2 perd son effet anti-tumoral (**Fig. 5l**). Enfin, un transfert adoptif de lymphocytes Tfh OT-II déficients pour *Hpgds* (*siHpgds*) dans le modèle antigène spécifique B16-OVA limite l'envahissement pulmonaire comparativement à un transfert de lymphocytes Tfh contrôle. De plus, dans ce même modèle, nous démontrons que la reconstitution de souris déficientes pour *Hpgds* via un transfert adoptif de lymphocytes Tfh OT-II tend à augmenter le nombre de foyers tumoraux pulmonaires. Ainsi, ces résultats démontrent d'une part qu'un défaut d'hPGDS au sein des Tfh améliore leur effets anti-tumoraux et que d'autres part la présence d'une hPGDS fonctionnelle au sein de ces mêmes cellules restaure le caractère pathogénique de l'axe hPGDS/PGD2 (**Fig. 5m**).

Prises ensemble, ces données indiquent que la PGD2 produite par les cellules Tfh affecte négativement leurs propriétés anti-tumorales de manière CRTH2/IL-4 dépendante.

Fig. 5 Cibler l'axe PGD2-CRTH2 limite la croissance tumorale.

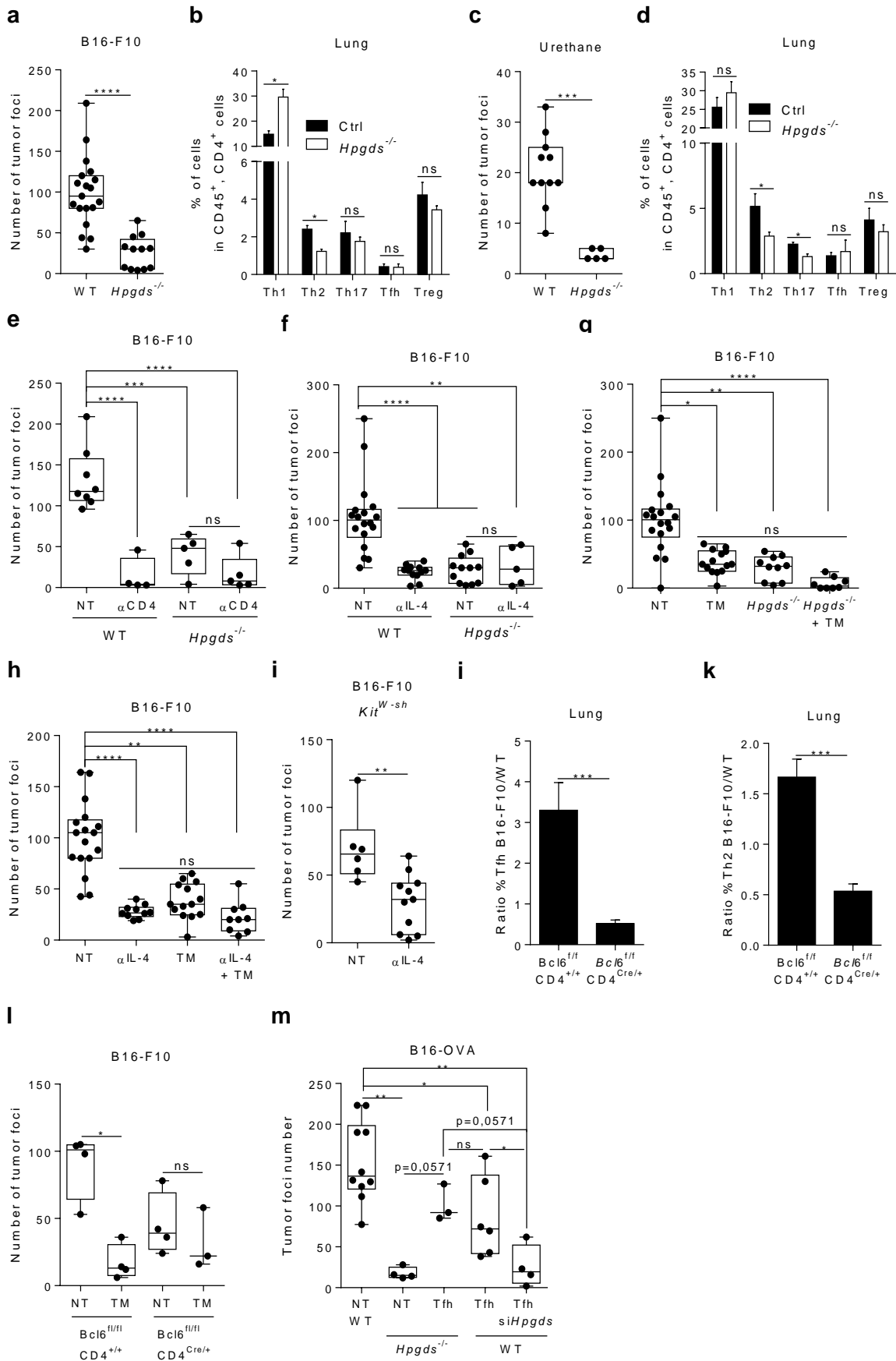


Fig. 5 Cibler l'axe PGD2-CRTH2 limite la croissance tumorale.

(a et b) Des souris WT et *Hpgds*^{-/-} C57BL/6 ont été traitées par injection intraveineuse de cellules B16-F10 et ont été sacrifiées 13 jours après. Les poumons ont été prélevés, les foyers tumoraux dénombrés (a) et la proposition des sous-populations T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17, Tfh et Treg) a été évaluée par cytométrie en flux conformément à la stratégie présentée dans la Fig. Supplémentaire 2 (b). (c et d) Des souris WT et *Hpgds*^{-/-} C57BL/6 ont été traitées par injection intrapéritonéale d'uréthane une fois par semaine pendant 10 semaines. 5 mois après la première injection, les souris ont été sacrifiées sans autre traitement supplémentaire. Les poumons ont été prélevés, les foyers tumoraux dénombrés (c) et la proposition des sous-populations T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17, Tfh et Treg) a été évaluée par cytométrie en flux (d). (e) Des souris WT et *Hpgds*^{-/-} C57BL/6 ont été traitées par injection intraveineuse de cellules B16-F10 et traitées ou non (NT) par injection intrapéritonéale d'anticorps anti-bloquant anti-CD4 (αCD4) trois fois par semaine. Les souris ont été sacrifiées au jour 15. Les poumons ont été prélevés et les foyers tumoraux dénombrés. (f) Des souris WT et *Hpgds*^{-/-} C57BL/6 ont été traitées par injection intraveineuse de cellules B16-F10 et traitées ou non (NT) par injection intrapéritonéale d'all-4 trois fois par semaine. Les souris ont été sacrifiées au jour 13. Les poumons ont été prélevés et les foyers tumoraux dénombrés. (g) Des souris WT et *Hpgds*^{-/-} C57BL/6 ont été traitées par injection intraveineuse de cellules B16-F10 et traitées ou non (NT) deux fois par jour avec du TM30089 (5g/kg par voie orale). Les souris ont été sacrifiées au jour 13, les poumons ont été prélevés et les foyers tumoraux dénombrés. (h) Des souris WT et *Hpgds*^{-/-} C57BL/6 ont été traitées par injection intraveineuse de cellules B16-F10 et traitées ou non (NT) deux fois par jour avec l'inhibiteur TM30089 (5g/kg par voie orale) et/ou trois fois par semaine par injection intrapéritonéale d'anticorps all-4. Les souris ont été sacrifiées au jour 13, les poumons ont été prélevés et les foyers tumoraux dénombrés. (i) Des souris déficientes en mastocytes (*Kit*^{W-sh}) ont été traitées par injection intraveineuse de cellules B16-F10 et traitées ou non (NT) par injection intrapéritonéale d'anticorps all-4 trois fois par semaine. Les souris ont été sacrifiées au jour 13, les poumons ont été prélevés et les foyers tumoraux dénombrés. (j et k) Les proportions de Tfh (j) et Th2 (k) entre les souris porteuses de B16-F10 et les souris saines (WT) ont été calculées chez des souris *Bcl6*^{f/f} CD4^{Cre-} et *Bcl6*^{f/f} CD4^{Cre+} C57BL/6. (l) Des souris *Bcl6*^{f/f} CD4^{Cre-} et *Bcl6*^{f/f} CD4^{Cre+} C57BL/6 ont reçu une injection intraveineuse de cellules B16-F10 et ont été traitées ou non (NT) deux fois par jour avec du TM30089 (5g/kg par voie orale). Les souris ont été sacrifiées au jour 13, les poumons ont été prélevés et les foyers tumoraux dénombrés. (m) Transfert adoptif de lymphocytes Tfh OT-II contrôles et déficients pour *Hpgds* (*siHpgds*) dans des souris WT ou déficientes ou *Hpgds* (*Hpgds*^{-/-}) porteuses de tumeurs B16-OVA.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM d'au moins trois expériences représentatives et indépendantes; * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001.

6. L'axe PGD2-CRTH2 a également des répercussions dans les tumeurs humaines

Chez l'Homme, sur la base de l'expression membranaire de marqueurs spécifiques, nous avons trié les cellules T CD4⁺ mémoires Th1, Th2, Tfh, Th17 et Treg à partir de poche de sang de donneurs sains (**Fig. Supplémentaire 29**). Par qPCR, nous avons observé que seules les cellules Tfh mémoires exprimaient un niveau significatif d'*Hpgds* comparativement aux cellules Th1, Th2, Th17 et Treg (**Fig. 6a**). Par immunofluorescence et EIA, nous avons également validé que les Tfh mémoires humains présentent la capacité de produire de la PGD2 (**Fig. 6b et 6c**). Le surnageant des cellules Tfh mémoire humains permet d'augmenter l'expression d'*Il-4* par les Th2 mémoires humains (**Fig. 6d**). Pour aborder la pertinence *in vivo* d'une telle observation sur le pronostic de patients atteint de cancer, nous avons utilisé une analyse pan-cancer à partir de données de « RNA sequencing » disponible dans les bases de données TCGA (The Cancer Genome Atlas Program, National Cancer Institute). En utilisant la stratégie de métagènes précédemment décrite (Charoentong *et al.*, 2017), nous avons évalué la corrélation entre l'accumulation de cellules B, CD8, Th2 et Tfh dans 20 types de cancer. Nous avons observé une forte corrélation entre la fréquence des métagènes Tfh, Th2, CD8 et B dans tous les types de cancer (**Fig. 6e et Fig. Supplémentaire 30**). L'expression d'*Hpgds* et le métagène Tfh sont corrélés dans 6 types de cancers. Nous nous sommes concentrés sur le cancer du pancréas puisqu'il s'agissait de la pathologie dans laquelle Tfh/Th2/*Hpgds* présentaient la corrélation la plus significative. En séparant les patients en 3 groupes selon l'accumulation respective de cellules Tfh et/ou Th2, nous avons observé que les patients présentant un niveau élevé de Tfh et un faible niveau de Th2 présentaient un meilleur pronostic, alors que les patients avec un niveau élevé de Th2 et un faible niveau de Tfh présentaient un plus mauvais pronostic. D'autres patients présentant des taux de Tfh et de Th2 élevés ou de Tfh et Th2 faibles sont caractérisés par un pronostic intermédiaire (**Fig. 6f**). L'utilisation du modèle Cox multivarié a permis de prendre en compte les variables cliniques pronostics classiques (âge, sexe, stade TNM). Ainsi, l'accumulation de Tfh/Th2 apparaît comme un facteur pronostic indépendant (**Tableau Supplémentaire 3**).

Ensemble, ces données soulignent que, comme chez la souris, les cellules Tfh expriment l'hPGDS et induisent l'activation des cellules Th2. Dans le cancer du

pancréas, nous avons observé que l'équilibre Tfh/Th2 est associé à l'évolution du patient.

Fig. 6 L'axe PGD2-CRTH2 a également des répercussions dans les tumeurs humaines.

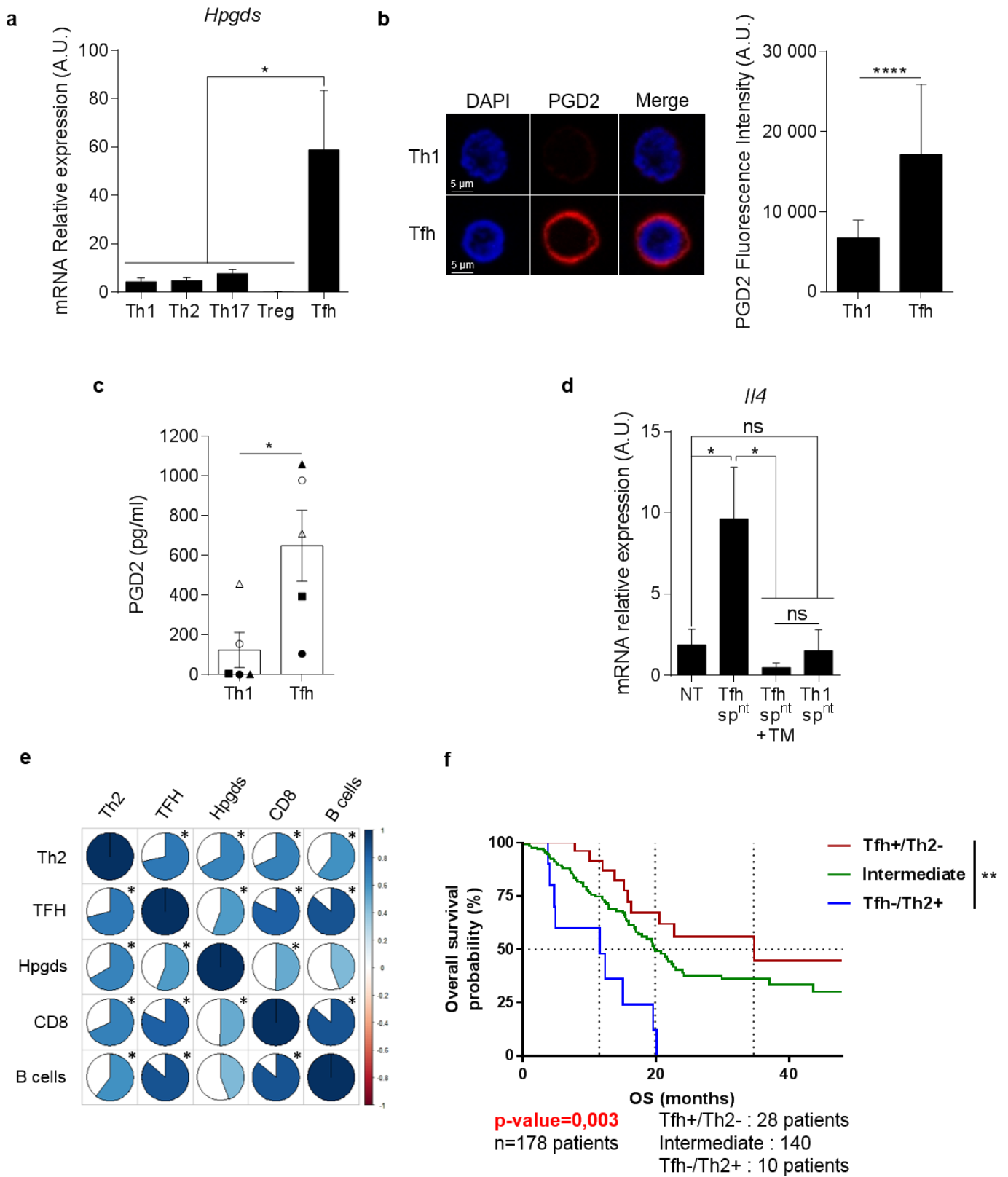
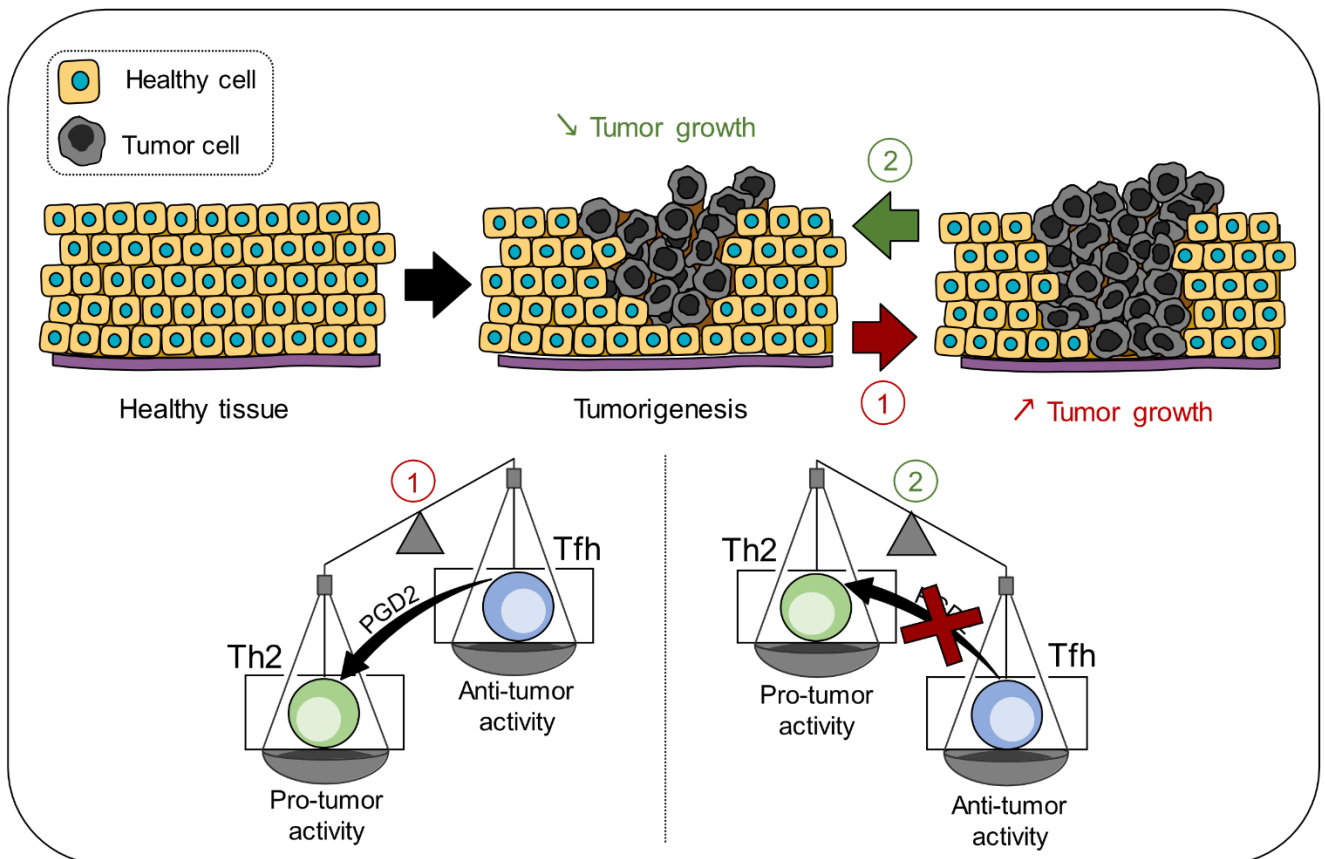
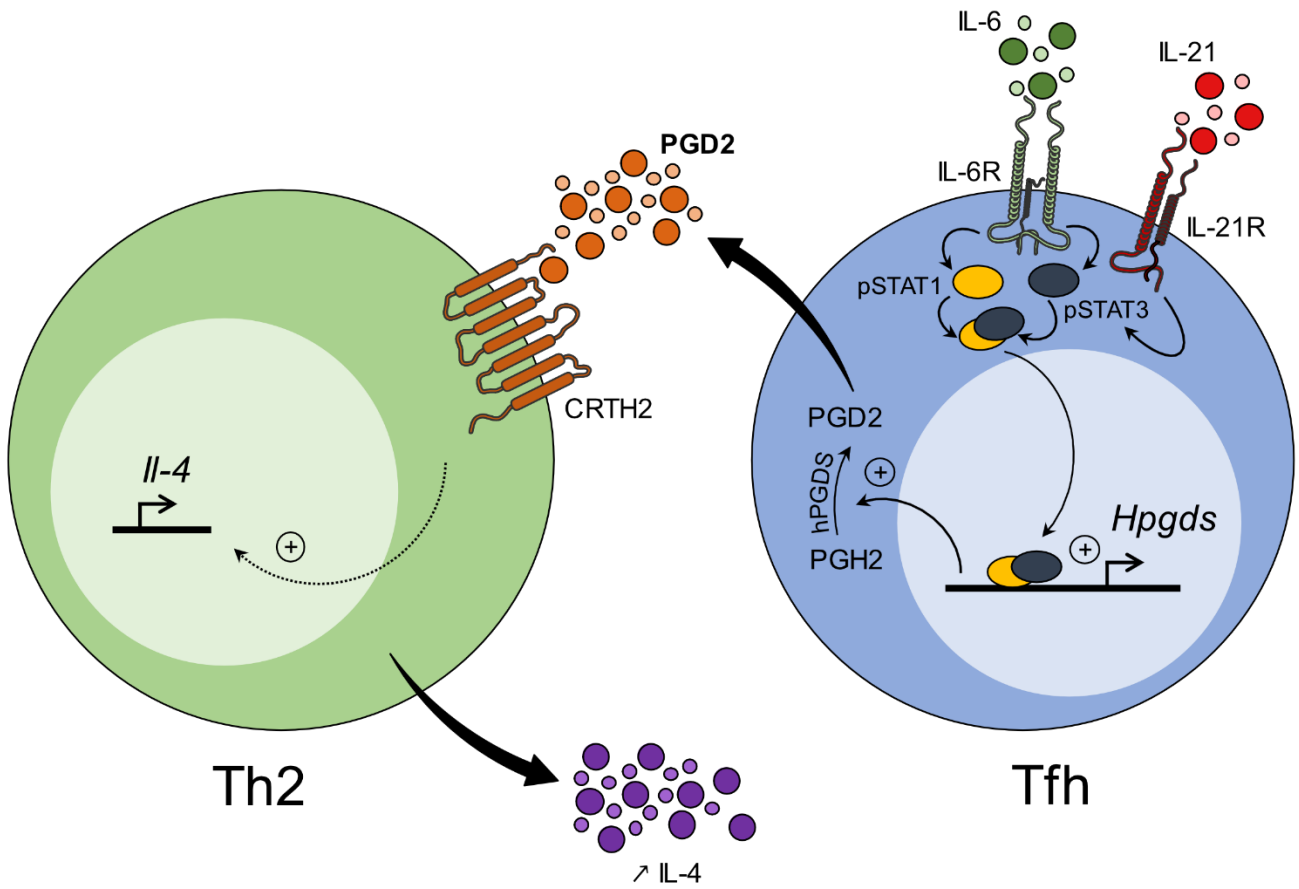


Fig. 6 L'axe PGD2-CRTH2 a également des répercussions dans les tumeurs humaines.

(a) Niveau d'expression transcriptionnelle d'*Hpgds* dans les cellules T CD4⁺ naïves, Th1, Th2, Th17, Treg et Tfh triées à partir de PBMC de donneurs sains et réactivées *in vitro* en présence d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28. (b) Panel de gauche: Immunolocalisation de la PGD2 par immunofluorescence dans des cellules Th1 et Tfh triées à partir de PBMC de donneurs sains et restimulées sur la nuit en présence d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Panel de droite: Quantification de l'intensité de fluorescence de la PGD2. (c) Quantification par EIA de la production de PGD2 (ng/ml) produite par les cellules Th1 et Tfh à partir de PBMC de donneurs sains et réactivée *in vitro* en présence d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28. (d) Niveau d'expression transcriptionnelle *Il-4* dans les cellules Th2 humaines traitées ou non (NT), avec du surnageant de Th1 et Tfh humains (Th1^{spnt}, Tfh^{spnt}). (e) Matrice de corrélation entre les métagènes Tfh, Th2, CD8, lymphocytes B et *Hpgds* dans le cancer du pancréas (PAAD). (f) Courbes de survie globale *via* utilisation de l'estimateur de Kaplan Meier. Les patients de la cohorte PAAD du TCGA ont été stratifiés en fonction du niveau d'accumulation de Th2 et de Tfh (métagène). Trois groupes ont été obtenus en utilisant les seuils donnés par l'algorithme Finder Cutoff.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM d'au moins trois expériences représentatives et indépendantes; * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001.

7. Résumé schématique



En bref

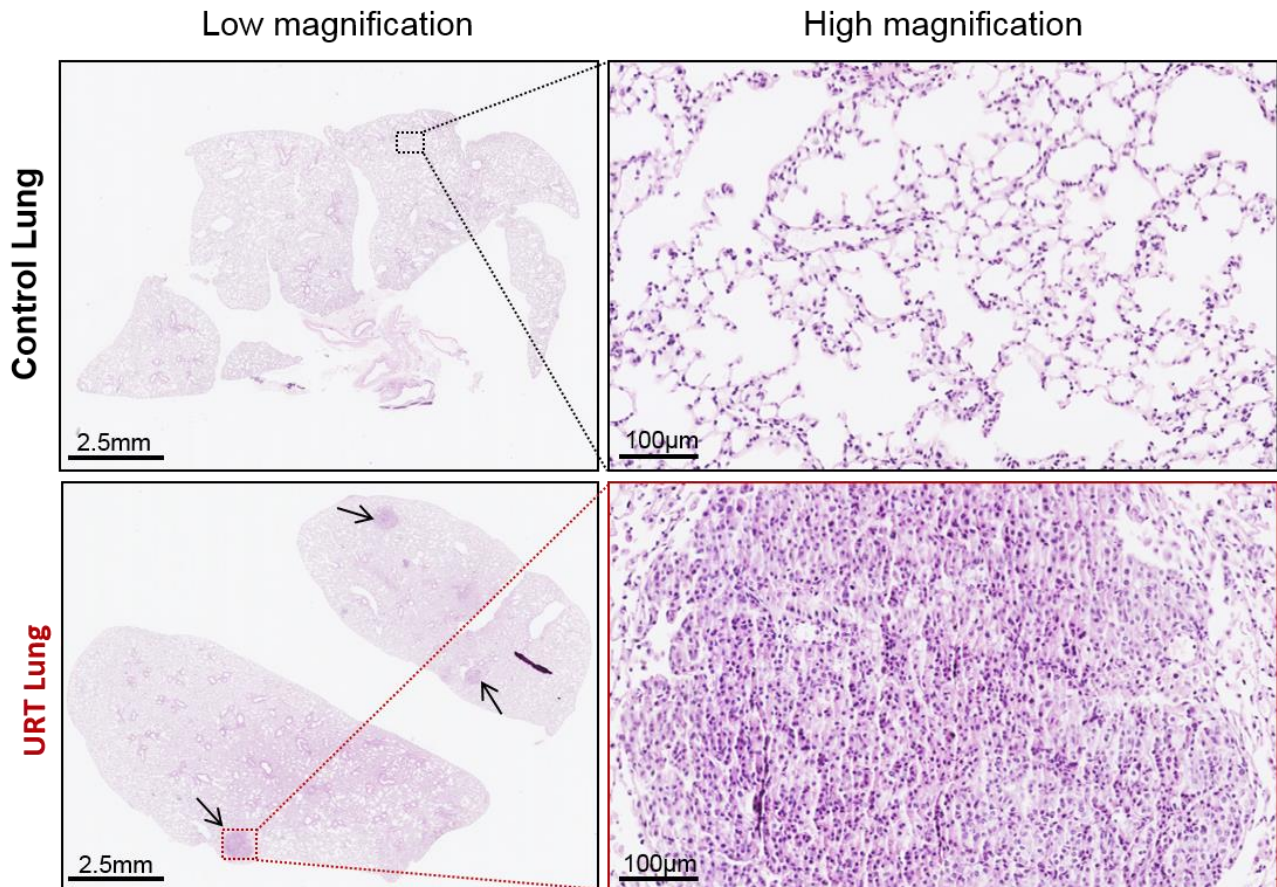
La stimulation par l'IL-6 et l'IL-21 et l'activation consécutive de pSTAT1/pSTAT3 conduisent à l'expression d'hPGDS et à la synthèse de PGD2 dans les cellules Tfh. La PGD2 produite par les cellules Tfh interagit avec son récepteur spécifique CRTH2 exprimé à la surface des cellules Th2, régule à la hausse leur sécrétion d'IL-4 et augmente ainsi leur propriétés pro-tumorales. Dans les modèles de cancer, la communication intercellulaire Tfh/Th2 induite par la PGD2 favorise la croissance tumorale. L'inhibition de l'axe PGD2/CRTH2 réduit la croissance tumorale en faisant basculer la balance des activités Tfh/Th2 en faveur d'une diminution de l'activité pro-tumorale de Th2 et d'une potentialisation des effets anti-tumoraux des Tfh.

Points à retenir

- Les cellules Tfh induisent l'accumulation de cellules Th2 dans les tumeurs de souris.
- Les cellules Tfh produisent de la PGD2.
- La PGD2 produite par les Tfh présente des effets biologiques sur les cellules Th2.
- Le complexe STAT1/STAT3 régule l'expression de l'*Hpgds* au sein des Tfh.
- Le ciblage de l'axe PGD2-CRTH2 inhibe la croissance tumorale.
- L'axe PGD2-CRTH2 présente également des répercussions dans les tumeurs humaines.

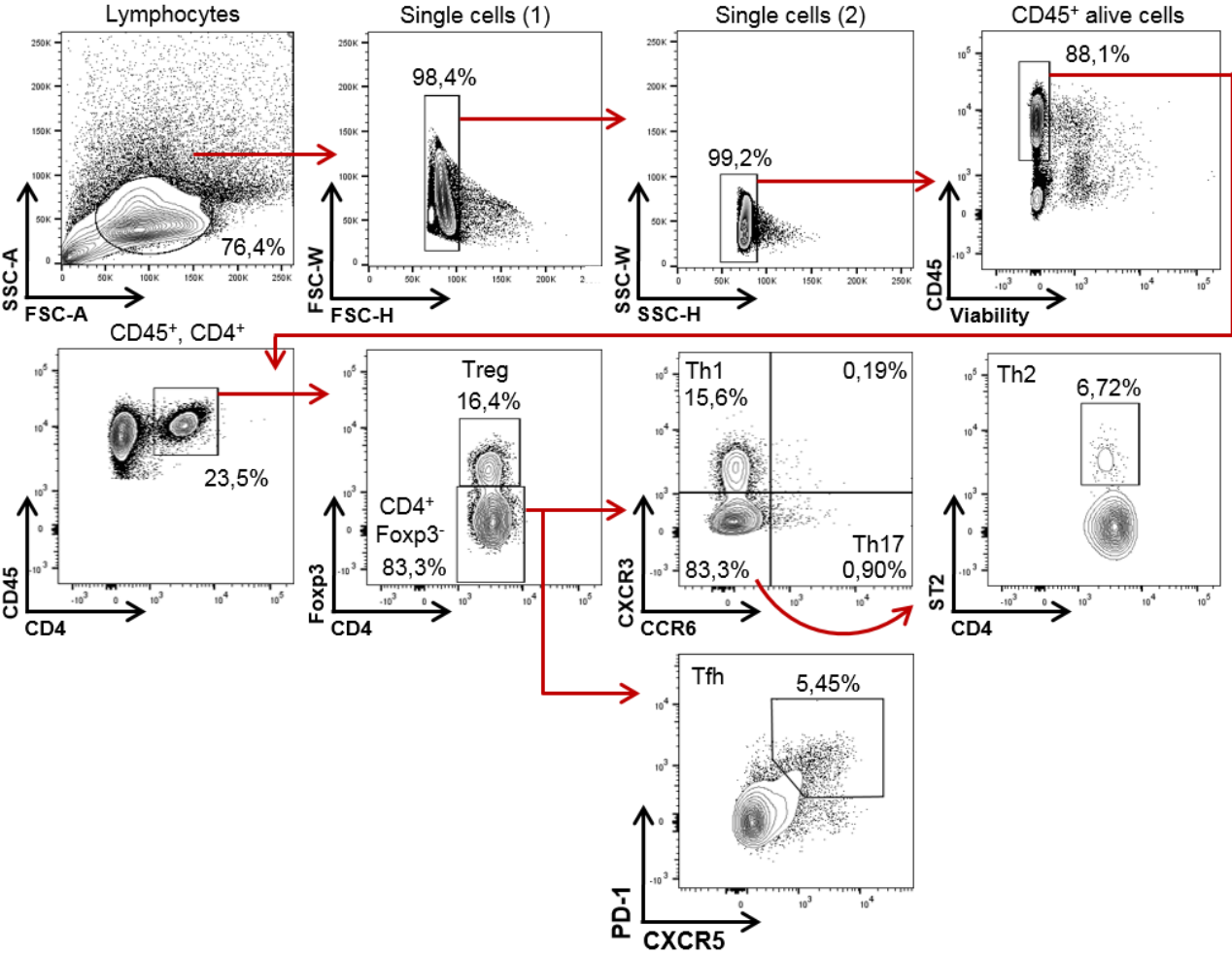
Données Supplémentaires

Supplementary Figure 1



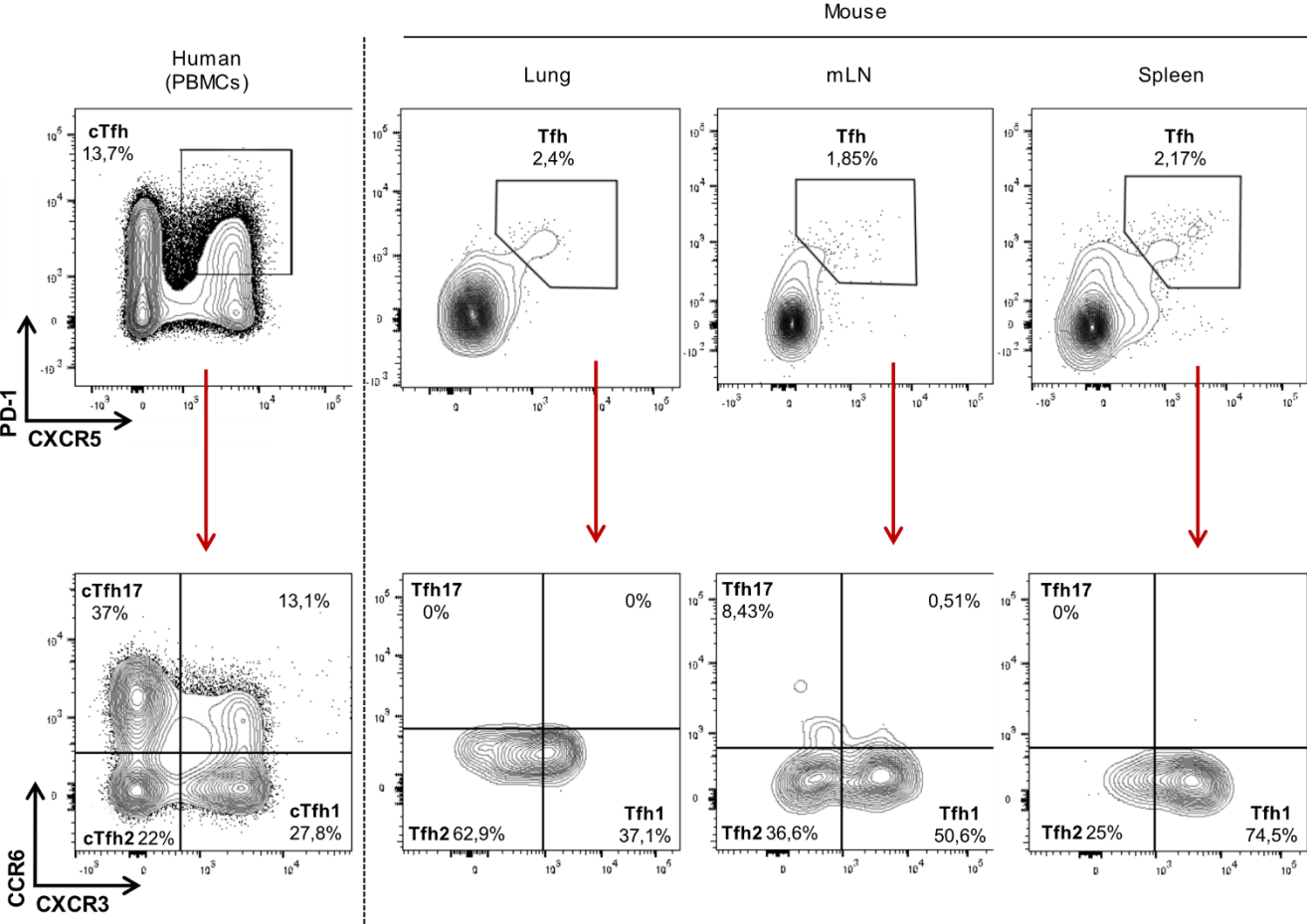
HES histological staining on lungs of control (WT) and urethane treated (URT) mice. Left panel, low magnification of the lungs where insets are focus on normal (Control) and abnormal (URT) area. Arrows highlight abnormal areas of urethane lungs. Scale bar indicates 2.5mm. Right panel, inset high magnification. Scale bar indicates 100µm.

Supplementary Figure 2



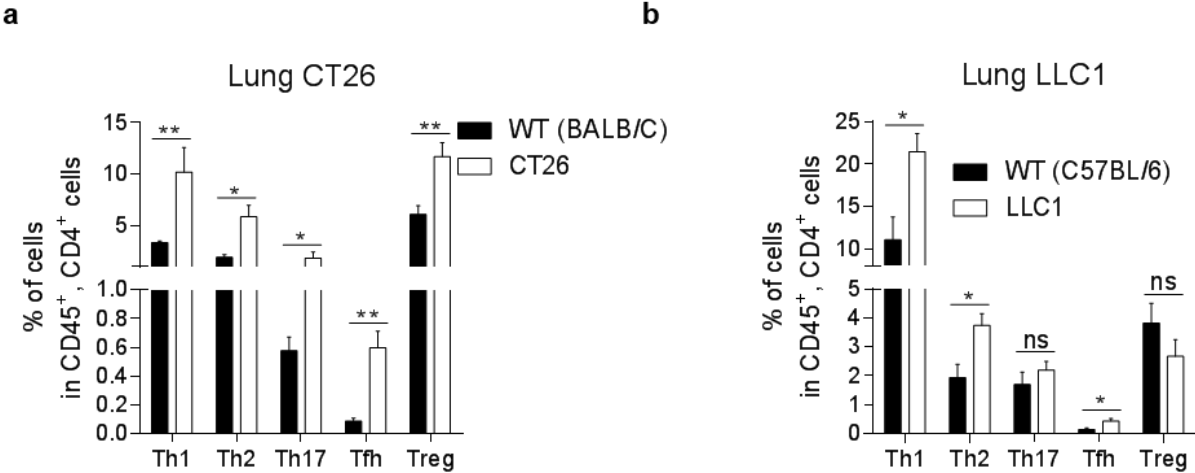
Flow cytometry gating strategy to identify mouse Th1, Th2, Th17, Treg and Tfh subpopulations through chemokine receptor and Fop3 transcription factor.

Supplementary Figure 3



Flow cytometry gating strategy to identify Tfh subpopulations in human PBMCs (circulating Tfh cells, cTfh) and mouse lung, mediastinal lymph node (mLN) and spleen.

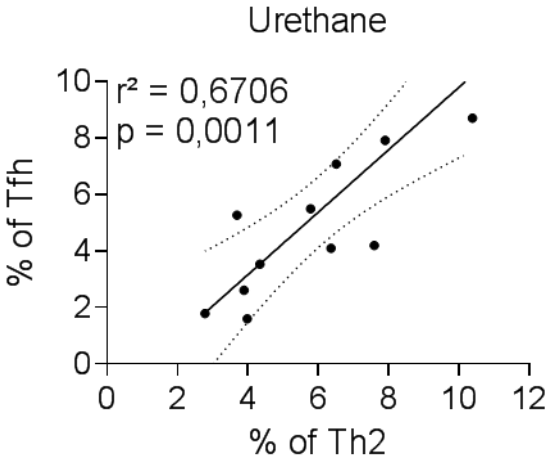
Supplementary Figure 4



a, b, Proportion of Th1, Th2, Th17, Tfh and Treg cell subpopulations from lung of syngeneic WT and CT26 (a) or LLC1 (b) injected mice.

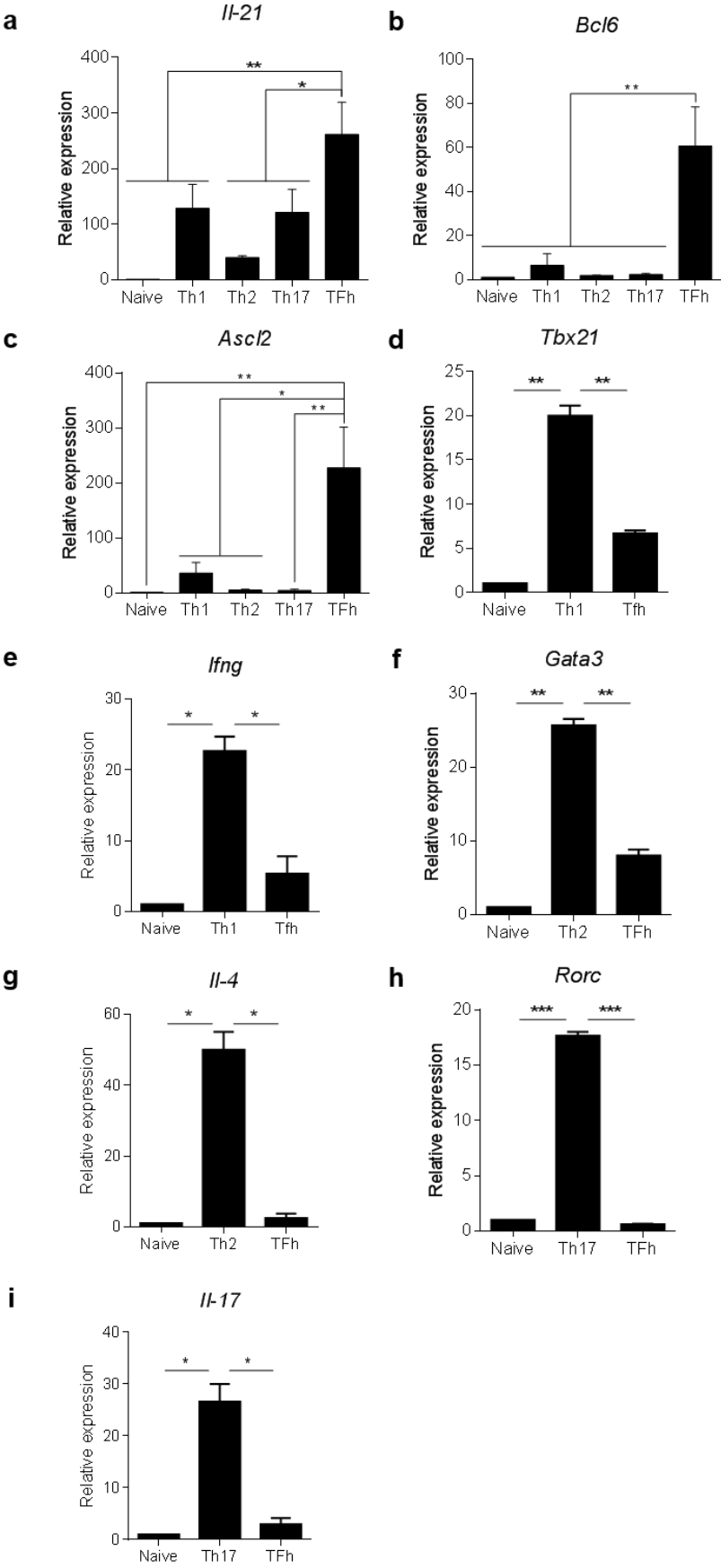
Indicated values deal with the mean ± SEM and are representative of three independent experiments at least; * p < 0,05 ; ** p < 0,01.

Supplementary Figure 5



Correlation between Th2 and Tfh cells proportion in lungs of urethane treated mice.

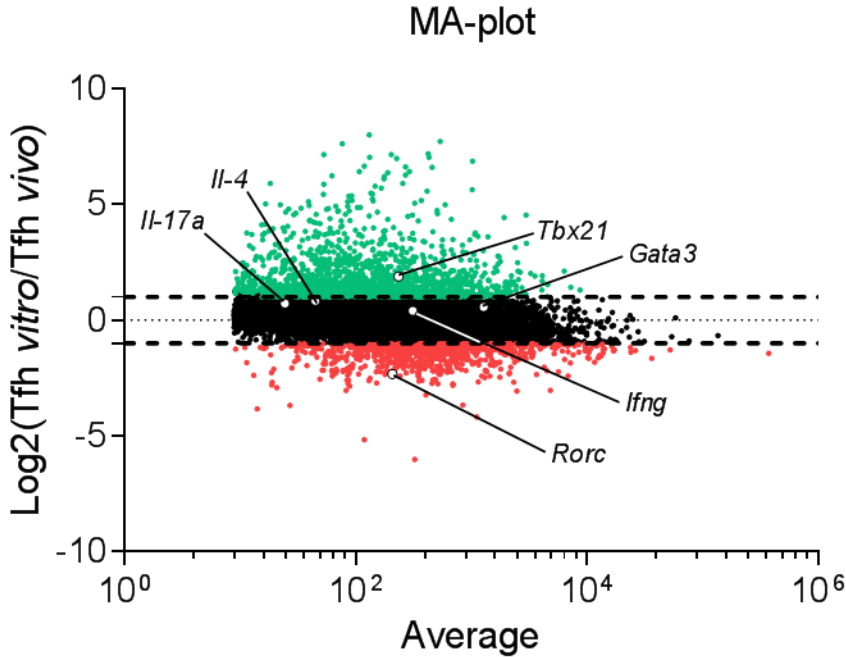
Supplementary Figure 6



a-i, Relative expression of *IL-21* (a), *Bcl6* (b), *Ascl2* (c), *Tbx21* (d), *Ifng* (e), *Gata3* (f), *Il-4* (h), *Rorc* (h), and *Il-17* (i) in sorted naïve T CD4⁺ (a to i), Th1 (a to e), Th2 (a, b, c, f, g), Th17 (a, b, c, h, i) and Tfh (a to i) cells from C57BL/6 mice draining lymph nodes or tumors (TILS).

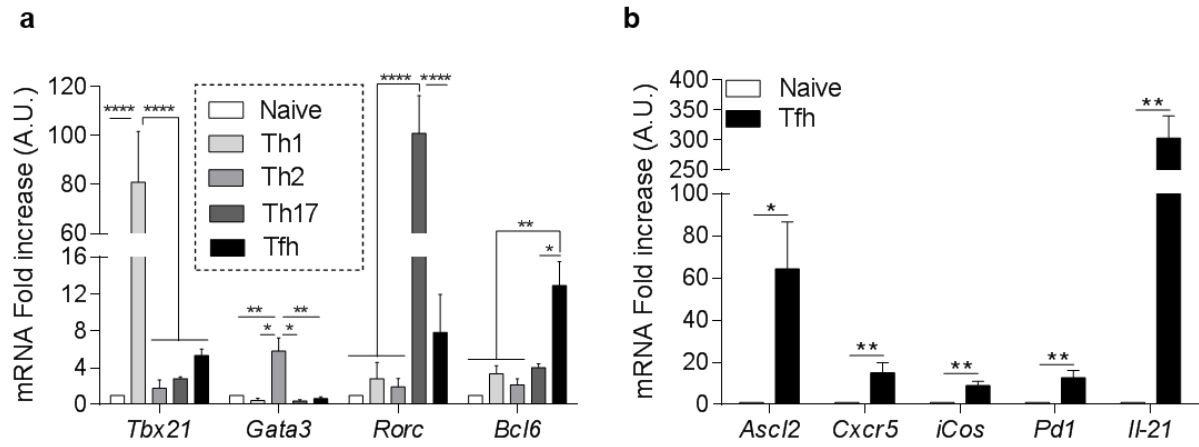
Indicated values deal with the mean \pm SEM and are representative of three independent experiments at least; * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001.

Supplementary Figure 7



MA-plot displaying RNA sequencing data of *in vitro* or *in vivo* (TILS) Tfh cells. Genes up or downregulated of at least 2 fold in *in vitro* Tfh compare to *in vivo* Tfh cells were respectively labeled in green and red. Genes with similar expression in both conditions were labeled in black.

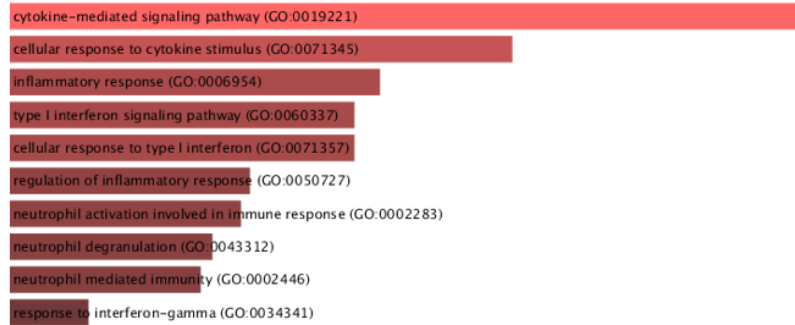
Supplementary Figure 8



a, *Tbx21*, *Gata3*, *Rorc* and *Bcl6* mRNA expression in naïve T CD4⁺ cells and *in vitro* polarized Th1, Th2, Th17 and Tfh cells. **b**, Tfh genetic profile: *Ascl2*, *Cxcr5*, *iCos*, *Pd1*, *Il-21* mRNA expression in naïve T CD4⁺ cells and *in vitro* Tfh cells.

Supplementary Figure 9

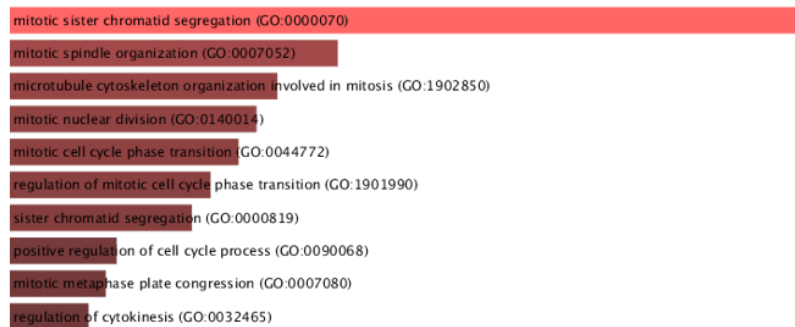
a



b

	Term	Overlap	P-value	Adjusted P-value	Genes
*	negative regulation of T-helper cell differentiation (GO:0045623)	3/9	0,000718	0,010090	ANXA1;TBX21;FOXP3
	positive regulation of T-helper 1 type immune response (GO:0002827)	3/13	0,002294	0,023000	ANXA1;SLC11A1;CCR2
NS	regulation of T-helper 2 cell cytokine production (GO:2000551)	2/9	0,014560	0,081400	RSAD2;TBX21
	regulation of T-helper 1 type immune response (GO:0002825)	2/10	0,017950	0,093930	SLC11A1;CCR2
	regulation of T-helper 2 cell differentiation (GO:0045628)	2/9	0,014560	0,081400	CD86;ANXA1
	positive regulation of T-helper cell differentiation (GO:0045624)	2/12	0,025600	0,118800	CD86;ANXA1
	regulation of T-helper 17 cell lineage commitment (GO:2000328)	1/7	0,139000	0,357500	TBX21
	positive regulation of T-helper 2 cell differentiation (GO:0045630)	1/7	0,139000	0,357500	CD86
	regulation of T-helper 1 cell differentiation (GO:0045625)	1/8	0,157217	0,366200	ANXA1
	T-helper 17 cell differentiation (GO:0072539)	1/9	0,175049	0,374200	RORA
	T-helper 1 type immune response (GO:0042088)	1/8	0,157217	0,366200	EBI3
	T-helper cell differentiation (GO:0042093)	1/12	0,226318	0,393400	RORA
	positive regulation of regulatory T cell differentiation (GO:0045591)	1/9	0,01456	0,08140	BCL6;FOXP3
	regulation of regulatory T cell differentiation (GO:0045589)	2/21	0,07196	0,24217	BCL6;FOXP3
	regulation of transcription regulatory region DNA binding (GO:2000677)	1/27	0,43873	0,55272	FAM129B
	positive regulation of transcription regulatory region DNA binding (GO:2000679)	1/20	0,34802	0,48555	FAM129B

c

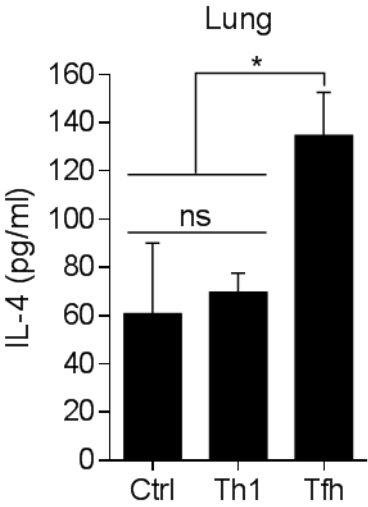


d

	Term	Overlap	P-value	Adjusted P-value	Genes
NS	positive regulation of T-helper 2 cell differentiation (GO:0045630)	1/7	0,08754	0,34061	TNFSF4
	regulation of T-helper 1 cell differentiation (GO:0045625)	1/8	0,09941	0,34061	TNFSF4
	negative regulation of T-helper cell differentiation (GO:0045623)	1/9	0,11112	0,34306	TNFSF4
	T-helper 17 cell differentiation (GO:0072539)	1/9	0,11112	0,34306	RORC
	regulation of T-helper 2 cell differentiation (GO:0045628)	1/9	0,11112	0,34306	TNFSF4
	T-helper cell differentiation (GO:0042093)	1/12	0,14535	0,36843	RORC
	positive regulation of T-helper cell differentiation (GO:0045624)	1/12	0,14535	0,36843	TNFSF4
	regulation of regulatory T cell differentiation (GO:0045589)	1/21	0,24037	0,42910	TNFSF4

Mouse up or down regulated biological process related to the *in vitro/in vivo* Tfh cells comparison obtained from Enrichr's web based tools. **a, c**, Top 10 of up and downregulated biological process respectively. **b, c**, Tables of T-helper cells biological process related to up and downregulated genes respectively.

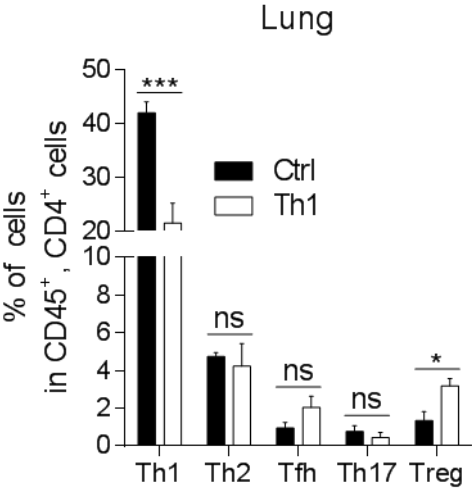
Supplementary Figure 10



IL-4 quantification (ELISA) in tumor bulk from lungs of control (Ctrl) and OT-II Th1 or OT-II Tfh transferred in B16-OVA tumor bearing mice.

Indicated values deal with the mean \pm SEM and are representative of three independent experiments at least; * p < 0,05.

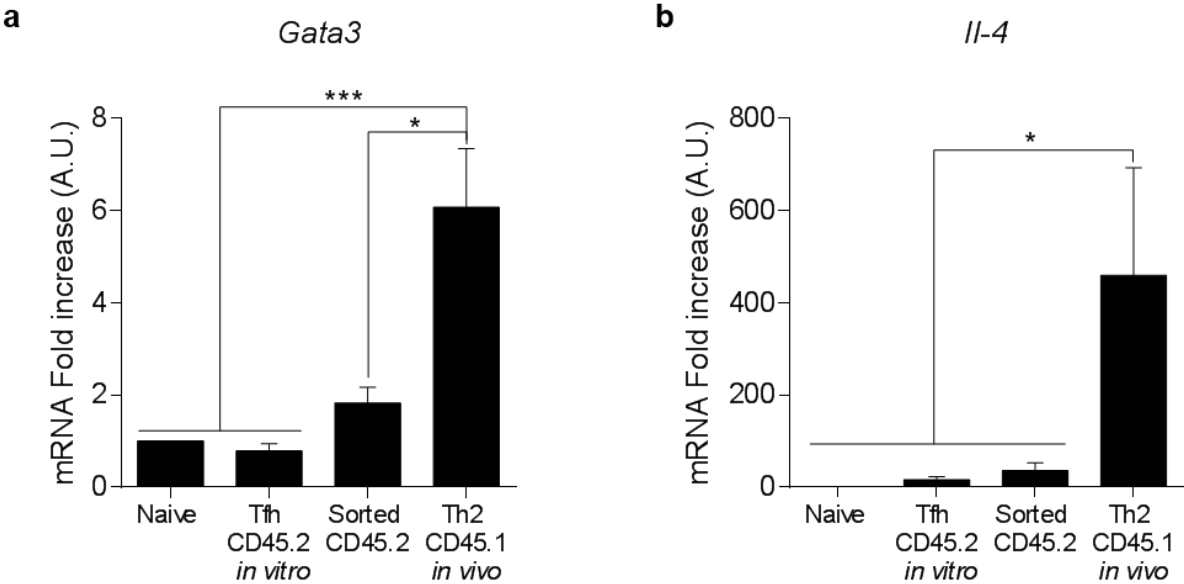
Supplementary Figure 11



Proportion of Th1, Th2, Tfh, Th17 and Treg cell subpopulations from lung of control (Ctrl) and OT-II Th1 or OT-II Th2 transferred B16-OVA tumor bearing mice.

Indicated values deal with the mean \pm SEM and are representative of three independent experiments at least; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

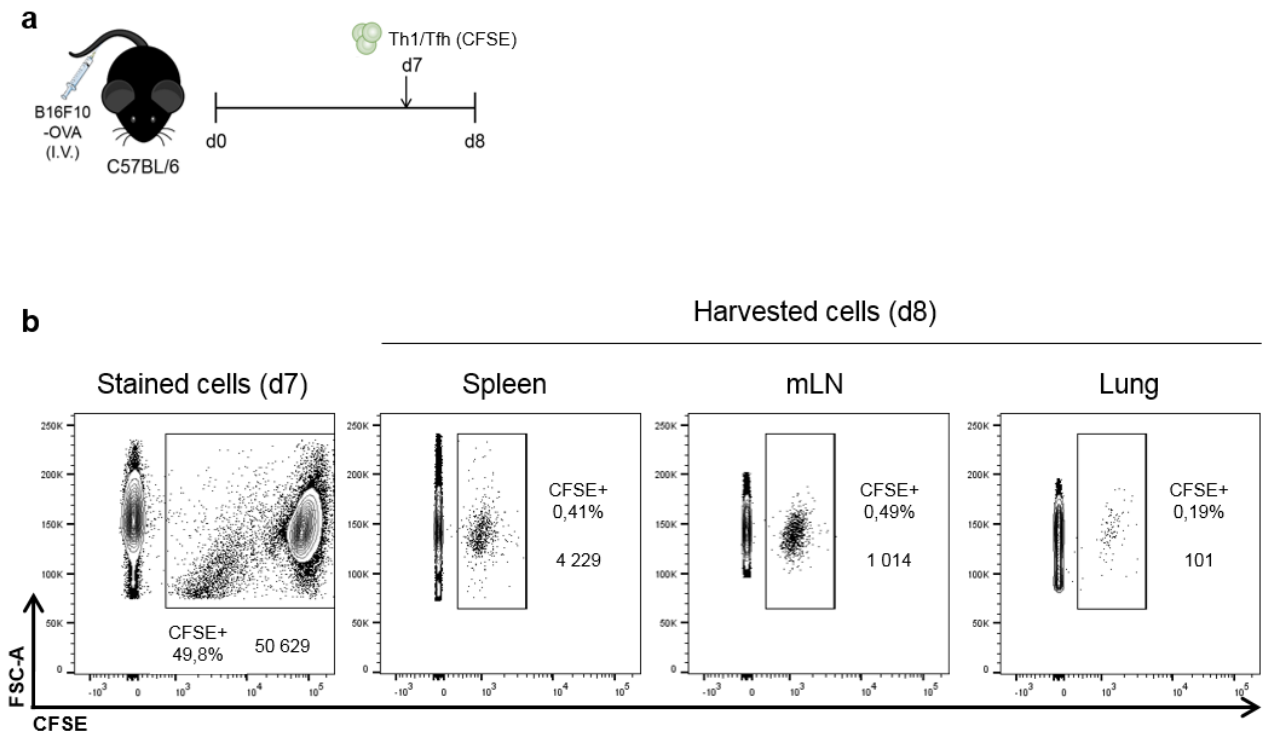
Supplementary Figure 12



a, b, *Gata3* and *Il-4* mRNA expression in naïve T CD4⁺ cells, *in vitro* CD45.2 Tfh (48h) and sorted CD45.2 cells and CD45.1 Th2 cells.

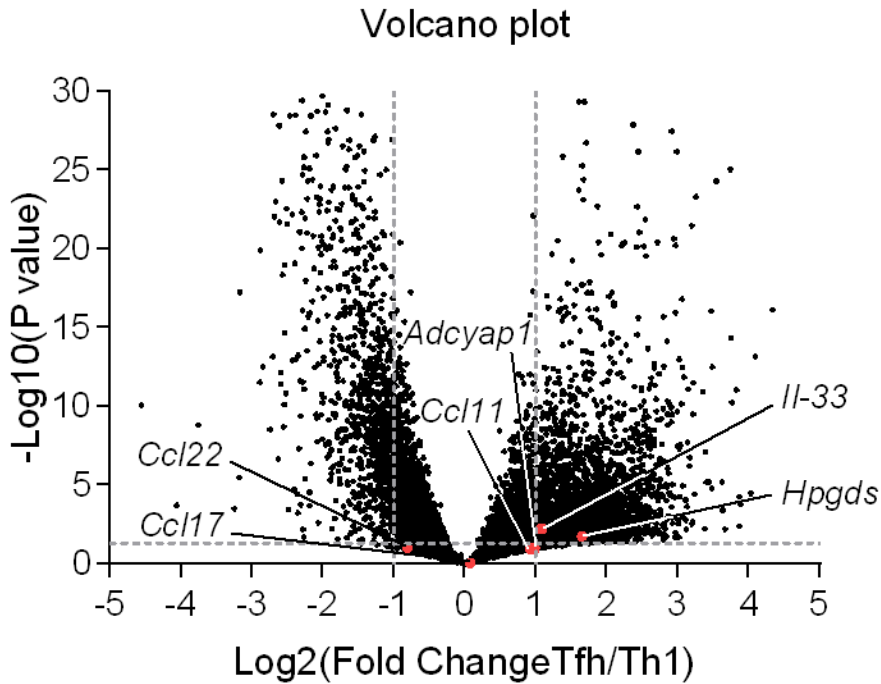
Indicated values deal with the mean ± SEM and are representative of three independent experiments; * p < 0,05 ; *** p < 0,001.

Supplementary Figure 13



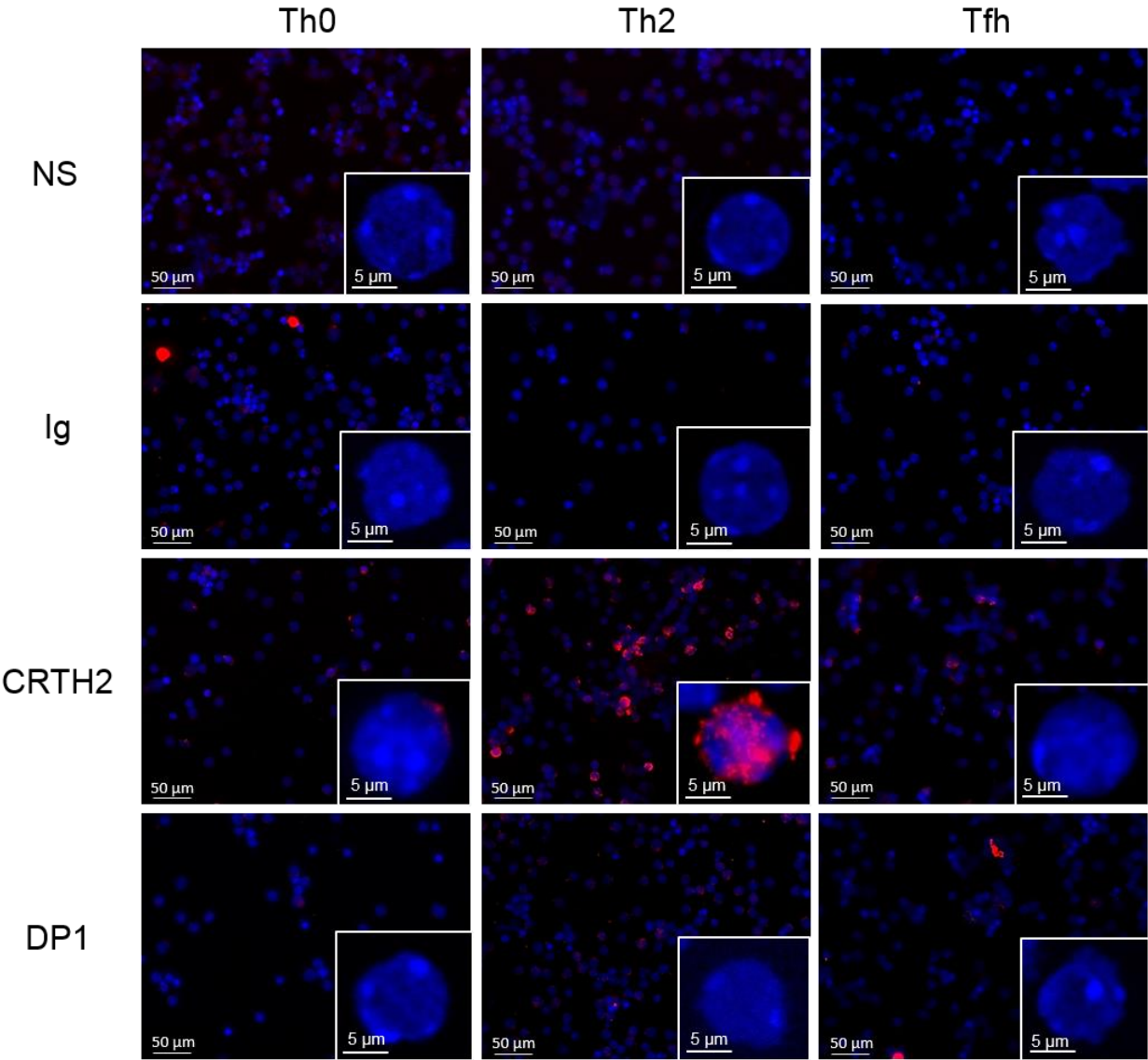
a, Experimental setup. OT-II Th1 and OT-II Tfh CFSE stained cells were injected seven days after the B16-OVA injection. One day after the T cells adoptive transfer the spleen, mediastinal lymph nodes (mLN) and lung were harvested **b**, CFSE flow cytometry measurement in spleen, mLN and lung of B16-OVA tumor bearing mice injected with OT-II Th1 or OT-II Tfh stained cells.

Supplementary Figure 14



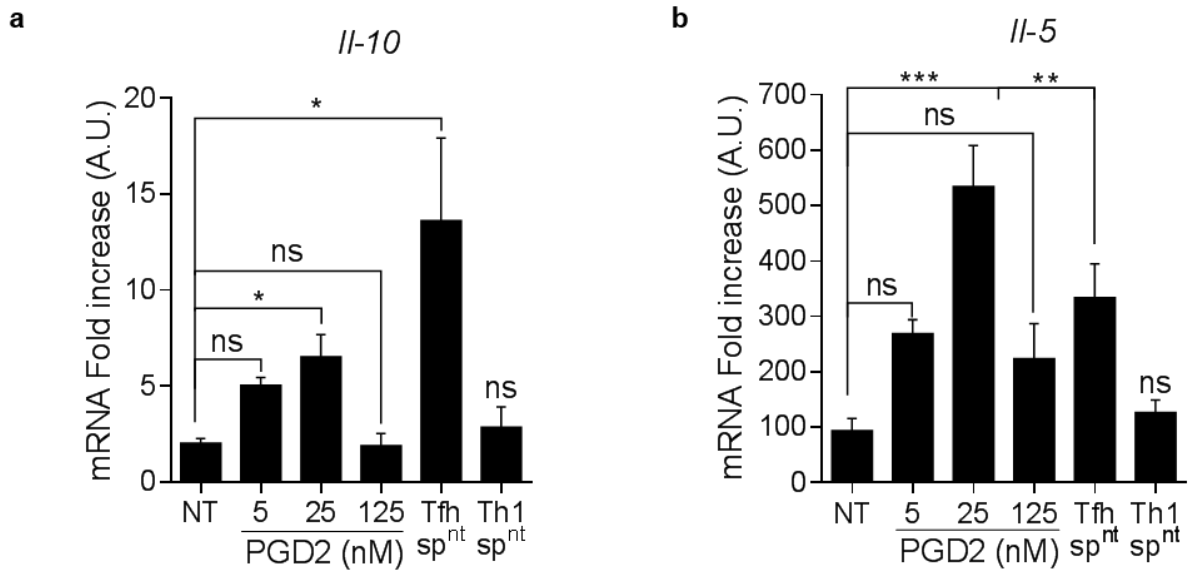
Representative results of a Volcano Plot. Tfh and Th1 cells were compared with a p-value cut off of 0.05 and a 1 fold change cut off. *Adcyap1*, *Ccl11*, *Ccl17*, *Ccl22*, *Il-33* and *Hpgds* are highlight in red.

Supplementary Figure 15



Immunofluorescence analysis of CRTH2 and DP1 membrane expression on *in vitro* polarized Th0, Th2 and Tfh cells. Non stain (NS) and Ig conditions were used as negative controls. Magnification of one representative cell for each condition. Left scale bar indicates 50µm and right scale bar indicates 5µm.

Supplementary Figure 16

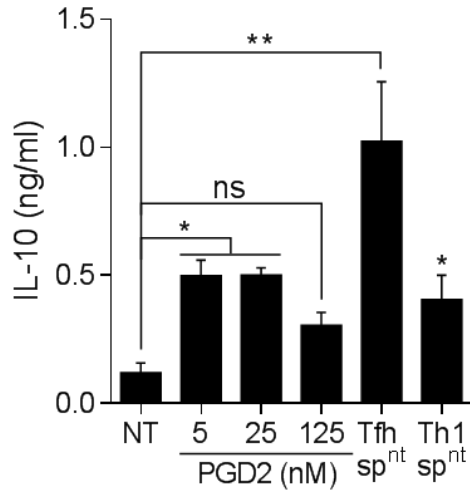


a, b, *IL-10* (a) and *IL-5* (b) expression in *in vitro* Th2 cells in addition, or not (NT), of recombinant PGD2 (5, 25 and 125 nM) or *in vitro* Tfh or Th1 supernatant (Tfh sp^{nt} or Th1 sp^{nt}).

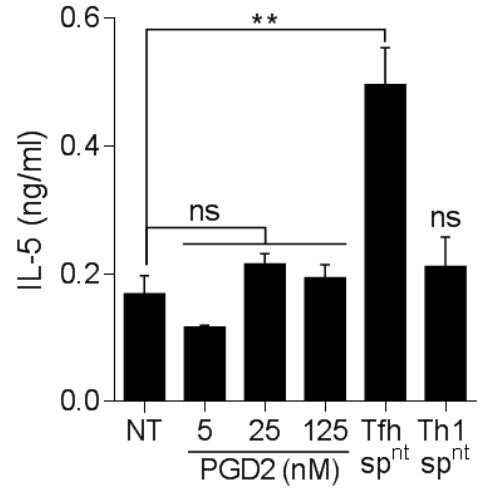
Indicated values deal with the mean \pm SEM and are representative of three independent experiments; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Supplementary Figure 17

a



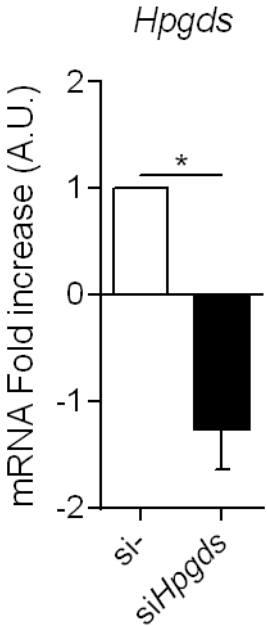
b



a, b, ELISA quantification of IL-10 (a) and IL-5 (b) produced by *in vitro* Th2 cells cells in addition, or not (NT), of recombinant PGD2 (5, 25 and 125 nM) or *in vitro* Tfh or Tfh supernatant (Tfh sp^{nt} or Th1 sp^{nt}).

Indicated values deal with the mean \pm SEM and are representative of three independent experiments; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

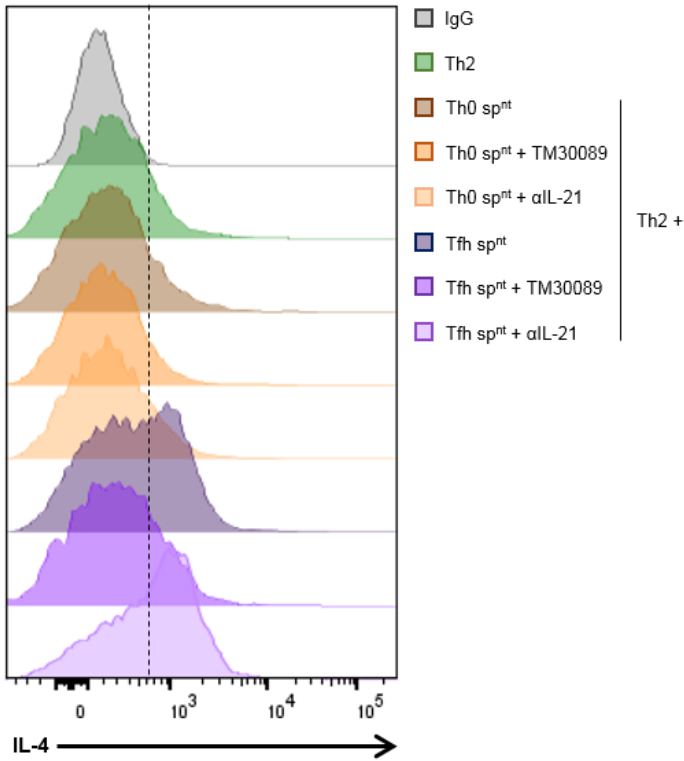
Supplementary Figure 18



Hpgds mRNA fold increase in *in vitro* polarized Tfh cells transfected by control (si-) and *Hpgds* (si*Hpgds*) siRNA.

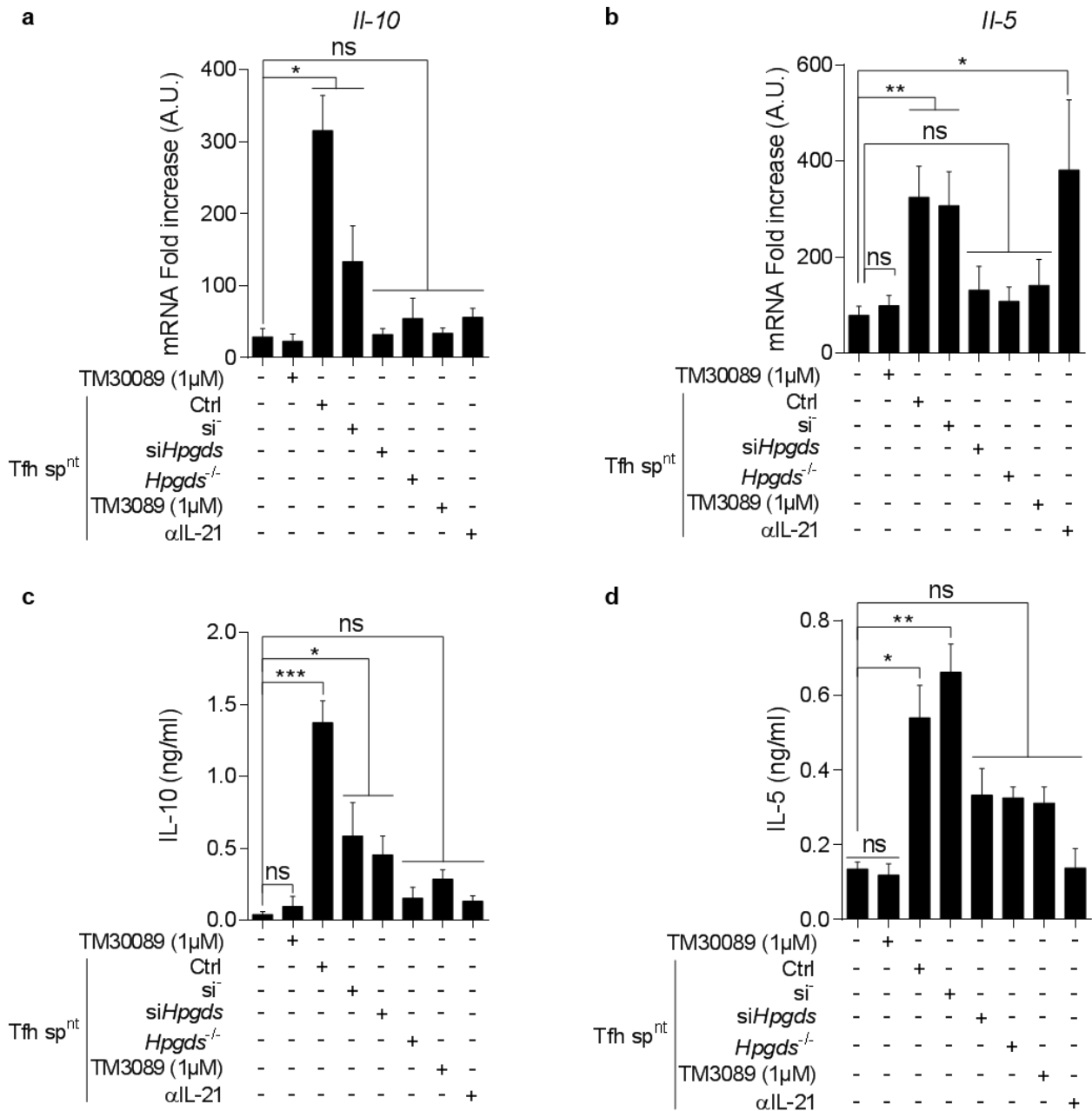
Indicated values deal with the mean \pm SEM and are representative of three independent experiments; * $p < 0,05$.

Supplementary Figure 19



Th2 cells were polarized *in vitro* in addition, or not (NT), of TM30089 (1 μM) or *in vitro* Th0 or Tfh supernatant supplemented or not with TM30089 or aIL-21 blocking antibody. Production of IL-4 was assessed by flow cytometry.

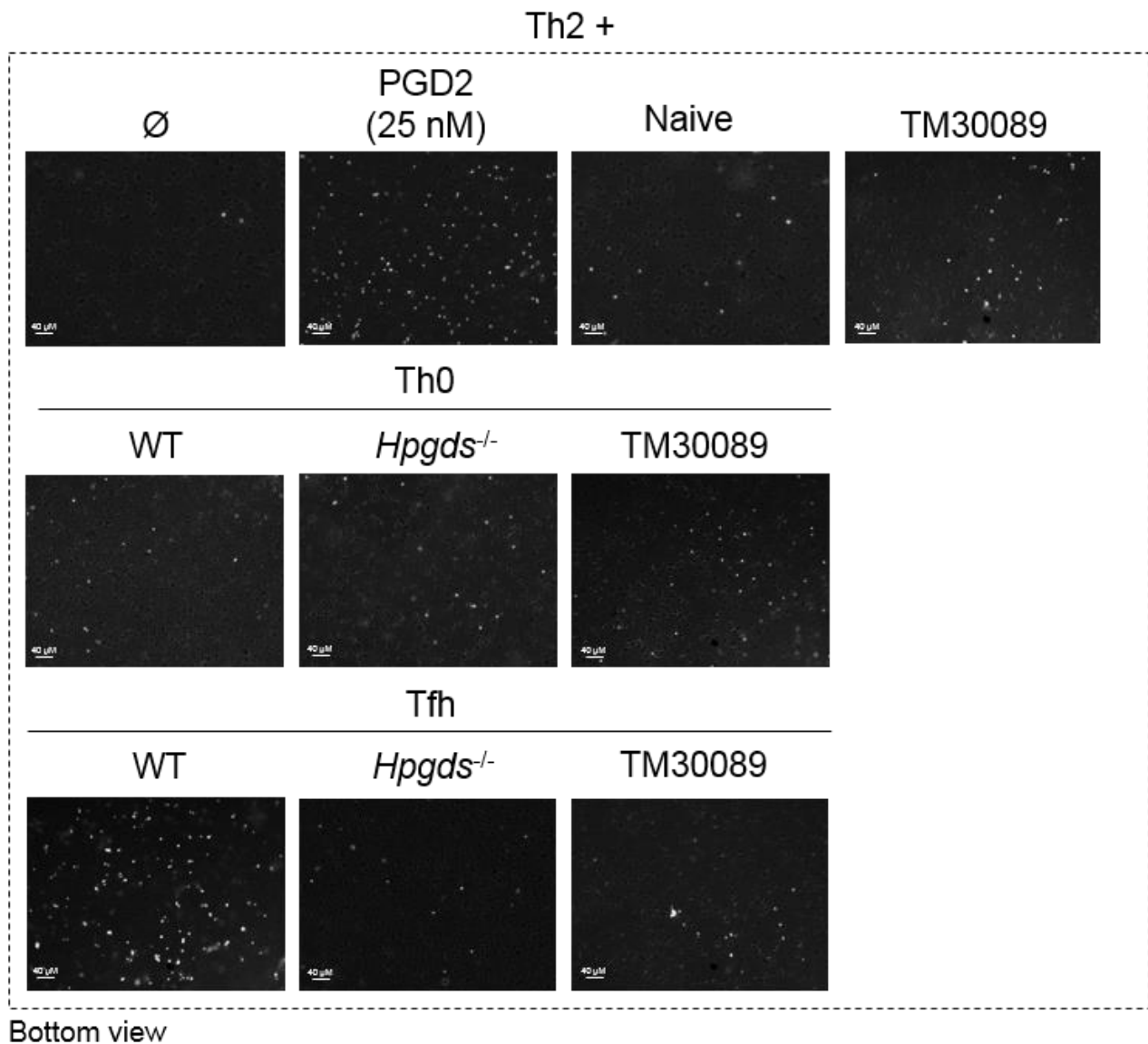
Supplementary Figure 20



Il-10 (**a**) and *Il-5* (**b**) mRNA expression and ELISA quantification of IL-10 (**c**) and IL-5 (**d**) secreted by *in vitro* Th2 cells in addition, or not (NT), of TM30089 (1 μ M) or *in vitro* Tfh supernatant. Tfh cells were polarized from WT (Ctrl), *Hpgds* deficient mice (*Hpgds*^{-/-}) or *Hpgds* deficient cells by siRNA strategy (*siHpgds*) supplemented with or without TM30089 (1 μ M) or α IL-21.

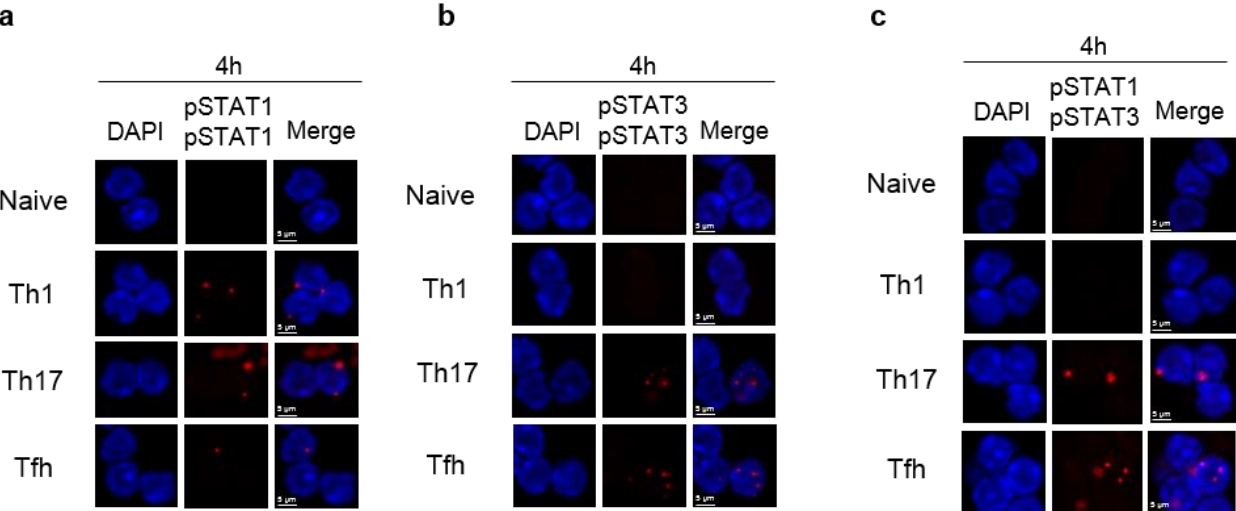
Indicated values deal with the mean \pm SEM and are representative of three independent experiments; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Supplementary Figure 21



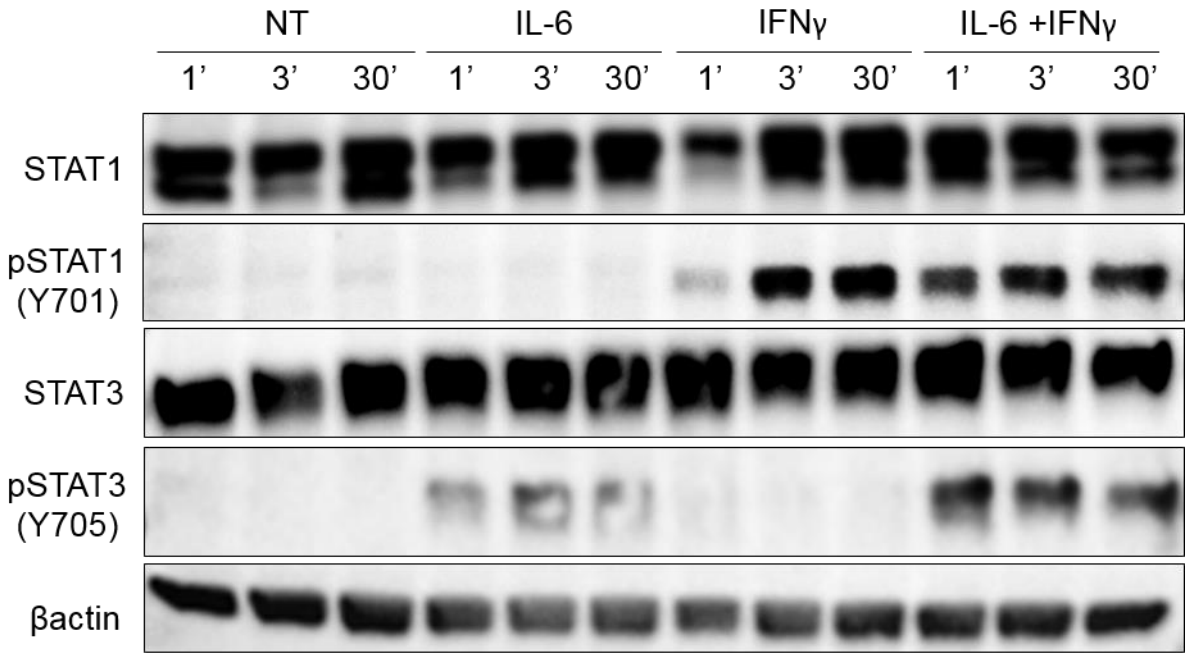
Th2 cells who have migrated through transwell. The bottom of underneath wells are loaded with naive CD4⁺ T cells, *in vitro* WT or *Hpgds* deficient Th0 or Tfh cells supplemented or not (\emptyset) with PGD2 (25 nM) or TM30089 (1 μ M). Gel matrix was released and Th2 migrated cells were stained with DAPI. Scale bar indicates 40 μ m.

Supplementary Figure 22



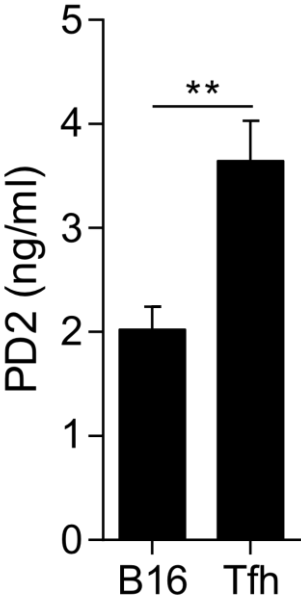
Highlight of pSTAT1/pSTAT1 (**a**), pSTAT3/pSTAT3 (**b**) and pSTAT1/pSTAT3 (**c**) proximity thanks to a proximity ligation assay (PLA; Duolink®) in T CD4⁺ naïve, Th1, Th17 and Tfh cells 4h after *in vitro* polarization. Scale bar indicates 5μm.

Supplementary Figure 23



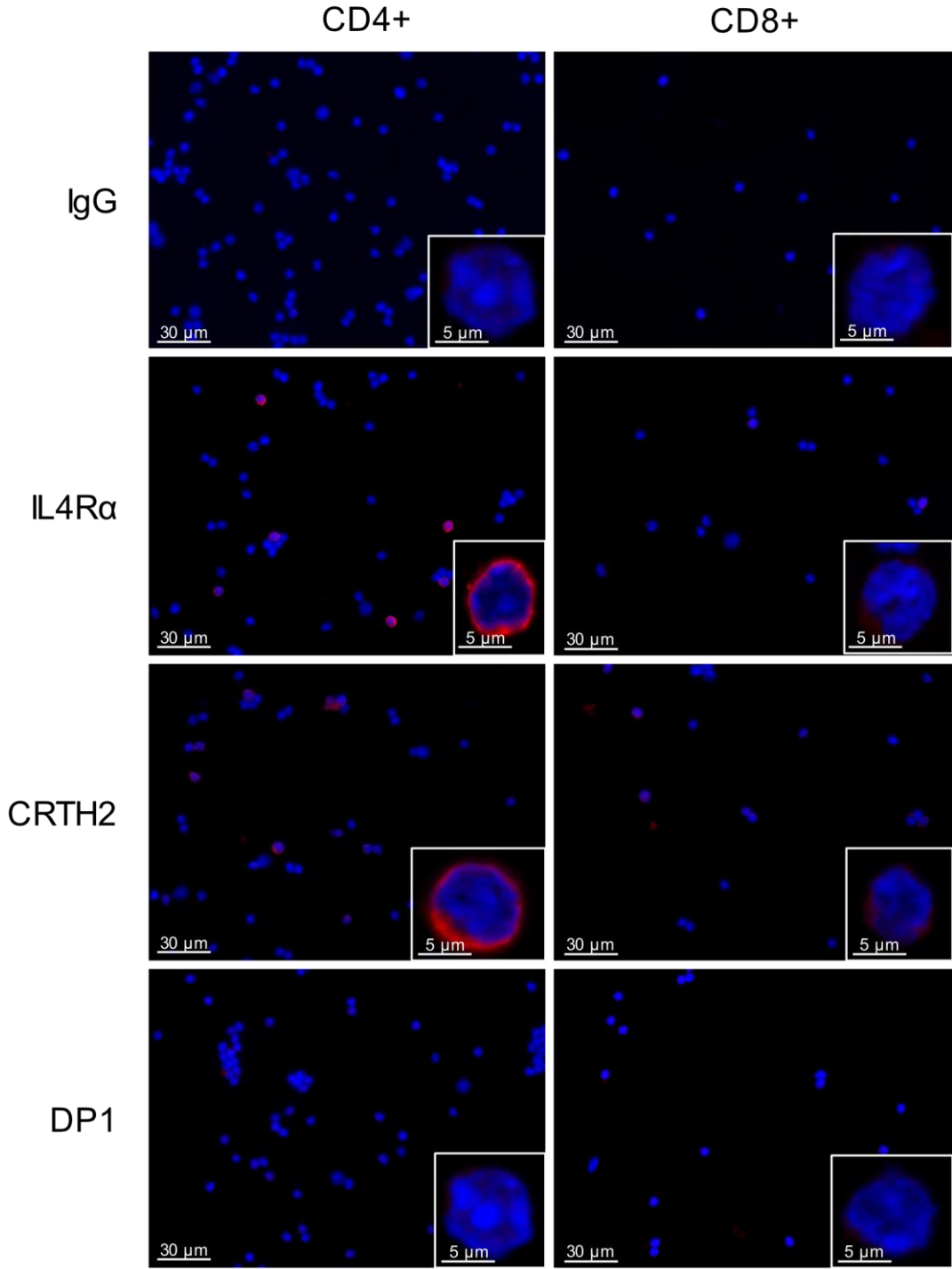
Western blotting analysis of STAT1, pSTAT1 (Y701), STAT3, pSTAT3 (Y705) and β actin protein expression in 4T1 cells treated or not (NT) with recombinant IL-6 (10ng/ml), IFN γ (10ng/ml) or both during 1, 3 or 30 minutes.

Supplementary Figure 24



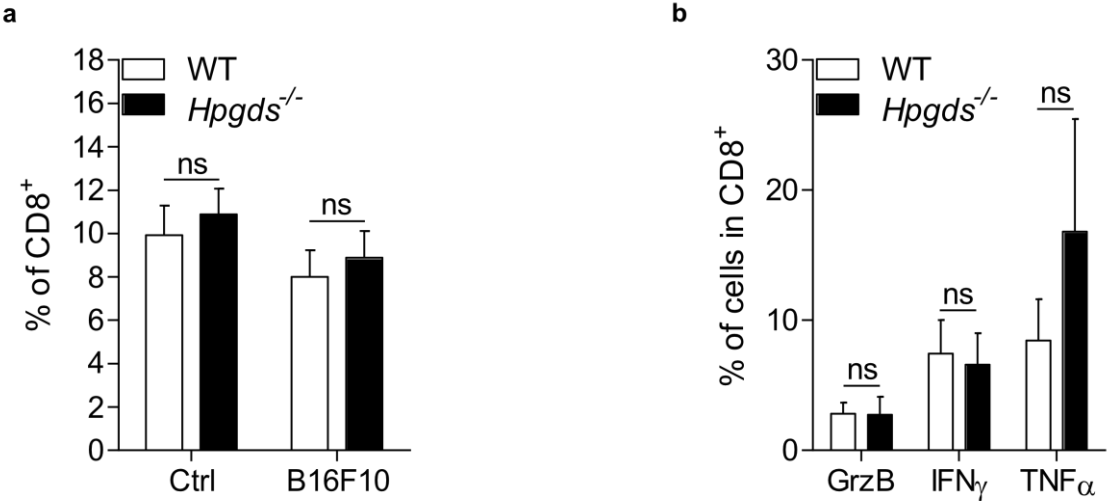
ELISA quantification of PGD2 (ng/ml) produced by B16F10 and Tfh cells *in vitro*.

Supplementary Figure 25



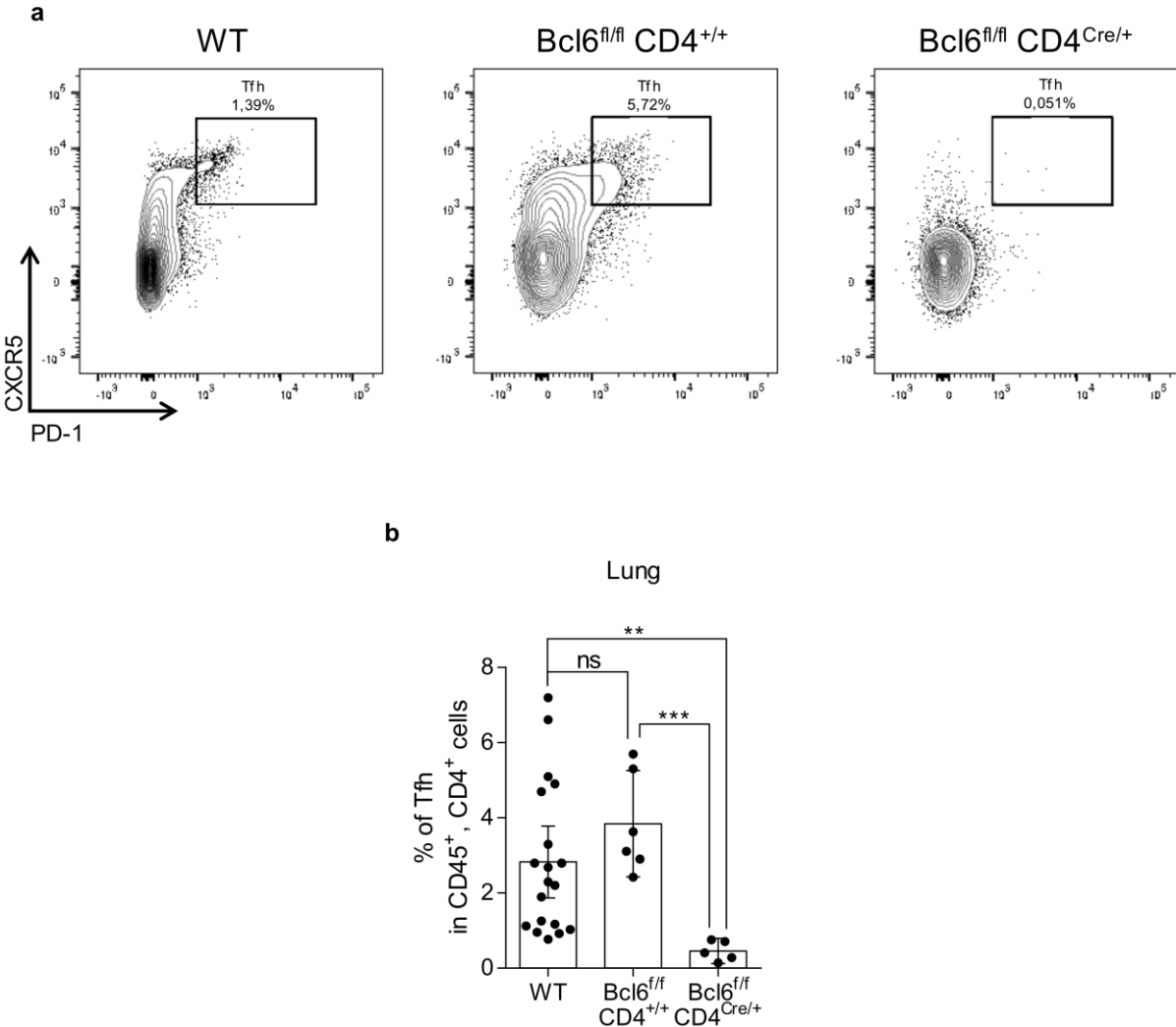
Immunofluorescence analysis of IL4Rα, CRTH2 and DP1 membrane expression total CD4+ T and CD8+ T cells. Ig condition was used as negative controls. Magnification of one representative cell for each condition. Left scale bar indicates 30μm and right scale bar indicates 5μm.

Supplementary Figure 26



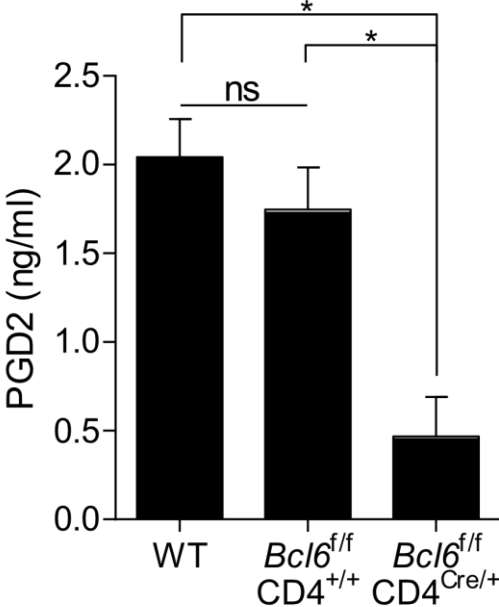
WT and *Hpgds* deficient mice were injected or not (Ctrl) with B16F10 cells. Proportion of lung CD8⁺ T cells from Ctrl and B16F10 bearing mice (**a**) or proportion of lung Granzyme B(GrzB)/IFN_γ/TNF_α CD8⁺ T cells from B16F10 bearing mice (**b**) were assessed by flow cytometry in WT and *Hpgds*^{-/-} mice.

Supplementary Figure 27



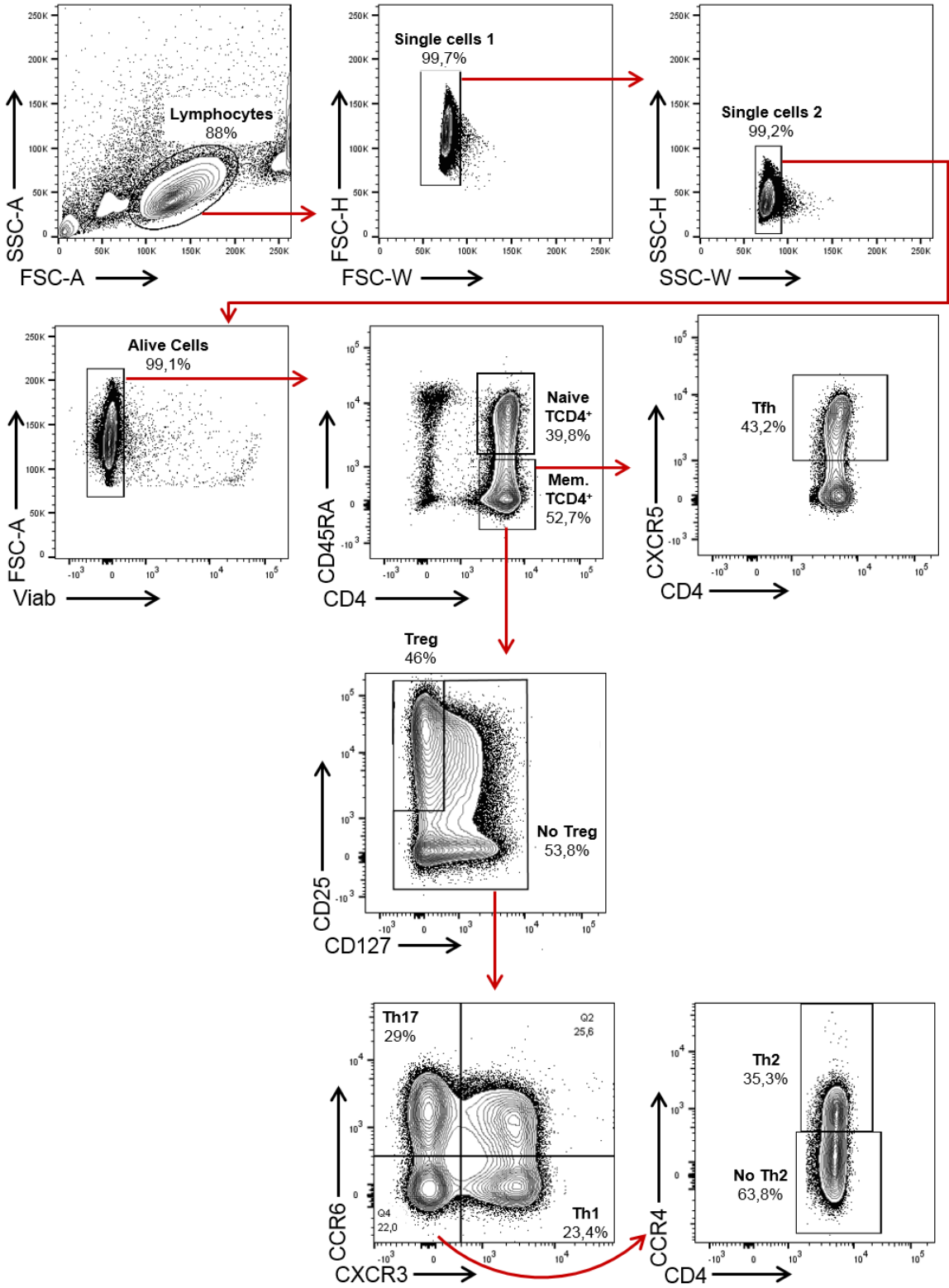
Gating strategy (a) and proportion of Tfh ($CD45^+ CD4^+ CXCR5^+ PD-1^+$) cells (b) in lung of WT, $Bcl6^{fl/fl} CD4^{+/+}$ and $Bcl6^{fl/fl} CD4^{Cre/+}$ mice.

Supplementary Figure 28



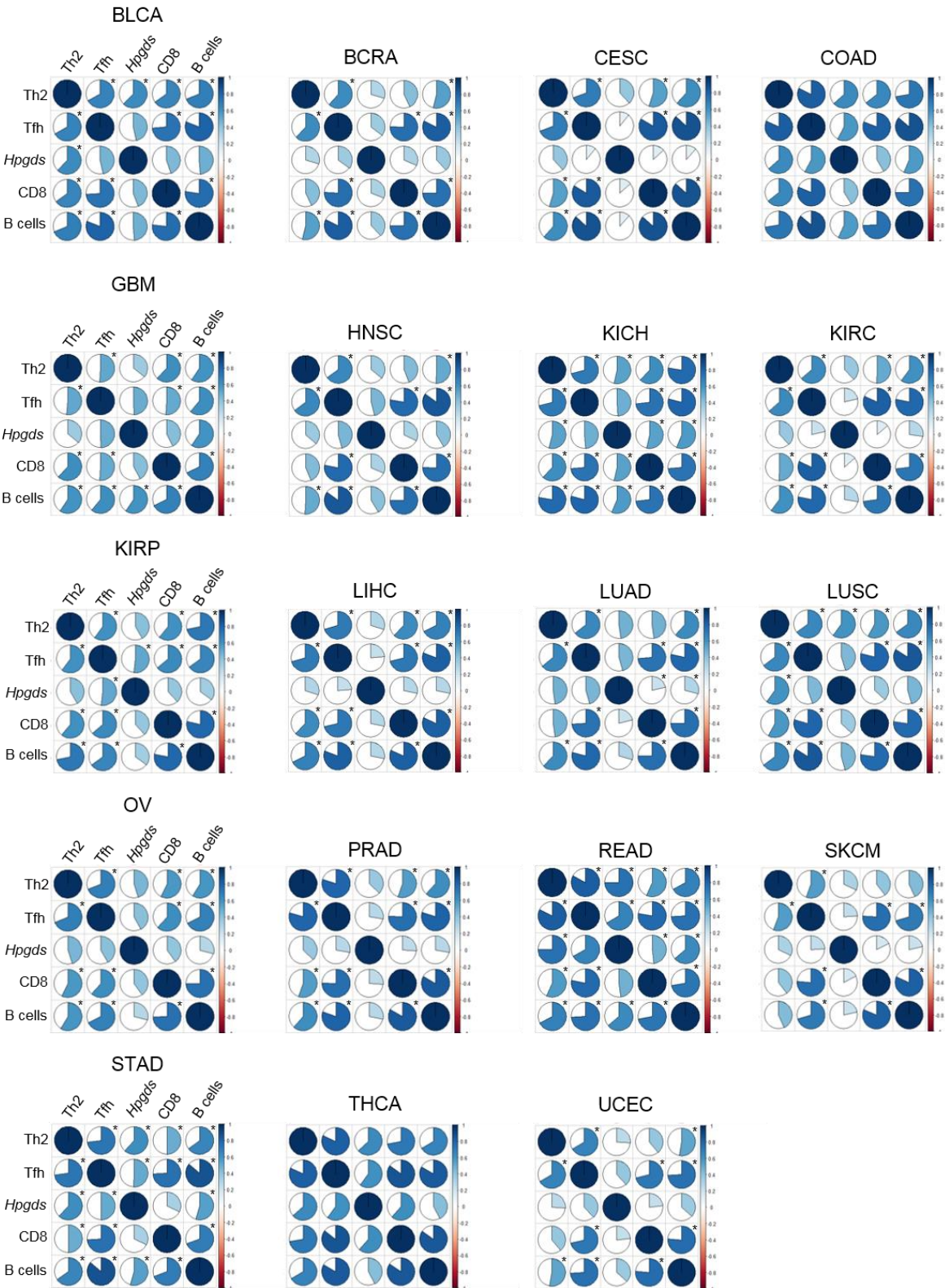
ELISA quantification of PGD2 (ng/ml) produced by total CD4+ T cells restimulated in vitro over night.

Supplementary Figure 29



Flow cytometry gating strategy to identify human Th1, Th2, Th17, Treg and Tfh subpopulations through chemokine receptor.

Supplementary Figure 30



Correlation matrix between Tfh, Th2, CD8, B cells metagenes and *Hpgds* gene in TCGA cohorts (Cf. Supplementary Table 4 for cancer origin abbreviations). Colors represents the r^2 coefficient. Star means significant correlation between related cells and/or *Hpgds*.

Supplementary Table 1

B16-F10		Th1	Th2	Th17	Treg	Tfh
Th1	r ²		0,0603	0,01531	0,02986	0,2416
	p value		0,2266	0,5738	0,4538	0,0531
Th2	r ²	0,0603		0,01942	0,03446	0,6987
	p value	0,2266		0,4971	0,4204	<0,0001
Th17	r ²	0,01531	0,01942		0,004357	0,000939
	p value	0,5738	0,4971		0,7762	0,9758
Treg	r ²	0,02986	0,03446	0,004357		0,06034
	p value	0,4538	0,4204	0,7762		0,2831
Tfh	r ²	0,2416	0,6987	0,000939	0,06034	
	p value	0,0531	<0,0001	0,9758	0,2831	

Correlation analysis between the proportion of different populations of T CD4⁺ cells (Th1, Th2, Th17, Treg and Tfh) from lung of B16-F10 tumor bearing mice. r² and p value related to linear regression analysis of each couple comparison are reported in the table.

Supplementary Table 2

Urethane		Th1	Th2	Th17	Treg	Tfh
Th1	r ²		0,2180	0,2000	0,2315	0,3679
	p value		0,1737	0,1950	0,1592	0,0630
Th2	r ²	0,2180		0,0662	0,3143	0,6706
	p value	0,1737		0,4730	0,0918	0,0011
Th17	r ²	0,2000	0,0662		0,08754	0,06836
	p value	0,1950	0,4730		0,3770	0,5870
Treg	r ²	0,2315	0,3143	0,08754		0,2661
	p value	0,1592	0,0918	0,3770		0,1043
Tfh	r ²	0,3679	0,6706	0,06836	0,2661	
	p value	0,0630	0,0011	0,5870	0,1043	

Correlation analysis between the proportion of different populations of T CD4⁺ cells (Th1, Th2, Th17, Treg and Tfh) from lung of urethane treated mice. r² and p value related to linear regression analysis of each couple comparison are reported in the table.

Supplementary Table 3

Covariate	P-value	Hazard ratio	95% CI
Tfh ⁺ /Th2 ⁻	0.0022	1	1.1-2.9
Intermediate		1.8	
Tfh ⁻ /Th2 ⁺		3.4	1.34-4.75
Male	0.19	1	0.85-2.15
Female		1.35	
Age (continous)	0.004	1,03	1.01- 1.06
T_stage	0.98		
1-2		1	0.68-2
3-4		1.17	
N_stage	0.017		
0		1	1,14-3.9
		1	
		2.12	
M_stage	0.78		
0		1	0.3-5.2
		1	
		1.22	
Residual_tumor	0.014		
0		1	1.12-2.9
		1	
		1.82	
Adjuvant radiation	0.01		
No		1	1.19-3.84
		1	
		2.12	

Cox multivariate proportional regression analysis for overall survival of pancreatic cancer patients (PAAD).

Supplementary Table 4

Study Abbreviation	Study Name
BLCA	Bladder Urothelial Carcinoma
BRCA	Breast invasive carcinoma
CESC	Cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma
COAD	Colon adenocarcinoma
GBM	Glioblastoma multiforme
HNSC	Head and Neck squamous cell carcinoma
KICH	Kidney Chromophobe
KIRC	Kidney renal clear cell carcinoma
KIRP	Kidney renal papillary cell carcinoma
LIHC	Liver hepatocellular carcinoma
LUAD	Lung adenocarcinoma
LUSC	Lung squamous cell carcinoma
OV	Ovarian serous cystadenocarcinoma
PAAD	Pancreatic adenocarcinoma
PRAD	Prostate adenocarcinoma
READ	Rectum adenocarcinoma
SKCM	Skin Cutaneous Melanoma
STAD	Stomach adenocarcinoma
THCA	Thyroid carcinoma
UCEC	Uterine Corpus Endometrial Carcinoma

Summary of all the cancer origins and their respective abbreviations from TCGA data base.

Discussion et Perspectives

Discussion

Au cours de cette étude, nous avons démontré que les cellules Tfh produisent de la PGD2. Ce médiateur attire et active les cellules Th2 entraînant une réduction de l'effet anti-tumoral des Tfh. Nous avons trouvé que l'expression d'*Hpgds* est régulée par un complexe pSTAT1/pSTAT3, détecté dans les cellules Tfh après l'activation des voies IL-6 et IL-21, nécessaire à la polarisation de ce phénotype T CD4⁺. Le ciblage de l'axe PGD2/CRTH2 dans des modèles tumoraux murins a permis de réduire la croissance tumorale en raison d'une diminution de la production d'IL-4 par les cellules Th2. Chez l'Homme, des propriétés similaires des cellules Tfh ont été observées et l'analyse des données RNASeq tirées de la base de données du TCGA confirment le caractère délétère de la communication intercellulaire entre les cellules Tfh et Th2 dans le cancer du pancréas.

Des études ont précédemment démontré le potentiel rôle anti-tumoral des cellules Tfh dans certains cancers, tels que le cancer du sein (Gu-Trantien *et al.*, 2013; Gu-Trantien *et al.*, 2017), le cancer colorectal (Bindea *et al.*, 2013), le carcinome hépatocellulaire (Jia *et al.*, 2015) et le cancer du poumon non à petites cellules (Ma *et al.*, 2016). Dans ces cancers, l'accumulation de cellules Tfh est plutôt associée à un bon pronostic. Dans notre étude, nous avons observé une accumulation de Tfh non seulement dans les tumeurs implantées mais également dans les tumeurs induites chimiquement chez la souris, ce qui suggère que le recrutement des Tfh dans la tumeur est un phénomène général observé chez l'Homme et dans différents modèles de tumeur spontanée ou transplantable chez la souris. Dans le contexte du transfert adoptif de cellules Tfh spécifiques de l'antigène, nous avons également observé une activité anti-tumorale, équivalente à l'activité anti-tumorale Th1. La principale cytokine produite par les Tfh est l'IL-21 (Chtanova *et al.*, 2004). Les effets de l'IL-21 sont pléiotropiques en raison de la large distribution cellulaire du récepteur de l'IL-21. Cette cytokine joue un rôle essentiel dans la différenciation des cellules B humaines dépendantes des Tfh et dans la génération de réponses immunitaires humorales. Bien que le rôle des cellules B dans l'immunité contre le cancer ne soit pas clair, ils pourraient potentiellement affecter les réponses immunitaires anti-tumorales par le biais de leurs capacités de production d'anticorps, de leurs fonctions de CPA ou de leur production spécifique de cytokines (Bao et Cao, 2014). Une déficience fonctionnelle des cellules Tfh peut entraver la

réponse immunitaire anti-tumorale dépendante des cellules B chez les patients cancéreux (Jia *et al.*, 2015). Une étude récente suggère également que les Tfh pourraient promouvoir l'activation des lymphocytes T CD8⁺ dans le contexte du cancer colorectal humain de manière dépendante de l'IL-21 (Shi *et al.*, 2018). En revanche, d'autres données soulignent la production d'IL-4 par les Tfh dans le ganglion drainant de certains modèles murins de tumeurs transplantables. L'IL-4 provenant de ces cellules Tfh induit la différenciation des cellules myéloïdes en macrophages M2 et favorise la croissance tumorale (Shirota *et al.*, 2017). De même, dans les mélanomes murins et humains, des cellules de type Tfh ont été observées dans les tumeurs, supprimant l'activation des cellules T CD8⁺. Le mécanisme assurant leur effet immunosuppresseur reste à déterminer. De manière surprenante, nous avons découvert ici que les cellules Tfh pourraient également recruter des cellules Th2, connues pour présenter des fonctions pro-tumorales dans de nombreux cancers. Ce mécanisme peut probablement expliquer le rôle ambivalent des cellules Tfh.

Nous avons montré ici que les Tfh murins et humains peuvent également libérer de la PGD2. En effet, pour les deux espèces les Tfh expriment l'hPGDS *in vitro* et *in vivo*. hPGDS est l'enzyme responsable de la production de PGD2 à partir de PGH2. La polarisation des cellules Tfh *in vivo* nécessite des interactions intercellulaires entre les cellules T CD4⁺, les cellules dendritiques et les cellules B en présence d'IL-6 et d'IL-21 (Krishnaswamy *et al.*, 2018). *In vitro*, en utilisant de l'IL-6 et de l'IL-21 recombinant sous stimulation par des anticorps ciblant les co-récepteurs CD3 et CD28, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs peuvent être polarisés en cellules de type Tfh (Tfh-like) (Read *et al.*, 2019). Nous avons confirmé, à l'aide d'une analyse transcriptomique, que de telles cellules (Tfh *in vitro*) sont très proches du point de vue transcriptionnel des cellules Tfh intratumorales. Nous avons montré dans des modèles murins que les voies de signalisation induites par IL-6 et IL-21 permettent l'expression d'*Hpgds*. En effet, en accord avec la littérature, nous avons observé une activation très précoce de STAT1 et STAT3 dans les cellules Tfh (Choi *et al.*, 2013). Ces facteurs de transcription interagissent afin de former un complexe protéique et se lient au promoteur de l'*Hpgds*, induisant son activation. De plus, les hétérodimères pSTAT1/pSTAT3 ont déjà été décrits après stimulation par l'IL-6 (Zhong *et al.*, 1994). Leur rôle reste flou, mais l'hypothèse principale est que les hétérodimères STATs seraient en concurrence avec les homodimères STATs, ce qui réduirait l'efficacité ou la force des signaux de ces derniers (Delgoffe et Vignali, 2013; Ho et Ivashkiv, 2006). La PGD2 est un médiateur

inflammatoire majeur (Flower *et al.*, 1976) principalement produit par les mastocytes (Lewis *et al.*, 1982). Elle est décrite pour permettre non seulement le recrutement des éosinophiles (Emery *et al.*, 1989; Marsden *et al.*, 1984; Raible *et al.*, 1992), mais également celui des Th2 (Nagata *et al.*, 1999). Il existe deux récepteurs de la PGD₂, CRTH2 et DP1, dotés d'activités antagonistes (Pettipher *et al.*, 2007). Le récepteur CRTH2 a été caractérisé comme le marqueur de surface le plus spécifique des cellules Th2 chez l'Homme (Cosmi *et al.*, 2000). hPGDS a déjà été décrit comme étant exprimé dans les cellules Th2 et les mastocytes. Dans notre étude, nous fournissons la preuve que les cellules Tfh murines et humaines expriment l'enzyme hPGDS mais, de manière surprenante, nous n'avons pas observé d'expression significative d'*Hpgds* dans les cellules Th2. Nous avons démontré que l'hPGDS des cellules Tfh est fonctionnelle en ce sens où les cellules produisent de la PGD₂. La PGD₂ produite par les Tfh présente des effets biologiques sur les Th2. L'utilisation de surnageant de cultures de Tfh a induit l'augmentation conjointe de la migration des Th2 et de leur production de cytokines effectrices. Cet effet est limité lorsqu'*Hpgds* est inactivé ou que CRTH2 est bloqué par un inhibiteur pharmacologique spécifique. Aucun impact sur les autres sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ n'a été observé, car CRTH2 n'a été détecté que dans les cellules Th2, confirmant la spécificité de ce marqueur. La PGD₂ est notamment impliquée dans l'asthme allergique ou la dermatite atopique mais très peu d'études ont examiné le rôle de PGD₂ dans le cancer. Toutefois, il est décrit que certaines cellules cancéreuses, telles que dans le carcinome du poumon de Lewis chez la souris (Murata *et al.*, 2008) ou certains cancers gastriques chez l'Homme, ont une expression de CRTH2 (Fukuoka *et al.*, 2014). La PGD₂ a été décrite comme présentant des propriétés anti-angiogéniques et anti-tumorales chez des souris génétiquement modifiées (Kobayashi *et al.*, 2018). Toutefois, il est connu que les cellules lymphoïdes innées de type 2 (Innate lymphoid cells 2 ou ILC2s) expriment également CRTH2. Une étude récente souligne le rôle immunosuppresseur de la PGD₂, médiateur de l'axe ILC2/MDSC dans la leucémie aiguë promyélocytaire (acute promyelocytic leukaemia ou APL). Dans ce contexte, la PGD₂ produite par les cellules tumorales supporte l'activation, l'expansion des ILC2s ainsi que leur engagement dans l'activation des MDSCs (Trabanelli *et al.*, 2017).

Nous avons observé dans cette étude que le ciblage de l'axe PGD₂/CRTH2 chez des souris déficientes pour *Hpgds* ou via l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de CRTH2, induit une diminution de la croissance des tumeurs implantées ou

chimioinduites, suggérant un rôle délétère d'hPGDS dépendant de Th2. Chez l'Homme, nous avons pu confirmer que l'expression d'*Hpgds* est corrélée à l'expression du métagène Tfh et Th2 dans le cancer du pancréas. La balance Tfh/Th2 est associée au pronostic du patient dans cette pathologie, suggérant un rôle négatif similaire pour hPGDS dans le cancer du pancréas humain.

Les cellules Th2 inhibent la réponse immunitaire anti-tumorale par la sécrétion de cytokines. En effet, toutes les cytokines produites par les cellules Th2 participent à la fuite immunitaire (De Monte *et al.*, 2011). L'IL-10, en particulier, a une activité immunosuppressive en limitant la prise en charge et la présentation antigénique par les CD (Ellyard *et al.*, 2007). Dans cette étude, comme dans nos précédents travaux (Bruchard *et al.*, 2015), nos résultats indiquent que les cellules Th2 présentent une activité pro-tumorale et que l'IL-4 a un effet délétère chez des souris porteuses de tumeurs implantées ou induites chimiquement. Les cellules Th2 semblent limiter l'activité anti-tumorale d'une thérapie cellulaire à base de Tfh, car le blocage de l'IL-4 améliore l'effet du transfert adoptif des cellules Tfh. Chez l'Homme, dans le cancer du pancréas, l'expression du métagène Th2 est associée à un mauvais pronostic. Nous avons démontré que les Tfh peuvent recruter les Th2 et augmenter leur production de cytokinique par le biais de la PGD2. Cela pourrait expliquer pourquoi les Th2 sont délétères dans le contexte d'un transfert adoptif de Tfh comparativement à celui de Th1. La PGD2 produite par les Tfh induit le recrutement des lymphocytes Th2 et augmente leur production cytokinique. L'inhibition de l'axe PGD2/CRTH2, par blocage de la synthèse de PGD2 ou de sa liaison au récepteur CRTH2, limite le recrutement et l'activation des cellules Th2 non seulement *in vitro* mais également *in vivo*. D'un point de vue thérapeutique, nos expériences murines *in vivo* ont indiqué que la PGD2 avait un effet pro-tumoral et que le blocage de l'axe PGD2/CRTH2 limitait la croissance tumorale de tumeurs implantées ou chimioinduites de manière IL-4 dépendante.

Pour conclure, nous avons constaté que l'IL-6 et l'IL-21 induisent l'expression de l'*Hpgds* dans les cellules Tfh par le biais d'un hétéro-complexe formé des facteurs de transcription pSTAT1 et pSTAT3. hPGDS conduit à la production de PGD2, qui permet le recrutement et l'activation des cellules Th2 via le récepteur CRTH2. Cet effet sur les Th2 entraîne une diminution des fonctions anti-tumorales du Tfh. En découvrant le lien entre les cellules Tfh et Th2, nos résultats mettent en évidence de nouvelles cibles qui pourraient non seulement réduire l'effet délétère des cellules Th2 mais également augmenter l'effet anti-tumoral des cellules Tfh. De plus, s'ajoutant à ce mécanisme

pronostic potentiel (axe PGD2/CRTH2), des agents antagonistes de CRTH2 tels que l'OC000459 (timapiprant) (Stinson *et al.*, 2015 ; Barnes *et al.*, 2012), le BI 671800 (Hall *et al.*, 2015), l'AZD198 (Kuna *et al.*, 2016), le fevipiprant (Gonem *et al.*, 2016) mais également un anticorps humanisé anti-CRTH2 (anti-huCRTH2) (Huang *et al.*, 2016) ont déjà démontré des résultats intéressants dans le cas d'un model préclinique d'asthme (Huang *et al.*, 2016) et d'essais randomisés (Stinson *et al.*, 2015 ; Barnes *et al.*, 2012; Hall *et al.*, 2015 ; Kuna *et al.*, 2016 ; Gonem *et al.*, 2016). Dans notre contexte, il apparaîtrait intéressant de pouvoir apprécier l'efficacité de ces inhibiteurs sur la croissance tumorale voire la survie globale des patients atteint de PAAD.

Perspectives

Chez l'Homme, les Th2 spécifiques d'antigènes tumoraux ont déjà été observés dans le sang de patients atteints de différentes maladies néoplasiques (Tatsumi *et al.*, 2002, 2003; Slager *et al.*, 2003; Marturano *et al.*, 2008). De plus, il a été démontré dans le cancer du pancréas que les Th2 jouent un rôle actif dans la progression tumorale, en ce sens où la quantité de Th2 présents dans le stroma tumoral est directement corrélée avec le pronostic des patients ayant subi une résection chirurgicale (De Monte *et al.*, 2011). D'autres données révèlent les effets prolifératifs de l'IL-4 dans la majorité des lignées cellulaires du cancer du pancréas. En plus de son expression et de ses fonctions dans les cellules immunitaires, le récepteur à l'IL-4 (IL-4R) s'est révélé être largement exprimé sur les tumeurs humaines solides, y compris dans le cancer du pancréas (Kawakami *et al.*, 2001) et pouvait être impliqué dans le processus de carcinogénèse (Al Jabaari *et al.*, 1989).

A l'heure actuelle, plusieurs traitements ciblant la voie IL-4/IL-4R ont été développés notamment dans le traitement de l'asthme et des maladies inflammatoires. Cependant et dans ce contexte, leur faible efficacité a mené à l'arrêt de leur développement. Néanmoins, la plupart de ces traitements ont montré une bonne tolérance chez l'Homme, ce qui rend possible la mise au point d'essais cliniques pour le traitement du cancer. Dans cette optique, le blocage pourrait être réalisé soit en inhibant l'IL-4R, soit en neutralisant l'IL-4 présente dans le microenvironnement tumoral. Le Dupilumab et l'AMG317 anticorps monoclonaux dirigés contre l'IL-4Ra, le Pitrakinra antagoniste de l'IL-4 et les Altrakincept et pascolizumab, deux anticorps monoclonaux neutralisant l'IL-4 pourraient être utilisés dans des études cliniques afin de contrer l'effet délétère des voies carcinogéniques dépendantes de l'IL-4.

Dans notre cas, la caractérisation de la PGD2 comme nouveau biomarqueur prédictif et son rôle dans l'activation des voies Th2/IL-4 au cours de l'entretien de la croissance tumorale ouvre la porte à de nouvelles stratégies thérapeutiques. Nous avons démontré qu'un inhibiteur pharmacologique du récepteur de la PGD2 (CRTH2) permettait de limiter la croissance tumorale au même titre que l'inhibition de l'IL-4. Chez l'Homme, la validation de notre concept de communication intercellulaire, la preuve d'une forte corrélation entre la proportion Tfh/Th2 et le pronostic des patients

atteint de cancer pancréatique ainsi que les données caractérisant la présence de Th2 et l'impact de l'IL-4 dans ce type de cancer, nous laisse espérer qu'une stratégie combo-thérapeutique d'inhibiteur de CRTH2 + anti-IL-4/IL4-R puisse améliorer le pronostic vital pour cette population de patients.

Références

Liste des Références Bibliographiques

A

- Abdel-Monem, M. M., *et al.* « Inhibitors of polyamine biosynthesis. 1. Alpha-methyl-(plus or minus)-ornithine, an inhibitor of ornithine decarboxylase ». *J. Med. Chem.*, vol. 17, 1974, p. 447–451.
- Affara, N.I., *et al.* « B cells regulate macrophage phenotype and response to chemotherapy in squamous carcinomas. » *Cancer Cell* 25, 809–821, 2014.
- Afkarian, M., *et al.* « T- bet is a STAT1- induced regulator of IL- 12R expression in naive CD4+ T cells ». *Nat Immunol*, n° 3, 2002, p. 557.
- Agarwal, S., *et al.* « Cell- type- restricted binding of the transcription factor NFAT to a distal IL- 4 enhancer in vivo ». *Immunity*, n° 12, 2000, p. 652.
- Aguirre-Ghiso, J. A. « Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy ». *Nat Rev Cancer*, 2007, p. 7–11.
- Aldarouish, M. and Wang, C. « Trends and advances in tumor immunology and lung cancer immunotherapy. » *J Exp Clin Cancer Res*, 2016.
- Alegre, M. L., *et al.* « T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. » *Nat Rev Immunol*, vol. 1, 2001, p. 220–8, doi:10.1038/35105024.
- Allen, C.D., *et al.* « Germinal-center organization and cellular dynamics ». *Immunity*, 2007
- Allen, C.D., *et al.* « Imaging of Germinal Center Selection Events During Affinity Maturation ». *Science*, 2007
- Al- Jabaari, B., *et al.* « Elevated expression of the interleukin 4 receptor in carcinoma: a target for immunotherapy? ». *Br J Cancer*, 1989.
- Al- Shibli, K. I., *et al.* « Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non- small cell lung cancer ». *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*, n° 14, 2008, p. 5227.
- Amin, A., *et al.* « Phase II study of vemurafenib followed by ipilimumab in patients with previously untreated BRAF-mutated metastatic melanoma. » *J Immunother Cancer*, 2016
- Andreu, P., *et al.* « FcRγ activation regulates inflammation-associated squamous carcinogenesis ». *Cancer Cell*, vol. 17, 2010, p. 121–134.
- Andrews, D. M., *et al.* « Recognition of the nonclassical MHC class I molecule H2-M3 by the receptor Ly49A regulates the licensing and activation of NK cells ». *Nat Immunol*, vol. 13, 2012, p. 1171–1177.
- Andris, F., *et al.* « The transcription factor c-Maf promotes the differentiation of follicular helper T cells. » *Front Immunol*, vol. 8, 2017.
- Andtbacka, R. H. I., *et al.* « Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma ». *J Clin Oncol*, vol. 33, 2015, p. (25).
- Annunziato, F., *et al.* « Phenotypic and functional features of human Th17 cells. » *J Exp Med*, 2007.
- Ansel, K. M., *et al.* « In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines ». *J Exp Med*, vol. 190, 1999, p. 1123–34, doi:doi:10.1084/jem.190.8.1123.
- Antonia, S.J., *et al.* « Durvalumab after chemoradiotherapy in stage III non-small-cell lung cancer. » *N Engl J Med*, 2017.

- Anthony, R. M., *et al.* « Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. » *Nat Med*, 2006.
- Apte S.H., *et al.* « IFN-gamma inhibits IL-4-induced type 2 cytokine expression by CD8 T cells *in vivo* and modulates the anti-tumor response. » *J Immunol*. 185(2):998-1004, 2010.
- Arbonés, M. L., *et al.* « Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. » *Immunity*, 1994.
- Artis, D., and Spits, H. « The biology of innate lymphoid cells ». *Nature* 517, 293–301, 2015.
- Asao, H., *et al.* « Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex ». *J Immunol*, vol. 167, 2001, p. 1–5.
- Ascierto, P. A., *et al.* « Biomarkers for immunostimulatory monoclonal antibodies in combination strategies for melanoma and other tumor types. » *Clin Cancer Res*, 2013.
- Asseman, C., *et al.* « An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation ». *J Exp Med*, 1999.
- Auderset, F., S. Schuster, *et al.* « Notch signaling regulates follicular helper T cell differentiation ». *J Immunol*, vol. 191, 2013, p. 2344–50.
- Auderset, F., M. Coutaz, *et al.* « The role of Notch in the differentiation of CD4(+) T helper cells. » *Curr Top Microbiol Immunol*, vol. 360, 2012.
- Avery, D. T., *et al.* « IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially ». *J Immunol*, 2008.
- Azazi, E. A., *et al.* « Circulating Chemokine Eotaxin and Chemokine Receptor CCR3 in Allergic Patients ». *Egypt J Immunol*, vol. 14, 2007, p. 73–82.

B

- Bacchi, C. J., *et al.* « Polyamine metabolism: a potential therapeutic target in trypanosomes ». *Science*, vol. 210, 1980, p. 332–334.
- Badell, I. R., *et al.* « Selective CD28 blockade results in superior inhibition of donor-specific T follicular helper cell and antibody responses relative to CTLA4-Ig ». *Am J Transplant*, 2018.
- Baecher-Allan, C., *et al.* « CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood ». *J Immunol*, 2001.
- Balkwill, F. R., *et al.* « The tumor microenvironment at a glance ». *J Cell Sci*, n° 125, 2012, p. 5596.
- Ballesteros-Tato, A., B. Leon, *et al.* « Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation. » *Immunity*, vol. 36, 2012, doi:10.1016/j.immuni.2012.02.012.
- Ballesteros-Tato, A., T. D. Randall, *et al.* « T Follicular Helper Cell Plasticity Shapes Pathogenic T Helper 2 Cell-Mediated Immunity to Inhaled House Dust Mite. » *Immunity*, vol. 44, 2016.
- Balsamo, M., *et al.* « Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(49), 20847–20852. 2009.
- Bao, Y., *et al.* and Cao. « The Immune Potential and Immunopathology of Cytokine-Producing B Cell Subsets: A Comprehensive Review ». *Journal of Autoimmunity*, vol. 55, 2014, p. 10–23.
- Baras, A. S., *et al.* « The ratio of CD8 to Treg tumor-infiltrating lymphocytes is associated with response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy in patients with muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder ». *Oncoimmunology*, 2016, p. 5.
- Barnas, J. L., *et al.* « Reciprocal Functional Modulation of the Activation of T Lymphocytes and Fibroblasts Derived from Human Solid Tumors ». *The Journal of Immunology*, 185(5), 2681–2692, 2010.

- Barnas, J. L., *et al.* « T cells and stromal fibroblasts in human tumor microenvironments represent potential therapeutic targets ». *Cancer Microenvironment*, 3(1), 29–47, 2010.
- Barnes, N. *et al.* « A randomized, double-blind, placebo controlled study of the CRTH2 antagonist OC000459 in moderate persistent asthma ». *Clin. Exp. Allergy* 42, 38–48, 2012.
- Barnett, L. G., *et al.* « B cell antigen presentation in the initiation of follicular helper T cell and germinal center differentiation ». *J Immunol*, vol. 192, 2014, p. 3607–17.
- Baschuk, N., *et al.* « Interleukin-4 impairs granzyme-mediated cytotoxicity of Simian virus 40 large tumor antigen-specific CTL in BALB/c mice. » *Cancer Immunol Immunother*, vol. 56, 2007.
- Batten, M., *et al.* « IL-27 supports germinal center function by enhancing IL-21 production and the function of T follicular helper cells ». *J Exp Med*, vol. 207, 2010, p. 2895–906, doi:doi:10.1084/jem.20100064.
- Baumjohann, D., *et al.* « Cutting Edge: Distinct waves of BCL6 expression during T follicular helper cell development ». *J Immunol*, vol. 5, n° 2089, juillet 2011, doi:doi:10.4049/jimmunol.1101393. Epub.
- Bauquet, A. T., *et al.* « The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells ». *Nature*, vol. 10, 2009, p. 167–175.
- Bélanger, S. and Crotty, S. « Dances with cytokines, featuring TFH cells, IL-21, IL-4 and B cells. » *Nature*, 2016.
- Bernink, J.H., Peters, C.P., Munneke, M., Te Velde, A.A., Meijer, S.L., Weijer, K., Hreggvidsdottir, H.S., *et al.* « Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues ». *Nat. Immunol.* 14, 221–229, 2013.
- Bentebibel, S. E., *et al.* « Analysis of human blood memory T follicular helper subsets. » *Methods Mol Biol*, 2015.
- Betts, G., *et al.* « Suppression of tumour-specific CD4+ T cells by regulatory T cells is associated with progression of human colorectal cancer ». *Gut*, n° 61, 2012, p. 1163.
- Betz, B. C., *et al.* « Bcl6 coordinates multiple aspects of B and T cell function required for normal antibody responses ». *J Exp Med*, vol. 207, 2010, p. 933–42.
- Beyer, C., and Pisetsky, D.S. « The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases ». *Nat. Rev. Rheumatol.* 6, 21–29, 2010
- Bianconi, E. *et al.* « An estimation of the number of cells in the human body ». *Ann Hum Biol.*, 2013.
- Bielamowicz, K., *et al.* « Trivalent CAR T cells overcome interpatient antigenic variability in glioblastoma ». *Neuro Oncol*, 2018.
- Bindea, G., *et al.* « Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. » *Immunity*, vol. 39, 2013.
- Bingle, L., *et al.* « The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies ». *J Pathol.*, 2002.
- Binnewies, M., *et al.* « Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. » *Nat Med*, 2018.
- Biswas, S.K., and Mantovani, A. « Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm. » *Nat. Immunol.* 11, 889–896, 2010.
- Bix, M., *et al.* « Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice ». *Nature*, vol. 349, 1991, p. 329–331.
- Blanc, C., *et al.* « Anti-tumour vaccination. » *Inn Ther Oncol*, vol. 3, 2017.
- Bluestone, J. « New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. » *Immunity*, vol. 6, 1995, doi:10.1016/1074-7613(95)90000-4.
- Bollig, N., *et al.* « Transcription factor IRF4 determines germinal center formation through follicular T-helper cell differentiation ». *Proc Natl Acad Sci*, vol. 109, 2012, p. 8664–9.

- Borges, F.T., Reis, L.A., and Schor, N. « Extracellular vesicles: Structure, function, and potential clinical uses in renal diseases ». *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 46, 824–830, 2013.
- Borghaei, H., *et al.* « Updated results from KEYNOTE-021 cohort G: a randomized, phase 2 study of pemetrexed and carboplatin (PC) with or without pembrolizumab (pembro) as first-line therapy for advanced nonsquamous NSCLC. » *Ann Oncol*, 2017.
- Bott, A., *et al.* « miRNA-1246 induces pro-inflammatory responses in mesenchymal stem/stromal cells by regulating PKA and PP2A. » *Oncotarget*, 8(27), 43897–43914, 2017.
- Brahmer, JR, *et al.* « Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer ». *The New England journal of medicine*, vol. 366, n° 26, 2012, p. 2455–65.
- Bray, F., *et al.* « Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries ». *CA Cancer J Clin*, vol. 2018, septembre 2018
- Breitfeld, D., *et al.* « Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production ». *J Exp Med*, 2000,
- Brochez, L., *et al.* « The rationale of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition for cancer therapy ». *Eur J Cancer*, vol. 76, 2017, p. 167–182.
- Brubaker, D. B., and T. L. Whiteside. « Localization of human T lymphocytes in tissue sections by a rosetting technique ». *Am. J. Pathol*, vol. 88, 1977, p. 323–332.
- Bruchard, M., *et al.* « The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation ». *Nat Immunol*, 2015.
- Bruchard, M., and Ghiringhelli, F. « Deciphering the Roles of Innate Lymphoid Cells in Cancer ». *Front Immunol*, 2019.
- Brunet, J. F., *et al.* « A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4 ». *Nature*, vol. 328, n° 6127, 1987, p. 267–70.
- Brunner, K. T., *et al.* « Quantitation and clonal isolation of cytolytic T lymphocyte precursors selectively infiltrating murine sarcoma virus-induced tumors ». *J. Exp. Med*, vol. 154, 1981, p. 362–373.
- Bruno, A., *et al.* « A think tank of TINK/TANKs: tumor-infiltrating/tumor-associated natural killer cells in tumor progression and angiogenesis ». *J Natl Cancer Inst*, vol. 1, n° 106, août 2014.
- Burke, S., *et al.* « New views on natural killer cell-based immunotherapy for melanoma treatment ». *Trends Immunol*, vol. 2010, juillet 2010.
- Burkholder, B., *et al.* « Tumor- induced perturbations of cytokines and immune cell networks. » *Biochim Biophys Acta BBABiochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*, 2014.
- Burnet, F. M. « Cancer—a biological approach ». *Br. Med. J*, vol. 1, 1957, p. 841–47.
- Burnet, F. M. « Immunological factors in the process of carcinogenesis ». *Br. Med. Bull*, vol. 20, 1964, p. 154–58.
- Burnet, F. M. « Immunological surveillance in neoplasia. » *Transplant Rev*, vol. 7, 1971.
- Burnet, F. M. « The concept of immunological surveillance ». *Prog. Exp. Tumor Res*, vol. 13, 1970, p. 1–27.
- Butcher, M. J., *et al.* « Atherosclerosis-driven Treg plasticity results in formation of a dysfunctional subset of plastic IFN γ + Th1/Tregs ». *Circ Res*, vol. 119, 2016, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309764.
- Butler, N. S., *et al.* « Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage Plasmodium infection ». *Nat Immunol*, vol. 13, 2011, p. 188–195.
- Butterfield, L. H. « Cancer vaccines. » *BMJ*, 2015.
- Cairns, R. A., *et al.* « IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. » *Blood*, vol. 8, 2012.

C

- Cai, G., *et al.* « A regulatory role for IL-10 receptor signaling in development and B cell help of T follicular helper cells in mice. ». *J Immunol*, 2012.
- Calabro, S., *et al.* « Differential intrasplenic migration of dendritic cell subsets tailors adaptive immunity ». *Cell Rep*, n° 16, 2016, p. 2485.
- Calon, A., *et al.* « Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer ». *Nature Genetics*, 47(4), 320–329, 2015.
- Camp, B. J., *et al.* « In situ cytokine production by breast cancer tumor-infiltrating lymphocytes ». *Ann. Surg. Oncol*, vol. 3, 1996, p. 176–184.
- Cannons, J. L., J. Z. Wu, *et al.* « Biochemical and genetic evidence for a SAP-PKC-theta interaction contributing to IL-4 regulation ». *J Immunol*, vol. 185, 2010, p. 2819–27, doi:doi:10.4049/jimmunol.0902182.
- Cannons, J. L., H. Qi, *et al.* « Optimal germinal center responses require a multistage T cell: B cell adhesion process involving integrins, SLAM- associated protein ». *Immunity*, 2010.
- Cannons, J. L., S. G. Tangye, *et al.* « SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. » *Annu Rev Immunol*, vol. 29, 2011, doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101302.
- Cannons, J. L., *et al.* « T follicular helper cell diversity and plasticity ». *Trends in immunology*, vol. 34, 2013, p. 200–207.
- Cantini, G., *et al.* « A critical role for regulatory T cells in driving cytokine profiles of Th17 cells and their modulation of glioma microenvironment ». *Cancer Immunol Immunother*, n° 60, 2011, p. 1739.
- Cao, L. L., *et al.* « Iron chelation inhibits cancer cell growth and modulates global histone methylation status in colorectal cancer ». *Biometals*, vol. 31, 2018, p. 797–805.
- Carmeliet, P., and R. K. Jain. « Angiogenesis in cancer and other diseases ». *Nature*, 2000.
- Carpio, V. H., *et al.* « IFN- γ and IL- 21 double producing T CELLS are Bcl6- independent and survive into the memory phase in *Plasmodium chabaudi* infection. » *PLOS One*, n° 10, 2015, p. 0144654.
- Castellana, D., Kunzelmann, C., and Freyssinet, J.-M. « Pathophysiologic significance of procoagulant microvesicles in cancer disease and progression. » *Hamostaseologie* 29, 51–57, 2009.
- Cella, M., *et al.* « A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. » *Nature*, vol. 7230, 2009, doi:10.1038/nature07537.
- Cerwenka, A., and L. L. Lanier. « Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer ». *Nat Rev Immunol*, vol. 16, 2016, p. 112–123.
- Chang, H.C, *et al.* « The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. ». *Nat Immunol*, 2010.
- Charoentong, P., *et al.* « Pan-Cancer Immunogenomic Analyses Reveal Genotype-Immunophenotype Relationships and Predictors of Response to Checkpoint Blockade ». *Cell Rep*, vol. 18, 2017, p. 248–262.
- Chaudhary, B., and E. Elkord. « Regulatory T cells in the tumor microenvironment and cancer progression: role and therapeutic targeting ». *Vaccines*, vol. 4, n° 1, 2016.
- Chavele, K. M., *et al.* « Cutting edge: circulating plasmablasts induce the differentiation of human T follicular helper cells ». *J Immunol*, 2015, doi:10.4049/jimmunol.1401190.
- Cella, M., *et al.* « A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity ». *Nature* 457, 722–725, 2009.
- Chen, J., *et al.* « Dectin- 1- activated dendritic cells: a potent Th9 cell inducer for tumor immunotherapy ». *Oncoimmunology*, vol. 5, n° 1, 2016.
- Chen, J. J., *et al.* « Tumor-associated macrophages: the doubleedged sword in cancer progression ». *J. Clin. Oncol*, vol. 23, 2005, p. 953–64.

- Chen, M.M., *et al.* « Polarization of Tissue-Resident TFH-Like Cells in Human Hepatoma Bridges Innate Monocyte Inflammation and M2b Macrophage Polarization ». *Cancer Discov*, 2016, doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0329.
- Chen, S., *et al.* « Dissection of SAP-dependent and SAP-independent SLAM family signaling in NKT cell development and humoral immunity ». *J Exp Med*, vol. 214, 2017, p. 475–89, doi:doi:10.1084/jem.20161312.
- Chen, L., Qiu, X., Wang, X., & He, J. « FAP positive fibroblasts induce immune checkpoint blockade resistance in colorectal cancer via promoting immunosuppression ». *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 487(1), 8–14, 2017.
- Cheng, J., *et al.* « Hepatic carcinoma-associated fibroblasts induce IDO-producing regulatory dendritic cells through IL-6-mediated STAT3 activation ». *Oncogenesis*, 5(2), e198–e198, 2016.
- Cheng, Y., *et al.* « Cancer-associated fibroblasts induce PDL1+ neutrophils through the IL6-STAT3 pathway that foster immune suppression in hepatocellular carcinoma ». *Cell Death and Disease*, 9(4), 2018.
- Cerwenka A., *et al.* « Migration kinetics and final destination of type 1 and type 2 CD8 effector cells predict protection against pulmonary virus infection ». *J Exp Med* 189:423–434, 1999.
- Cheung, T. C., *et al.* « Evolutionarily divergent herpesviruses modulate T cell activation by targeting the herpesvirus entry mediator cosignaling pathway ». *Proc Natl Acad Sci*, vol. 102, 2005, p. 13218–23, doi:10.1073/pnas.0506172102.
- Chin, Y., *et al.* « Phenotypic analysis of tumor-infiltrating lymphocytes from human breast cancer ». *Anticancer Res*, vol. 12, 1992, p. 1463–1466.
- Chiou, S. H., *et al.* « Current concepts of tumor-infiltrating lymphocytes in human malignancies ». *J. Reprod. Immunol*, vol. 67, 2005, p. 35–50.
- Chitu, V., and E. R. Stanley. « Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation ». *Curr. Opin. Immunol*, vol. 18, 2006, p. 39–48.
- Cho, Y., *et al.* « CD4+ and CD8+ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma ». *Cancer Res*, n° 63, 2003, p. 1555.
- Choi, J. Y., *et al.* « Circulating follicular helper- like T cells in systemic lupus erythematosus: association with disease activity ». *Arthritis Rheumatol*, n° 67, 2015, p. 999.
- Choi, Y. S., J. A. Yang, *et al.* « Bcl6 expressing follicular helper CD4 T cells are fate committed early and have the capacity to form memory ». *J Immunol*, vol. 190, 2013, p. 4014–4026.
- Choi, Y. S., D. Eto, *et al.* « Cutting edge: STAT1 is required for IL-6-mediated Bcl6 induction for early follicular helper cell differentiation ». *J Immunol*, vol. 190, 2013, p. 3049–53, doi:doi:10.4049/jimmunol.1203032.
- Choi, Y. S., J. A. Gullicksrud, *et al.* « LEF-1 and TCF-1 orchestrate T(FH) differentiation by regulating differentiation circuits upstream of the transcriptional repressor Bcl6. » *Nat Immunol*, vol. 16, 2015.
- Choi, Y. S., and R. Kageyama. « ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6 ». *Immunity*, 2011.
- Chraa, D., *et al.* « T lymphocyte subsets in cancer immunity: Friends or foes. » *Journal of leukocyte biology*, 2018.
- Chtanova, T., *et al.* « T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells ». *J Immunol*, vol. 173, 2004, p. 68–78, doi:doi:10.4049/jimmunol.173.1.68.
- Chung, Y., *et al.* « Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions ». *Nat Med*, vol. 17, 2011, doi:10.1038/nm.2426.

- Clouthier, D. L., *et al.* « GTR intrinsically sustains early type 1 and late follicular helper CD4 T cell accumulation to control a chronic viral infection. » *PLoS Pathog*, 2015, doi:10.1371/journal.ppat.1004517.
- Cobb, D. A., *et al.* « Hepatocyte-derived exosomes promote T follicular regulatory cell expansion during hepatitis C virus infection ». *Hepatology*, 2018.
- Coffey, F., *et al.* « Initial clonal expansion of germinal center B cells takes place at the perimeter of follicles ». *Immunity*, n° 30, 2009, p. 609.
- Cohen, N., *et al.* « Fibroblasts drive an immunosuppressive and growth-promoting microenvironment in breast cancer via secretion of Chitinase 3-like 1 ». *Oncogene*, 36(31), 4457–4468, 2017.
- Colonna, M., *et al.* « Alloantigen recognition by two human natural killer cell clones is associated with HLA-C or a closely linked gene ». *Proc Natl Acad Sci* 89, 1992, p. 7983–7985.
- Colotta, F., *et al.* « Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability ». *Carcinogenesis*, vol. 2009, 2009.
- Comito, G., *et al.* « Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression ». *Oncogene*, 33(19), 2423–2431, 2014.
- Cong, Y., *et al.* « A dominant, coordinated T regulatory cell- IgA response to the intestinal microbiota. » *Proc Natl Acad Sci*, 2009.
- Conticello, C., *et al.* « IL-4 protects tumor cells from anti-CD95 and chemotherapeutic agents via upregulation of antiapoptotic proteins ». *J Immunol*, vol. 172, 2004, p. 5467–5477.
- Cortes, JR, *et al.* « RHOA G17V induces T follicular helper cell specification and promotes lymphomagenesis. » *Cancer Cell*, vol. 33, 2018.
- Cosmi, L., *et al.* « CRTH2 Is the Most Reliable Marker for the Detection of Circulating Human Type 2 Th and Type 2 T Cytotoxic Cells in Health and Disease ». *European Journal of Immunology*, vol. 30, 2000, p. 2972–2979.
- Costa, A., *et al.* « Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer ». *Cancer Cell*, 33(3), 463-479.e10. 2018.
- Couper, N.K., *et al.* « IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection.». *PLoS Pathog*, 2008.
- Couronné, L., *et al.* « TET2 and DNMT3A mutations in human T-cell lymphoma ». *N Engl J Med*, 2012.
- Cremasco, V., *et al.* « FAP delineates heterogeneous and functionally divergent stromal cells in immune-excluded breast tumors ». *Cancer Immunology Research*, 6(12), 1472–1485, 2018.
- Croft, M. *et al.* « Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles ». *J. Exp. Med.*, 180, pp. 1715-1728, 1994.
- Crotty, S., R. J. Johnston, *et al.* « Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation ». *Nat Immunol*, vol. 11, 2010, p. 114–20.
- Crotty, S. « Follicular helper CD4 T cells (TFH) ». *Annu Rev Immunol*, 2011.
- Crotty, S. « Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. » *Immunity*, 2019
- Crotty, S., E. N. Kersh, *et al.* « SAP is required for generating long-term humoral immunity. » *Nature*, vol. 421, 2003, doi:10.1038/nature01318.
- Cubas, R. A., *et al.* « Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection ». *Nature Medicine*, vol. 19, 2013, p. 494–499.

- Cunningham, A. F., *et al.* « Loss of CD154 impairs the Th2 extrafollicular plasma cell response but not early T cell proliferation and interleukin- 4 induction ». *Immunology*, n° 113, 2004, p. 187.
- Cupedo, T., *et al.* « Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer-like cells ». *Nat Immunol*, 2009, doi:Jan;10(1):66-74. doi.
- Curran, M. A., *et al.* « PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. » *Proc Natl Acad Sci U*, 2010.
- Damiani, E., and H. M. Wallace. « Polyamines and cancer ». *Methods Mol. Biol*, vol. 1694, 2018, p. 469–488.

D

- D'Amico, L., *et al.* « Dickkopf-related protein 1 (Dkk1) regulates the accumulation and function of myeloid derived suppressor cells in cancer ». *Journal of Experimental Medicine*, 213(5), 827–840, 2016.
- Danushka K. *et al.* « Reduced Interleukin-4 Receptor a Expression on CD8+ T Cells Correlates with Higher Quality Anti-Viral Immunity ». *PLoS One*. 2013;8(1):e55788, 2013.
- Dardalhon, V., *et al.* « IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells ». *Nat Immunol*, 2008.
- Daussy, C., *et al.* « T-bet and Eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow ». *J. Exp. Med.* 211, 563–577, 2014.
- De Abreu, R. A., *et al.* « 6-mercaptopurine: efficacy and bone marrow toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. Association with low (thio)purine enzyme activity ». *Adv. Exp. Med. Biol*, vol. 486, 2000, p. 271–275.
- Defrance, T., *et al.* « Interleukin 4 inhibits the proliferation but not the differentiation of activated human B cells in response to interleukin 2 ». *J Exp Med*, 1988.
- De Leval, L., *et al.* « The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells ». *Blood*, vol. 109, 2007.
- De Lourdes Mora-Garcia M, *et al.* « Mesenchymal stromal cells derived from cervical cancer produce high amounts of adenosine to suppress cytotoxic T lymphocyte functions ». *J Transl Med*. 14:302, 2016.
- De Monte, L., *et al.* « Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer ». *J Exp Med*, vol. 3, n° 469, 2011, doi:doi: 10.1084/jem.20101876. Epub.
- DeNardo, D.G., Andreu, P., and Coussens, L.M. « Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. » *Cancer Metastasis Rev.* 29, 309–316, 2010.
- De Silva, N. S., and U. Klein. « Dynamics of B cells in germinal centres ». *Nat Rev Immunol*, vol. 15, 2015, p. 137–148.
- De Visser, K. E., *et al.* « De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent ». *Cancer Cell*, vol. 7, 2005, p. 411–423.
- Deenick, E. K., *et al.* « Follicular helper T cell differentiation requires continuous antigen presentation that is independent of unique B cell signaling ». *Immunity*, n° 33, 2010, p. 253.
- Del Prete, G. *et al.* « Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. » *Allergy*, 1992.

- Del Rio, M. L., *et al.* « Detection of protein on BTLA^{low} cells and in vivo antibody-mediated down-modulation of BTLA on lymphoid and myeloid cells of C57BL/6 and BALB/c BTLA allelic variants. » *Immunobiology*, 2010.
- Del Rio, M. L., N. D. Jones, *et al.* « Selective blockade of herpesvirus entry mediator-B and T lymphocyte attenuator pathway ameliorates acute graft-versus-host reaction ». *J Immunol*, 2012.
- Dell'Aringa, M., and R. L. Reinhardt. « Notch signaling represents an important checkpoint between follicular T-helper and canonical T-helper 2 cell fate. » *Mucosal Immunol*, vol. 11, 2018.
- Delgado, M., *et al.* « VIP/PACAP Preferentially Attract Th2 Effectors through Differential Regulation of Chemokine Production by Dendritic Cells ». *FASEB J*, vol. 18, 2004, p. 1453–1455.
- Delgoffe, G. M., et D. A. and Vignali. « STAT heterodimers in immunity: A mixed message or a unique signal? » *Jak-Stat*, vol. 2, 2013, p. 23060.
- Deloch, L., *et al.* « Modern radiotherapy concepts and the impact of radiation on immune activation ». *Front. Oncol*, vol. 6, n° 141, 2016, p. 10–3389.
- DeNardo, D. G., *et al.* « CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages ». *Cancer Cell*, vol. 16, 2009, p. 91–102.
- Deng, R., *et al.* « Cytotoxic T lymphocytes promote cytarabine- induced acute myeloid leukemia cell apoptosis via inhibiting Bcl- 2 expression. » *Exp Ther Med*, n° 14, 2017, p. 1081.
- Deng, Y., *et al.* « Hepatic carcinoma-associated fibroblasts enhance immune suppression by facilitating the generation of myeloid-derived suppressor cells ». *Oncogene*, 36(8), 1090–1101, 2017.
- Dieu- Nosjean, M. - C., *et al.* « Long- term survival for patients with non- small- cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. » *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*, n° 26, 2008, p. 4417.
- DiToro, D., *et al.* « Differential IL- 2 expression defines developmental fates of follicular versus nonfollicular helper T cells. » *Science*, n° 361, 2018, p. 2933.
- Do J.S., *et al.* « Committed memory effector type 2 cytotoxic T (Tc2) cells are ineffective in protective anti-tumor immunity. » *Immunol Lett.* 95(1):77-84, 2004.
- Dolcetti, L. *et al.* « Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid- derived suppressor cell subsets is determined by GM- CSF. » *Eur J Immunol*, vol. 40, 2010.
- Dorfman, D.M. *et al.* « Programmed death-1 (PD-1) is a marker of germinal center-associated T cells and angioimmunoblastic T-cell lymphoma. » *Ann J Surg Pathol*, 2006.
- Drake, C. G., *et al.* « Mechanisms of immune evasion by tumors ». *Adv. Immunol*, vol. 90, 2006, p. 51–81.
- Duan, Z., *et al.* « Phenotype and function of CXCR5⁺CD45RA⁻CD4⁺ T cells were altered in HBV-related hepatocellular carcinoma and elevated serum CXCL13 predicted better prognosis. » *Oncotarget*, vol. 42, 2015, doi:10.18632/oncotarget.6235.
- Dufort, F. J., *et al.* « Cutting edge: IL- 4- mediated protection of primary B lymphocytes from apoptosis via Stat6- dependent regulation of glycolytic metabolism. » *J Immunol*, n° 179, 2007, p. 4957.
- Dunn, G.P., *et al.* « Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape ». *Nat. Immunol*, vol. 3, 2002, p. 991–98.
- Dunn, Gavin P., *et al.* « The three Es of cancer immunoediting ». *Annu. Rev. Immunol*, vol. 22, 2004, p. 329–60.
- Dunzendorfer, U. « The effect of alpha-difluoromethyl-ornithine on tumor growth, acute phase reactants, beta-2-microglobulin and hydroxyproline in kidney and bladder carcinomas ». *Urol. Int*, vol. 36, 1981, p. 128–136.

- Dustin, M. L. « Cell adhesion molecules and actin cytoskeleton at immune synapses and kinapses. » *Curr Opin Cell Biol*, 2007.
- Dustin, M.L., *et al.* « Antigen Receptor Engagement Delivers a Stop Signal to Migrating T Lymphocytes ». *Proc Natl Acad Sci*, vol. 8, 1997.

E

- Eberl, G., *et al.* « An essential function for the nuclear receptor ROR γ t in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells ». *Nat. Immunol.* 5, 64–73, 2004.
- Eguchi, J., *et al.* « IL-4-transfected tumor cell vaccines activate tumor-infiltrating dendritic cells and promote type-1 immunity ». *J Immunol*, vol. 174, 2005, p. 7194–7201.
- Ehrlich, P. « Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung ». *Ned. Tijdschr. Geneesk*, vol. 5, 1909, p. 1–273.
- Ellem, S. J., *et al.* « A pro-tumourigenic loop at the human prostate tumour interface orchestrated by oestrogen, CXCL12 and mast cell recruitment ». *Journal of Pathology*, 234(1), 86–98, 2014.
- Ellyard, J. I., *et al.* « Th2- mediated anti- tumour immunity: friend or foe. » *Tissue Antigens*, vol. 70, 2007.
- Elsasser-Beile, U. « Th1 and Th2 cytokine response patterns in leukocyte cultures of patients with urinary bladder, renal cell and prostate carcinomas ». *Tumour Biol*, vol. 19, 1998, p. 470–476.
- Emery, D. L., *et al.* « Prostaglandin D2 Causes Accumulation of Eosinophils in the Lumen of the Dog Trachea ». *Journal of Applied Physiology*, vol. 67, 1989, p. 959–962.
- Eto, D., *et al.* « IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation. » *PLoS One*, 2011, doi:10.1371/journal.pone.0017739.
- Ettlinger, R., *et al.* « The role of IL- 21 in regulating B- cell function in health and disease ». *Immunol Rev*, n° 223, 2008, p. 86.

F

- Faguet, G. B. « A brief history of cancer: age-old milestones underlying our current knowledge database ». *Int. J. Cancer*, vol. 136, n° 2022, 2015, p. 10–1002.
- Fahey, L. M., *et al.* « Viral persistence redirects CD4 T cell differentiation toward T follicular helper cells ». *J Exp Med*, n° 208, 2011, p. 999.
- Fairfax, K. C., *et al.* « IL-4-secreting secondary T follicular helper (Tfh) cells arise from memory T cells, not persisting Tfh cells, through a B cell-dependent mechanism ». *Journal of immunology*, vol. 194, 2015, p. 2999–3010.
- Faloon, W. W., and L. W. Gorham. « Clinical experience with nitrogen mustard. N ». *Y. State J. Med*, vol. 48, 1948, p. 612–616.
- Falzone, L. *et al.* « Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium ». *Front. Pharmacol.*, 2018
- Fang, D., *et al.* « Transient T- bet expression functionally specifies a distinct T follicular helper subset. » *J Exp Med*, n° 215, 2018, p. 2714.
- Fang, D., and Zhu, J. « Dynamic balance between master transcription factors determines the fates and functions of CD4 T cell and innate lymphoid cell subsets. » *J Exp Med*, 2017.
- Farber, S., *et al.* « Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic antagonist, 4-aminopteroylglutamic acid (aminopterin). N ». *Engl. J. Med*, vol. 238, 1948, p. 787–793.

- Fearon, D. T. « The carcinoma-associated fibroblast expressing fibroblast activation protein and escape from immune surveillance. ». *Cancer Immunology Research*, 2(3), 187–193, 2014.
- Feig, C., *et al.* « Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(50), 20212–20217, 2013.
- Finak, G., *et al.* « Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer ». *Nat Med*, n° 14, 2008, p. 527.
- Fiori, M. E., *et al.* « Cancer-associated fibroblasts as abettors of tumor progression at the crossroads of EMT and therapy resistance ». *Molecular Cancer*, Vol. 18, 2019.
- Fischer, B., *et al.* « Acidic pH inhibits non-MHC-restricted killer cell functions ». *Clin. Immunol*, vol. 96, 2000, p. 252–263.
- Fischer-Fodor, E. *et al.* « Iron, inflammation and invasion of cancer cells ». *Clujul. Med*, vol. 88, 2015, p. 272–277.
- Flower, R. J., *et al.* « Inflammatory Effects of Prostaglandin D2 in Rat and Human Skin ». *Br J Pharmacol*, vol. 56, 1976, p. 229–233.
- Fluxá, P., *et al.* « High CD8+ and absence of Foxp3+ T lymphocytes infiltration in gallbladder tumors correlate with prolonged patients survival. » *BMC Cancer*, 2018, p. 18.
- Forget, M. A., *et al.* « Macrophage colony-stimulating factor augments Tie2-expressing monocyte differentiation, angiogenic function, and recruitment in a mouse model of breast cancer. ». *PLoS One*, 2014.
- Foy, T. M., *et al.* « gp39- CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory ». *J Exp Med*, 1994.
- Francisco, L. M., *et al.* « The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. » *Immunol Rev*, vol. 236, 2010.
- Frauwirth, K. A., *et al.* « The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. » *Immunity*, 2002.
- Freeman, G. J., *et al.* « Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation ». *J Exp Med*, vol. 192, n° 7, 2000, p. 1027–34.
- Fridman, W. H., *et al.* « The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome ». *Nat Rev Cancer*, 2012.
- Fridman, W. H., and Teillaud, J.L. « From the time in the wilderness to the Nobel Prize in Physiology or Medicine awarded to James Allison and Tasuku Honjo: the Long March of cancer immunotherapy ». *Med Sci (Paris)*, 2019.
- Fu, J., *et al.* « Increased regulatory T cells correlate with CD8 T- cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients ». *Gastroenterology*, n° 132, 2007, p. 2339.
- Fukuoka, T., *et al.* « The Role of Type D Prostanoid Receptors and PPARgamma in Gastric Cancer Progression ». *Anticancer Res*, vol. 34, 2014, p. 2771–2778.
- Fukunaga, A., *et al.* « CD8+ tumor- infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor- infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. » *Pancreas*, 2004.
- Fukushi, J., T. Morisaki, *et al.* « Novel biological functions of interleukin-4: Formation of tube-like structures by vascular endothelial cells in vitro and angiogenesis in vivo ». *Biochem Biophys Res Commun*, 1998.
- Fukushi, J., M. Ono, *et al.* « The activity of soluble VCAM-1 in angiogenesis stimulated by IL-4 and IL-13. » *J Immunol*, 2000.

Fury, M. *et al.* « Clinical activity and safety of MEDI4736, an anti-PD-L1 antibody, in patients with head and neck cancer. Poster presented at the European Society for Medical Oncology (ESMO) Annual Meeting 2014. » *Ann Oncol*, 2014.

G

- Gabryšová, L., *et al.* « C-Maf controls immune responses by regulating disease-specific gene networks and repressing IL-2 in CD4 + T cells article ». *Nat. Immunol.* 19, 497–507, 2018.
- Gajewski, T. F., Y. Meng, *et al.* « Immune suppression in the tumor microenvironment ». *J. Immunother*, vol. 29, 2006, p. 233–240.
- Gajewski, T. F., H. Schreiber, *et al.* « Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. » *Nat Immunol*, 2013, doi:10.1038/ni.2703.
- Galen, C. *Opera Omnia, 11 vols in 5. Venice : Heirs of L.A. Junta.* 1565.
- Galon, J., *et al.* « Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome ». *Science*, vol. 2006, n° 313, 2006.
- Gadgeel, S.M., *et al.* « Pembrolizumab (pembro) plus chemotherapy as front-line therapy for advanced NSCLC: KEYNOTE-021 cohorts A-C ». *J Clin Oncol*, 2016.
- Gandhi, L., *et al.* « Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer ». *N Engl J Med*, 2018.
- Ganti, S.N., *et al.* « Regulatory B cells preferentially accumulate in tumor-draining lymph nodes and promote tumor growth. » *Sci. Rep.* 5, 2015.
- Gard, A.D., and Agostinis, P. « Cell death and immunity in cancer: From danger signals to mimicry of pathogen defense responses. ». *Immunol. Rev.*, 2017.
- Gascard, P., & Ilstyt, T. D. « Carcinoma-associated fibroblasts: Orchestrating the composition of malignancy ». *Genes and Development*, Vol. 30, pp. 1002–1019, 2016.
- Gattinoni, L., *et al.* « Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells.». *J Clin Invest*, 2005.
- Geissmann, Frederic, *et al.* « Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties ». *Immunity*, vol. 19, n° 1, 2003, p. 71–82.
- Germain, C., *et al.* « Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer . » *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 832–844, 2014.
- Gerner, E. W., and F. L. Meyskens Jr. « Polyamines and cancer: old molecules, new understanding ». *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, 2004, p. 781–792.
- Geyer, M. B., and R. J. Brentjens. « Review: Current clinical applications of chimeric antigen receptor (CAR) modified T cells ». *Cytotherapy*, 2016, p. 1393–1409.
- Ghebeh, H., and S. Mohammed. « Al-Omair A, Qattan A, Lehe C, Al-Qudaihi G, Elkum N, Alshabanah M, Bin Amer S, Tulbah A, Ajarim D, Al-Tweigeri T, Dermime ». *Neoplasia*, vol. 8, n° 3, 2006, p. 190–8.
- Gigoux, M., *et al.* « Inducible costimulator promotes helper T- cell differentiation through phosphoinositide 3- kinase. » *Proc Natl Acad Sci*, 2009.
- Giles, H. and Leff, P. « The biology and pharmacology of PGD2. » *Prostaglandins*, 1988.
- Givel, A. M., *et al.* « MiR200-regulated CXCL12 β promotes fibroblast heterogeneity and immunosuppression in ovarian cancers ». *Nature Communications*, 9(1), 2018.
- Glasner, A., *et al.* « Recognition and prevention of tumor metastasis by the NK receptor NKp46/NCR1 ». *J Immunol*, vol. 188, 2012, p. 2509–2515.
- Glatman Zaretsky, A., *et al.* « T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens. » *J Exp Med*, vol. 206, 2009, p. 991–999.

- Gobert, M., et al. «Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome ». *Cancer Res*, vol. 2009, n° 69, 2009, p. 2000.
- Gocheva, V., et al. «IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion ». *Genes Dev*, vol. 24, 2010, p. 241–255.
- Godin-Ethier, J., et al. «Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human cancers: clinical and immunologic perspectives ». *Clin Cancer Res*, vol. 17, 2011, p. 6985–6991.
- Golumbek, P. T., et al. «Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4 ». *Science*, 1991.
- Gonem, S. et al. «Fevipirant, a prostaglandin D2 receptor 2 antagonist, in patients with persistent eosinophilic asthma: a single-centre, randomised, double-blind, parallel-group, placebo-controlled trial ». *Lancet Respir. Med.* 4, 699–707, 2016.
- Gong, F., et al. «High frequency of circulating follicular helper T cells in patients with bronchial asthma. » *Clin Lab*, vol. 60, 2014, doi:10.7754/Clin.Lab.2013.130427.
- Good, K. L., et al. «Kinetics of human B cell behavior and amplification of proliferative responses following stimulation with IL- 21 ». *J Immunol*, 2006.
- Good-Jacobson, K. L., et al. «PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells.» *Nat Immunol*, vol. 11, 2010, doi:10.1038/ni.1877.
- Goodman, L. S., and M. M. Wintrobe. «Nitrogen mustard therapy; use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders ». *J. Am. Med. Assoc*, vol. 132, 1946, p. 126–132.
- Gordon, S. et al. «Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions.. ». *Immunol Rev*, 2014.
- Gordon, S. and Mantovani, A. «Diversity and plasticity of mononuclear phagocytes. ». *Eur J Immunol*, 2011.
- Govindan, R., et al. «Phase III trial of ipilimumab combined with paclitaxel and carboplatin in advanced squamous non-small-cell lung cancer ». *J Clin Oncol*, 2017.
- Green, J.A., and Cyster, J.G. «S1PR2 links germinal center confinement and growth regulation ». *Immunol. Rev.* 247, 36–5, 2012.
- Gringhuis, S. I., et al. «Fucose-based PAMPs prime dendritic cells for follicular T helper cell polarization via DC-SIGN-dependent IL-27 production ». *Nat Commun*, vol. 5, 2014, p. 5074, doi:doi:10.1038/ncomms6074.
- Grogg, K. L., et al. «Expression of CXCL13, a chemokine highly upregulated in germinal center T-helper cells, distinguishes angioimmunoblastic T-cell lymphoma from peripheral T-cell lymphoma, unspecified. » *Mod Pathol*, 2006.
- Gunderson, A.J., et al. «Bruton tyrosine kinase–Dependent immune cell cross-talk drives pancreas cancer. » *Cancer Discov.* 6, 270–285, 2016.
- Gunderson, A. J., et al. «Blockade of fibroblast activation protein in combination with radiation treatment in murine models of pancreatic adenocarcinoma ». *PLoS ONE*, 14(2), 2019.
- Guo, Z., et al. «The Role of Circulating T Follicular Helper Cells and Regulatory Cells in Non-Small Cell Lung Cancer Patients ». *Scand J Immunol*, 2017.
- Gupta, S., et al. «Lineage-specific modulation of interleukin 4 signaling by interferon regulatory factor 4. » *J Exp Med*, vol. 190, 1999, p. 1837–48.
- Gu-Trantien, C., S. Loi, et al. «CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival ». *J Clin Invest*, vol. 123, 2013, p. 2873–92.

Gu-Trantien, C., E. Migliori, *et al.* « CXCL13-producing TFH cells link immune suppression and adaptive memory in human breast cancer ». *JCI Insight*, vol. 2, n° 2, 2017, doi:pii: 91487. doi: 10.1172/jci.insight.91487. eCollection.

H

- Hagemann, T., *et al.* « Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype ». *J. Immunol*, vol. 176, 2006, p. 5023–32.
- Haghshenas M.R., *et al.* « Helper and cytotoxic T-cell subsets (Th1, Th2, Tc1, and Tc2) in benign and malignant salivary gland tumors ». *Oral Dis.* 22(6):566-72, 2016.
- Hajdu, S. I. « Pathfinders in oncology from ancient times to the end of the end of the Middle Ages ». *Cancer*, 2016.
- Hajdu, S. I., and M. Vadmal. « A note from history : Landmarks in history of cancer. » *Cancer*, vol. 119, 2013, p. 4058–4082.
- Hall, I. P. *et al.* « Efficacy of BI 671800, an oral CRTH2 antagonist, in poorly controlled asthma as sole controller and in the presence of inhaled corticosteroid treatment ». *Pulm. Pharmacol. Ther.* 32, 37–44, 2015.
- Hallett, M. A., *et al.* « Cytokine stimulation of epithelial cancer cells: the similar and divergent functions of IL-4 and IL-13 ». *Cancer Res*, vol. 72, 2012, p. 6338–6343.
- Hamel, K. M., *et al.* « B7-H1 expression on non-B and non-T cells promotes distinct effects on T- and B-cell responses in autoimmune arthritis ». *Eur J Immunol*, vol. 40, 2010, p. 3117–27, doi:doi:10.1002/eji.201040690.
- Hammad, H., *et al.* « Monocyte-Derived Dendritic Cells Exposed to Der p 1 Allergen Enhance the Recruitment of Th2 Cells: Major Involvement of the Chemokines TARC/CCL17 and MDC/CCL22. » *Eur Cytokine Netw*, vol. 14, 2003, p. 219–228.
- Hams, E., *et al.* « Blockade of B7-H1 (programmed death ligand 1) enhances humoral immunity by positively regulating the generation of T follicular helper cells ». *J Immunol*, vol. 186, 2011, p. 5648–5655.
- Han, S., *et al.* « Cellular interaction in germinal centers. Roles of CD40 ligand and B7- 2 in established germinal centers ». *J Immunol*, 1995.
- Hanahan, D., and J. Folkman. « Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis ». *Cell*, 1996.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. « Hallmarks of Cancer: The next Generation. » *Cell*, vol. 5, 2011, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. « The Hallmarks of Cancer ». *Cell*, vol. 1, 2000.
- Hannedouche, S. *et al.* « Oxysterols direct immune cell migration via EBI2 ». *Nature* 475, 524–527, 2011.
- Harada, Y., *et al.* « The 3' Enhancer CNS2 Is a Critical Regulator of Interleukin-4-Mediated Humoral Immunity in Follicular Helper T Cells. » *Immunity*, vol. 36, 2012.
- Harker, J.A., *et al.* « Late Interleukin-6 escalates T follicular helper cell responses and controls a chronic viral infection. » *Science*, 2011.
- Hartmann, J. T., *et al.* « Tyrosine Kinase Inhibitors—a Review on Pharmacology, Metabolism and Side Effects ». *Curr. Drug Metab*, vol. 10, 2009, p. 470–481.
- Hasmim, M., *et al.* « Critical Role of Tumor Microenvironment in Shaping NK Cell Functions: Implication of Hypoxic Stress. » *Front Immunol*, 2015, doi:10.3389/fimmu.2015.00482.
- Hatzi, K., *et al.* « BCL6 orchestrates Tfh cell differentiation via multiple distinct mechanisms ». *J Exp Med*, 2015.
- Haynes, N. M., *et al.* « Role of CXCR5 and CCR7 in Follicular Th Cell Positioning and Appearance of a Programmed Cell Death Gene-1high Germinal Center-Associated Subpopulation ». *J Immunol*, vol. 179, 2007, p. 5099–108, doi:doi:10.4049/jimmunol.179.8.5099.

- He, J., et al. « Circulating Precursor CCR7(Lo)PD- 1(Hi) CXCR5(+) CD4(+) T Cells Indicate Tfh Cell Activity and Promote Antibody Responses upon Antigen Reexposure ». *Immunity*, n° 39, 2013, p. 781.
- He, K., et al. « The Cryo-Thermal Therapy Eradicated Melanoma in Mice by Eliciting CD4+ T-Cell-Mediated Antitumor Memory Immune Response. » *Cell Death Dis*, vol. 23, mars 2017, doi:10.1038/cddis.2017.125.
- Heijnen, H.F.G. et al. « Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived From Exocytosis of Multivesicular Bodies and α -Granules. » *Blood* 94, 1999.
- Helmich, B. K., and R. W. Dutton. « The Role of Adoptively Transferred CD8 T Cells and Host Cells in the Control of the Growth of the EG7 Thymoma: Factors That Determine the Relative Effectiveness and Homing Properties of Tc1 and Tc2 ». *J Immunol*, vol. 166, n° 6500–6508, 2001, p. effectors.
- Henze, A.T., and Mazzone, M. «The impact of hypoxia on tumor-associated macrophages ». *J. Clin. Invest.* 126, 3672–3679, 2016.
- Herbst, R. S., et al. « Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. » *Nature*, vol. 515, n° 7528, 2014, p. 563–7.
- Hiniker, S.M., et al. « A prospective clinical trial combining radiation therapy with systemic immunotherapy in metastatic melanoma ». *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2016.
- Hirota, K., et al. « Plasticity of Th17 Cells in Peyer's Patches Is Responsible for the Induction of T Cell- dependent IgA Responses ». *Nat Immunol*, n° 14, 2013, p. 379.
- Ho, H. H., et L. B. and Ivashkiv. « Role of STAT3 in Type I Interferon Responses. Negative Regulation of STAT1-Dependent Inflammatory Gene Activation ». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, 2006, p. 14111–14118.
- Hock, H., et al. « Mechanisms of rejection induced by tumor cell-targeted gene transfer of interleukin or interferon gamma. » *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 2, 1993.
- Hodge-Dufour, J., et al. « Induction of IL-12 and Chemokines by Hyaluronan Requires Adhesion-Dependent Priming of Resident but Not Elicited Macrophages ». *J. Immunol*, vol. 159, 1997, p. 2492–500.
- Hoepner, S., et al. « Synergy between CD8 T Cells and Th1 or Th2 Polarised CD4 T Cells for Adoptive Immunotherapy of Brain Tumours. » *PLOS One*, 2013, p. 8.
- Horikawa, M., et al. « Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice. » *J. Clin. Invest.* 121, 4268–4280, 2011.
- Hortobágyi, G. N. « Anthracyclines in the Treatment of Cancer. An Overview ». *Drugs*, vol. 54, 1997, p. 1–7.
- Howard, M. « Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2 ». *J Exp Med*, 1982.
- Hsu, H. C., et al. « Interleukin 17- producing T Helper Cells and Interleukin 17 Orchestrate Autoreactive Germinal Center Development in Autoimmune BXD2 Mice ». *Nat Immunol*, n° 9, 2008, p. 175.
- Hsu, Y. L., et al. « Lung cancer-derived galectin-1 contributes to cancer associated fibroblast-mediated cancer progression and immune suppression through TDO2/kynurenine axis ». *Oncotarget*, 7(19), 27584–27598, 2016.
- Hu, H., et al. « Noncanonical NF-kappaB regulates inducible costimulator (ICOS) ligand expression and T follicular helper cell development ». *Proc Natl Acad Sci*, vol. 108, 2011, p. 12827–32.
- Hu, J., et al. « Modulation of SAP Dependent T:B Cell Interactions as a Strategy to Improve Vaccination. » *Curr Opin Virol*, vol. 3, 2013, doi:10.1016/j.coviro.2013.05.015.
- Huang, C. - Y., et al. « Transforming growth factor β is a poor prognostic factor and inhibits the favorable prognostic value of CD8+ CTL in human hepatocellular carcinoma ». *J Immunother Hagerstown Md*, 1997.

Huang, T. *et al.* « Depletion of major pathogenic cells in asthma by targeting CRTh2 ». *JCI Insight* 1, e86689, 2016.

Huang, Y., *et al.* « CD4+ and CD8+ T Cells Have Opposing Roles in Breast Cancer Progression and Outcome ». *Oncotarget*, vol. 6, n° 17462– 17478, 2015.

I

Imai, T., *et al.* « Selective Expression of a Novel Surface Molecule by Human Th2 Cells in Vivo ». *Journal of Immunology*, vol. 162, 1999, p. 1278–1286.

Inoue, S., *et al.* « Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. » *Cancer Res.* 66, 7741–7747, 2006.

Ishige, K., *et al.* « Potent in Vitro and in Vivo Antitumor Activity of Interleukin-4-Conjugated Pseudomonas Exotoxin against Human Biliary Tract Carcinoma ». *Int J Cancer*, vol. 123, 2008, p. 2915–2922.

Ito, N., *et al.* « Prognostic Significance of T Helper ». *Anticancer Res*, n° 25, 2005, p. 2027.

Ivanov, I.I., *et al.* « The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells ». *Cell*, 2006.

J

Jacquemin, C., *et al.* « OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response ». *Immunity*, n° 42, 2015, p. 1159.

Jensen, H. K., *et al.* « Increased Intratumoral FOXP3- positive Regulatory Immune Cells during Interleukin- 2 Treatment in Metastatic Renal Cell Carcinoma ». *Clin Cancer Res*, n° 15, 2009, p. 1052.

Jia, Y., *et al.* « Impaired Function of CD4+ T Follicular Helper (Tfh) Cells Associated with Hepatocellular Carcinoma Progression. » *PLoS One*, 2015.

Jia, X. H., *et al.* « Zoledronic acid prevents the tumor-promoting effects of mesenchymal stem cells via MCP-1 dependent recruitment of macrophages ». *Oncotarget*, 6(28), 26018–26028, 2015.

Jogdand, G. M., *et al.* « Regulators of Tfh cell differentiation. » *Front Immunol*, vol. 7, 2016, doi:10.3389/fimmu.2016.00520.

John, L. B., *et al.* « Anti-PD-1 Antibody Therapy Potently Enhances the Eradication of Established Tumors By Gene-Modified T Cells ». *Clin Cancer Res*, 2013, p. 5636–5646.

Johnston, R. J., A. C. Poholek, *et al.* « Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. » *Science*, vol. 325, 2009, p. 1006–10.

Johnston, R. J., Y. S. Choi, *et al.* « STAT5 Is a Potent Negative Regulator of TFH Cell Differentiation ». *J Exp Med*, 2012, p. STAT5.

Johnston, R. J., L. Comps-Agrar, *et al.* « The Immunoreceptor TIGIT Regulates Antitumor and Antiviral CD8(+) T Cell Effector Function ». *Cancer Cell*, 2014.

Joyce, J. A., & Fearon, D. T. « T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment ». *Science*, Vol. 348, pp. 74–80. 2015.

Jutel, M., and Akdis, C.A. « T-cell regulatory mechanisms in specific immunotherapy. ». *Chem Immunol Allergy*, 2008.

K

Kageyama, R., *et al.* « The Receptor Ly108 Functions as a SAP Adaptor-Dependent on-off Switch for T Cell Help to B Cells and NKT Cell Development. » *Immunity*, vol. 36, 2012, doi:10.1016/j.immuni.2012.05.016.

Kalluri, R. « The biology and function of fibroblasts in cancer ». *Nature Reviews Cancer*, Vol. 16, 2016.

- Kalluri, R., & Zeisberg, M. « Fibroblasts in cancer ». *Nature Reviews Cancer*, Vol. 6, pp. 392–401, 2006.
- Kärjä, V., *et al.* « Tumour- infiltrating Lymphocytes: A Prognostic Factor of PSA- free Survival in Patients with Local Prostate Carcinoma Treated by Radical Prostatectomy. » *Anticancer Res*, 2005.
- Karlhofer, F. M., *et al.* « MHC Class I Alloantigen Specificity of Ly-49+ IL-2-Activated Natural Killer Cells ». *Nature*, vol. 358, 1992, p. 66–70.
- Karnowski, A., *et al.* « T Cells Collaborate in Antiviral Responses via IL-6, IL-21, and Transcriptional Activator And ». *J Exp Med*, vol. 209, 2012, p. 2049–64, doi:doi:10.1084/jem.20111504.
- Kashiwakuma, D., *et al.* « T lymphocyte attenuator suppresses IL-21 production from follicular Th cells and subsequent humoral immune responses ». *J Immunol*, vol. 185, 2010, p. 2730–6, doi:doi:10.4049/jimmunol.0903839.
- Katoh, H., *et al.* « Immunogenetic Profiling for Gastric Cancers Identifies Sulfated Glycosaminoglycans as Major and Functional B Cell Antigens in Human Malignancies. » *Cell Rep*. 20, 1073–1087, 2017.
- Kawakami, K., *et al.* « Overexpressed cell surface interleukin-4 receptor molecules can be successfully targeted for antitumor cytotoxin therapy. » *Crit Rev Immunol.*, 2001
- Kawakami, M., *et al.* « Interleukin 4 Receptor on Human Lung Cancer: A Molecular Target for Cytotoxin Therapy. » *Clin Cancer Res*, vol. 8, 2002.
- Kawamoto, S., *et al.* « The Inhibitory Receptor PD-1 Regulates IgA Selection and Bacterial Composition in the Gut ». *Science*, vol. 336, 2012, doi:10.1126/science.1217718.
- Kaye, S. B. « New Antimetabolites in Cancer Chemotherapy and Their Clinical Impact ». *Br. J. Cancer*, vol. 3, 1998, p. 1–7.
- Keir, M. E., *et al.* « PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. » *Annu Rev Immunol*, vol. 26, 2008, doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
- Kelly, L. M., *et al.* « EB12 Guides Serial Movements of Activated B Cells and Ligand Activity Is Detectable in Lymphoid and Nonlymphoid Tissues ». *J Immunol*, n° 187, 2011, p. 3032.
- Kemp, R. A., and F. Ronchese. « Tumor-Specific Tc1, but Not Tc2, Cells Deliver Protective Antitumor Immunity ». *J Immunol*, vol. 167, 2001, p. 6497–6502.
- Kerfoot, S. M., *et al.* « Germinal Center B Cell and T Follicular Helper Cell Development Initiates in the Interfollicular Zone. » *Immunity*, 2011.
- Kersten, W., *et al.* « Physicochemical Properties of Complexes between Deoxyribonucleic Acid and Antibiotics Which Affect Ribonucleic Acid Synthesis (Actinomycin, Daunomycin, Cinerubin, Nogalamycin, Chormomycin, Mithramycin, and Olivomycin) ». *Biochemistry*, vol. 5, 1966, p. 236–244.
- Khan, M. W., *et al.* « PI3K/AKT Signaling Is Essential for Communication between Tissue-Infiltrating Mast Cells, Macrophages, and Epithelial Cells in Colitis-Induced Cancer. » *Clin Cancer Res*, vol. 19, 2013, p. 2342–54, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2623.
- Kidd S, *et al.* « Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma ». *PLoS ONE*. 7:e30563, 2012.
- Kienzle, N., K. Buttigieg, *et al.* « A Clonal Culture System Demonstrates That IL-4 Induces a Subpopulation of Noncytolytic T Cells with Low CD8, Perforin and Granzyme Expression ». *J Immunol*, vol. 168, 2002, p. 1672–1681.
- Kienzle, N., S. Olver, *et al.* « Progressive Differentiation and Commitment of CD8+ T Cells to a Poorly Cytolytic CD8low Phenotype in the Presence of IL-4. » *J Immunol*, vol. 174, 2005, p. 2021–2029.
- Kim, C. H., *et al.* « Subspecialization of CXCR5+ T Cells: B Helper Activity Is Focused in a Germinal Center-Localized Subset of CXCR5+ T Cells ». *J Exp Med*, vol. 193, 2001, p. 1373–81, doi:doi:10.1084/jem.193.12.1373.

- Kim, H. P., *et al.* « Calcium- dependent Activation of Interleukin- 21 Gene Expression in T Cells ». *J Biol Chem*, n° 280, 2005, p. 25297.
- Kim, Moon, JR, *et al.* « Tumor infiltrating PD1-positive lymphocytes and the expression of PD-L1 predict poor prognosis of soft tissue sarcomas. » *PloS one*, vol. 8, n° 12, 2013, p. 82870.
- King, I. L., and M. Mohrs. « IL-4-Producing CD4+ T Cells in Reactive Lymph Nodes during Helminth Infection Are T Follicular Helper Cells ». *J Exp Med*, vol. 206, 2009, p. 1001–1007.
- Kinoshita, T., *et al.* « Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes differs depending on histological type and smoking habit in completely resected non-small-cell lung cancer. » *Ann. Oncol.* 27, 2117–2123, 2016.
- Kitajima, M., *et al.* « Memory Type 2 Helper T Cells Induce Long- lasting Antitumor Immunity by Activating Natural Killer Cells ». *Cancer Res*, n° 71, 2011, p. 4798.
- Kitamura, T., *et al.* « Immune cell promotion of metastasis ». *Nat Rev Immunol*, vol. 15, 2015, p. 73–86.
- Klein, G. « Tumor antigens ». *Annu. Rev. Microbiol*, vol. 20, 1966, p. 223–52.
- Klose, C.S.N., *et al.* « Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages ». *Cell* 157, 340–356, 2014.
- Knee, D. A., *et al.* « Rationale for Anti-GITR Cancer Immunotherapy ». *Eur J Cancer*, vol. 67, 2016, p. 1–10, doi:doi:10.1016/j.ejca.2016.06.028.
- Kobayashi, M., *et al.* « A Pathogenic Role of Th2 Cells and Their Cytokine Products on the Pulmonary Metastasis of Murine B16 Melanoma ». *J. Immunol*, vol. 160, 1998, p. 5869–5873.
- Kobayashi, S., *et al.* « TGF- β induces the differentiation of human CXCL13-producing CD4+ T cells. » *Eur. J. Immunol.* 46, 360–371, 2016.
- Kobayashi, K., *et al.* « Role of Prostaglandins in Tumor Microenvironment. » *Cancer Metastasis Reviews*, 2018.
- Koller, F. L., *et al.* « Epithelial Interleukin-4 Receptor Expression Promotes Colon Tumor Growth. Carcinogenesis ». *Carcinogenesis*, vol. 31, 2010.
- Komai-Koma, M., *et al.* « IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells ». *European journal of immunology*, vol. 37, 2007, p. 2779–2786.
- Kopf, M., *et al.* « Pleiotropic defects of IL-6-deficient mice including early hematopoiesis, T and B cell function, and acute phase responses. ». *Ann N Y Acad Sci*, 1995.
- Ksiazkiewicz, *et al.* « Importance of CCL2-CCR2A/2B signaling for monocyte migration into spheroids of breast cancer-derived fibroblasts ». *Immunobiology*, 215(9–10), 737–747, 2010.
- Krishnamoorthy, V., *et al.* « The IRF4 Gene Regulatory Module Functions as a Read-Write Integrator to Dynamically Coordinate T Helper Cell Fate ». *Immunity*, vol. 47, 2017.
- Krishnaswamy, J. K., *et al.* « Migratory CD11b(+) Conventional Dendritic Cells Induce T Follicular Helper Cell- dependent Antibody Responses ». *Sci Immunol*, n° 2, 2017, p. 9169.
- Krishnaswamy, J. K., *et al.* « Determination of T Follicular Helper Cell Fate by Dendritic Cells ». *Frontiers in immunology*, 2018, p. 2169.
- Kroenke, M. A., *et al.* « Bcl6 and Maf Cooperate to Instruct Human Follicular Helper CD4 T Cell Differentiation ». *J Immunol*, vol. 188, 2012, p. 3734–44, doi:doi:10.4049/jimmunol.1103246.
- Krummel, M. F. « CD28 and CTLA-4 Have Opposing Effects on the Response of T Cells to Stimulation ». *J Exp Med*, vol. 182, 1995, p. 459–65, doi:doi:10.1084/jem.182.2.459.
- Kryczek, I., *et al.* « Phenotype, Distribution, Generation, and Functional and Clinical Relevance of Th17 Cells in the Human Tumor Environments ». *Blood*, n° 114, 2009, p. 1141.

- Kuang, D. M. « Activated Monocytes in Peritumoral Stroma of Hepatocellular Carcinoma Foster Immune Privilege and Disease Progression through PD-L1 ». *J. Exp. Med*, vol. 206, 2009, p. 1327–37.
- Kubo, M. « T follicular helper and TH2 cells in allergic responses ». *Allergol Int*, vol. 66, 2017, p. 377–381.
- Kuleshov, M. V., et al. « Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic acids research*, vol. 44, 2016, p. 90–97.
- Kumar, V., et al. « Cancer-Associated Fibroblasts Neutralize the Anti-tumor Effect of CSF1 Receptor Blockade by Inducing PMN-MDSC Infiltration of Tumors ». *Cancer Cell*, 32(5), 654-668.e5, 2017.
- Kuna, P., Bjermer, L. & Tornling, G. « Two phase II randomized trials on the CRTh2 antagonist AZD1981 in adults with asthma ». *Drug Des. Devel. Ther.* 10, 2759–2770, 2016.
- Kupfer, A., and Singer S. J. « The specific interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. IV. Membrane and cytoskeletal reorganizations in the bound T cell as a function of antigen dose ». *J Exp Med*, vol. 5, n° 1697, novembre 1989.
- Kusam, S., et al. « Inhibition of Th2 Differentiation and GATA-3 Expression by BCL-6. » *J Immunol*, vol. 170, 2003.
- Kusuda, T., et al. « Relative Expression Levels of Th1 and Th2 Cytokine mRNA Are Independent Prognostic Factors in Patients with Ovarian Cancer ». *Oncol Rep*, n° 13, 2005, p. 1153.
- Kwon, H., et al. « Analysis of Interleukin-21-Induced Prdm1 Gene Regulation Reveals Functional Cooperation of STAT3 and IRF4 Transcription Factors ». *Immunity*, vol. 31, 2009.

L

- Ladányi, A., et al. « FOXP3+ Cell Density in Primary Tumor Has No Prognostic Impact in Patients with Cutaneous Malignant Melanoma. » *Pathol Oncol Res POR*, 2010.
- Lages, C. S., et al. « Partial Restoration of T-Cell Function in Aged Mice by in Vitro Blockade of the PD-1/PD-L1 Pathway. » *Aging Cell*, vol. 9, 2010, doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00611.x.
- Laidlaw, B. J., et al. « Interleukin- 10 from CD4(+) follicular regulatory T cells promotes the germinal center response ». *Sci Immunol*, n° 2, 2017, p. 4767.
- Lajoie, S., et al. « IL-21 Receptor Signalling Partially Mediates Th2-Mediated Allergic Airway Responses ». *Clin Exp Allergy*, vol. 44, 2014, p. 976–985.
- Lakins MA, Ghorani E, Munir H, Martins CP, Shields JD. « Cancer-associated fibroblasts induce antigen-specific deletion of CD8 (+) T Cells to protect tumour cells ». *Nat Commun.* 9:948, 2018.
- Lambert, J. M., and C. Q. Morris. « Antibody–Drug Conjugates (ADCs) for Personalized Treatment of Solid Tumors ». *A Review. Adv Ther*, vol. 34, 2017, p. (5).
- Langer, C. J., et al. « Carboplatin and Pemetrexed with or without Pembrolizumab for Advanced, Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer: A Randomised, Phase 2 Cohort of the Open-Label KEYNOTE-021 Study ». *Lancet Oncol*, 2016
- Lanier, L. L. « Missing Self, NK Cells, and The White Album ». *J Immunol*, vol. 174, 2005, p. 6565.
- Laoui, D., et al. (2011). « Tumor-associated macrophages in breast cancer: Distinct subsets, distinct functions ». *Int. J. Dev. Biol.* 55, 861–867, 2011.
- Larsen, S. K., et al. « NK Cells in the Tumor Microenvironment ». *Crit Rev Oncog*, vol. 19, n° 1-2, 2014.
- Lasek, W., et al. « Interleukin 12: Still a Promising Candidate for Tumor Immunotherapy? » *Cancer Immunol Immunother*, vol. 63, 2014, p. (5).

- Latchman, Y., *et al.* « PD-L2 Is a Second Ligand for PD-1 and Inhibits T Cell Activation ». *Nature*, vol. 2, n° 3, 2001, p. 261–8.
- Latour, S., *et al.* « Binding of SAP SH2 Domain to FynT SH3 Domain Reveals a Novel Mechanism of Receptor Signalling in Immune Regulation. » *Nat Cell Biol*, vol. 5, 2003, doi:10.1038/ncb919.
- Laubenbacher, R., *et al.* « A systems biology view of cancer ». *Biochim Biophys Acta*, vol. 2009, juin 2009, doi:Dec;1796(2):129-39. doi.
- Laufer, J.M., *et al.* « CCR7 is recruited to the immunological synapse, acts as co-stimulatory molecule and drives LFA-1 clustering for efficient T cell adhesion through ZAP70 ». *Front. Immunol.* 10, 2019.
- Laufer, J.M., and Legler, D.F. « Beyond migration—Chemokines in lymphocyte priming, differentiation, and modulating effector functions ». *J. Leukoc. Biol.* 104, 301–312, 2018.
- Leach, D. R., *et al.* « Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade ». *Science*, vol. 271, 1996, p. 1734–6, doi:doi:10.1126/science.271.5256.1734.
- Leavenworth, J. W., *et al.* « A P85alpha-Osteopontin Axis Couples the Receptor ICOS to Sustained Bcl-6 Expression by Follicular Helper and Regulatory T Cells. » *Nat Immunol*, 2015.
- LeBleu, V. S., & Kalluri, R. « A peek into cancer-associated fibroblasts: Origins, functions and translational impact ». *DMM Disease Models and Mechanisms*, 11(4). 2018.
- Lee, J.M., *et al.* « Safety and clinical activity of the programmed death-ligand 1 inhibitor durvalumab in combination with poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib or vascular endothelial growth factor receptor 1-3 inhibitor cediranib in women's cancers: a dose-escalation, phase I study ». *J Clin Oncol*, 2017.
- Lee, J. Y., *et al.* « The Transcription Factor KLF2 Restrains CD4(+) T Follicular Helper Cell Differentiation ». *Immunity*, vol. 42, 2015.
- Lee, Y. K., *et al.* « Late Developmental Plasticity in the T Helper 17 Lineage. » *Immunity*, vol. 1, 2009, doi:10.1016/j.immuni.2008.11.005.
- Leland, P., *et al.* « Human Breast Carcinoma Cells Express Type II IL-4 Receptors and Are Sensitive to Antitumor Activity of a Chimeric IL-4-Pseudomonas Exotoxin Fusion Protein in Vitro and in Vivo. » *Mol Med*, vol. 6, 2000.
- Lemonnier, F., *et al.* « Recurrent TET2 Mutations in Peripheral T-Cell Lymphomas Correlate with TFH-like Features and Adverse Clinical Parameters. » *Blood*, vol. 7, 2012.
- Levy, A., *et al.* « Concurrent irradiation with the anti-programmed cell death ligand-1 immune checkpoint blocker durvalumab: single centre subset analysis from a phase 1/2 trial ». *Eur J Cancer*, 2016.
- Lewis, R. A., *et al.* « Prostaglandin D2 Generation after Activation of Rat and Human Mast Cells with Anti-IgE ». *Journal of Immunology*, vol. 129, 1982, p. 1627–1631.
- Li, B. H., *et al.* « IL-4/Stat6 Activities Correlate with Apoptosis and Metastasis in Colon Cancer Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 369, 2008, p. 554–560.
- Li, J., E. Lu, T. Yi, *et al.* « EB12 Augments Tfh Cell Fate by Promoting Interaction with IL2-quenching Dendritic Cells ». *Nature*, n° 533, 2016, p. 114.
- Li, P., R. Spolski, W. Liao, *et al.* « BATF-JUN Is Critical for IRF4-Mediated Transcription in T Cells ». *Nature*, vol. 490, 2012.
- Li, T., *et al.* « Hepatocellular carcinoma-associated fibroblasts trigger NK cell dysfunction via PGE2 and IDO ». *Cancer Letters*, 318(2), 154–161, 2012.
- Li, Z., J. Jiang, *et al.* « Endogenous interleukin-4 promotes tumor development by increasing tumor cell resistance to apoptosis. » *Cancer Res*, vol. 68, 2008.
- Li, Z., L. Chen, *et al.* « Paradoxical roles of IL-4 in tumor immunity. » *Cell Mol Immunol*, vol. 6, 2009.

- Li, Z., et al. « Recent updates in cancer immunotherapy: a comprehensive review and perspective of the 2018 China Cancer Immunotherapy Workshop in Beijing. » *Journ. Hematol. & Oncol.* , 11 : 142, 2018.
- Liao, D., et al. « Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model ». *PLoS ONE*, 4(11), 2009.
- Liao, N. S., et al. « MHC Class I Deficiency: Susceptibility to Natural Killer (NK) Cells and Impaired NK Activity ». *Science*, vol. 253, 1991, p. 199–202.
- Liao, W., et al. « Modulation of Cytokine Receptors by IL-2 Broadly Regulates Differentiation into Helper T Cell Lineages. » *Nat Immunol*, vol. 12, 2011, doi:10.1038/ni.2030.
- Lin, E. Y., et al. « Colony-Stimulating Factor 1 Promotes Progression of Mammary Tumors to Malignancy ». *J. Exp. Med*, vol. 193, 2001, p. 727–40.
- Lindau, D., et al. « The Immunosuppressive Tumour Network: Myeloid-Derived Suppressor Cells, Regulatory T Cells and Natural Killer T Cells. » *Immunology*, 2013, doi:10.1111/imm.12036.
- Linsley, P. S., et al. « B7-2 (CD86) Bind with Similar Avidities but Distinct Kinetics to CD28 and CTLA-4 Receptors ». *Human*, vol. 7, n° 1, 1994, p. (CD80).
- Linterman, M. A., et al. « Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response ». *Nat Med*, n° 17, 2011, p. 982.
- Linterman, M. A., L. Beaton, et al. « IL- 21 acts directly on B cells to regulate Bcl- 6 expression and germinal center responses ». *J Exp Med*, n° 207, 2010, p. 363.
- Liu, D., H. Xu, et al. « T- B- cell entanglement and ICOSL- driven feed- forward regulation of germinal centre reaction ». *Nature*, n° 517, 2015.
- Liu, J. - Q., X. - Y. Li, et al. « Tumor- specific Th2 Responses Inhibit Growth of CT26 Colon- cancer Cells in Mice via Converting Intratumor Regulatory T Cells to Th9 Cells ». *Sci Rep*, 2015, p. 5.
- Liu, L., et al. « Stromal myofibroblasts are associated with poor prognosis in solid cancers: A meta-analysis of published studies ». *PLoS ONE*, 11(7), 2016.
- Liu, R. B., et al. « Densely Granulated Murine NK Cells Eradicate Large Solid Tumors ». *Cancer Res*, vol. 72, 2012, p. 1964–1974.
- Liu, S., B. Chen, et al. « Role of cytotoxic tumor- infiltrating lymphocytes in predicting outcomes in metastatic HER2- positive breast cancer: a secondary analysis of a randomized clinical trial ». *JAMA Oncol*, n° 3, 2017, p. 172085.
- Liu, S.V., et al. « Atezolizumab (atezo) plus platinum-based chemotherapy (chemo) in non-small cell lung cancer (NSCLC): update from a phase Ib study ». *J Clin Oncol*, 2017.
- Liu, X., H. Lu, et al. « Genome-Wide Analysis Identifies Bcl6-Controlled Regulatory Networks during T Follicular Helper Cell Differentiation ». *Cell Rep*, vol. 14, 2016.
- Liu, X., X. Chen, et al. « Transcription Factor Achaete-Scute Homologue 2 Initiates Follicular T-Helper-Cell Development ». *Nature*, vol. 507, 2014.
- Liu, X., R. I. Nurieva, et al. « Transcriptional Regulation of Follicular T-Helper (Tfh) Cells. » *Immunol Rev*, vol. 252, 2013, doi:10.1111/imr.12040.
- Locci, M., et al. « Activin A Programs the Differentiation of Human TFH Cells. » *Nat Immunol*, vol. 17, 2016, doi:10.1038/ni.3494.
- Loo, P. F. V., et al. « Preclinical Evaluation of MCLA117, a CLEC12AxCD3 Bispecific Antibody Efficiently Targeting a Novel Leukemic Stem Cell Associated Antigen in AML ». *Blood*, vol. 126, 2015, p. (23).
- Lorvik, K. B., et al. « Adoptive Transfer of Tumor- specific Th2 Cells Eradicates Tumors by Triggering an in Situ Inflammatory Immune Response ». *Cancer Res*, n° 76, 2016, p. 6876.
- Lu, C., A. Talukder, N. M. Savage, et al. « JAK- STAT- mediated Chronic Inflammation Impairs Cytotoxic T Lymphocyte Activation to Decrease Anti- PD- 1 Immunotherapy Efficacy in Pancreatic Cancer ». *Oncoimmunology*, n° 6, 2017, p. 1291106.

- Lu, K. T., Y. Kanno, and J. L. Cannons. « Functional and Epigenetic Studies Reveal Multistep Differentiation and Plasticity of in Vitro- generated and in Vivo- derived Follicular T Helper Cells ». *Immunity*, n° 35, 2011, p. 632.
- Lu, P., C. Shih, *et al.* « Ephrin B1- mediated Repulsion and Signaling Control Germinal Center T Cell Territoriality and Function ». *Science*, n° 356, 2017, p. 9264.
- Lu, P., V. M. Weaver, *et al.* « The Extracellular Matrix: A Dynamic Niche in Cancer Progression ». *J Cell Biol*, vol. 196, 2012, p. 395–406, doi:doi: 10.1083/jcb.201102147.
- Lu, Y., *et al.* « Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo ». *J Clin Invest*, 2012.
- Lu, Y., *et al.* « Tumor- specific IL- 9–Producing CD8+ Tc9 Cells Are Superior Effector than Type- I Cytotoxic Tc1 Cells for Adoptive Immunotherapy of Cancers ». *Proc Natl Acad Sci*, 2014.
- Luci, C., *et al.* « Influence of the Transcription Factor ROR γ on the Development of NKp46+ Cell Populations in Gut and Skin ». *Nat Immunol*, 2009, doi:Jan;10(1):75-82. doi.
- Luthje, K., *et al.* « The Development and Fate of Follicular Helper T Cells Defined by an IL-21 Reporter Mouse ». *Nature Immunol*, vol. 13, 2012, p. 491–498.
- Lynch, T. J., *et al.* « Ipilimumab in Combination with Paclitaxel and Carboplatin as First-Line Treatment in Stage IIIB/IV Non-Small-Cell Lung Cancer: Results from a Randomized, Double-Blind, Multicenter Phase II Study ». *J Clin Oncol*, vol. 30, 2012, p. 2046–2054.

M

- Ma, C. S., *et al.* « Functional STAT3 Deficiency Compromises the Generation of Human T Follicular Helper Cells ». *Blood*, vol. 119, 2012.
- Ma, C. S., and E. K. Deenick. « The Role of SAP and SLAM Family Molecules in the Humoral Immune Response ». *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1217, 2011, p. 32–44, doi:doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05824.x.
- Ma, Q. Y., *et al.* « Function of Follicular Helper T Cell Is Impaired and Correlates with Survival Time in Non-Small Cell Lung Cancer. » *Int Immunopharmacol*, 2016.
- Mace, T. A., *et al.* « Pancreatic cancer-associated stellate cells promote differentiation of myeloid-derived suppressor cells in a STAT3-dependent manner ». *Cancer Research*, 73(10), 3007–3018, 2013.
- Mace, T. A., *et al.* « IL-6 and PD-L1 antibody blockade combination therapy reduces tumour progression in murine models of pancreatic cancer ». *Gut*, 67(2), 320–332, 2018.
- Macintyre, A. N., *et al.* « The Glucose Transporter Glut1 Is Selectively Essential for CD4 T Cell Activation and Effector Function. » *Cell Metab*, 2014.
- Mackensen, A., *et al.* « Evidence for in Situ Amplification of Cytotoxic T- lymphocytes with Antitumor Activity in a Human Regressive Melanoma. » *Cancer Res*, 1993.
- MacLennan, I. C., *et al.* « Extrafollicular antibody responses. » *Immunol Rev*, vol. 8, 2003.
- Macleod, K. « Tumor suppressor genes ». *Curr. Opin. Genet. Dev*, vol. 10, 2000, p. 81–93.
- MacLeod, M. K., *et al.* « Memory CD4 T Cells That Express CXCR5 Provide Accelerated Help to B Cells ». *J Immunol*, n° 186, 2011, p. 2896.
- Mahmoud, S. M. A., *et al.* « Tumor- infiltrating CD8+ Lymphocytes Predict Clinical Outcome in Breast Cancer ». *J Clin Oncol*, 2011, p. 29.
- Mami- Chouaib, F., *et al.* « Antitumor cytotoxic T- lymphocyte response in human lung carcinoma: identification of a tumor- associated antigen ». *Immunol Rev*, n° 188, 2002, p. 121.
- Man, Y., *et al.* « Tumor-Infiltrating Immune Cells Promoting Tumor Invasion and Metastasis: Existing Theories ». *J Cancer*, vol. 4, 2013, p. 84–95.
- Mantovani, A., P. Allavena, *et al.* « Cancer-related inflammation ». *Nature*, 2008.
- Mantovani, A., S. Sozzani, *et al.* « Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes ». *Trends Immunol*, 2002.

- Mantovani, A., B. Savino, *et al.* « The Chemokine System in Cancer Biology and Therapy. » *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 21, 2010.
- Marcus, A., *et al.* « Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells ». *Adv Immunol*, vol. 122, 2014, p. 91–128.
- Mariathasan S, *et al.* « TGFbeta attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells ». *Nature*. 554:544–8, 2018.
- Marigo, I., *et al.* « Tumor-Induced Tolerance and Immune Suppression Depend on the C/EBPβ Transcription Factor. » *Immunity*, vol. 32, 2010.
- Marin-Acevedo, J.A., *et al.* « Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges. » *J Hematol Oncol*, 2018.
- Marques, R.E. *et al.* « Exploring the Homeostatic and Sensory Roles of the Immune System. » *Front Immunol*, 2016.
- Marsden, K. A., *et al.* « The Effect of Prostaglandin D2 (PGD2) on Circulating Eosinophils ». *Prostaglandins Leukot Med*, vol. 15, 1984, p. 387–397.
- Marshall, H. D., *et al.* « Differential Expression of Ly6C and T-Bet Distinguish Effector and Memory Th1 CD4(+) Cell Properties during Viral Infection. » *Immunity*, vol. 35, 2011.
- Martin, F. *et al.* « Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF-β-dependent immunosuppressive activity? ». *Trends Mol Med*, 2012.
- Martinez, G. J., *et al.* « Cutting Edge: NFAT Transcription Factors Promote the Generation of Follicular Helper T Cells in Response to Acute Viral Infection ». *J Immunol*, 2016.
- Martins, G., and K. Calame. « Regulation and Functions of Blimp-1 in T and B Lymphocytes. » *Annu Rev Immunol*, vol. 26, 2008.
- Matloubian, M., *et al.* « Lymphocyte Egress from Thymus and Peripheral Lymphoid Organs Is Dependent on S1P Receptor 1 ». *Nature*, vol. 6972, janvier 2004.
- Marturano, J., *et al.* « Endosomal proteases influence the repertoire of MAGE-A3 epitopes recognized in vivo by CD4+ T cells. » *Cancer Res*, 2008.
- Matsumoto, M., *et al.* « The Calcium Sensors STIM1 and STIM2 Control B Cell Regulatory Function through Interleukin-10 Production. » *Immunity* 34, 703–714, 2011.
- Matzinger, P. « Tolerance, Danger, and the Extended Family ». *Annu. Rev. Immunol*, vol. 12, 1994, p. 991–1045.
- McCarron, M. J., and J. C. Marie. « TGF-Beta Prevents T Follicular Helper Cell Accumulation and B Cell Autoreactivity ». *J Clin Invest*, vol. 124, 2014, p. 4375–86, doi:doi:10.1172/JCI76179.
- McDonald, P. W., *et al.* « IL-7 signalling represses Bcl-6 and the TFH gene program ». *Nat Commun*, vol. 7, 2016, p. 10285, doi:doi:10.1038/ncomms10285.
- Medawar, P.B. « A Second Study of the Behaviour and Fate of Skin Homografts in Rabbits ». *J. Anat*, vol. 79, 1945, p. 157–76.
- Medawar, P. « The Behavior and Fate of Skin Autografts and Skin Homografts in Rabbits ». *J. Anat*, vol. 78, 1944, p. 176–99.
- Medrek, C., *et al.* « The Presence of Tumor Associated Macrophages in Tumor Stroma as a Prognostic Marker for Breast Cancer Patients ». *BMC Cancer*, 2012.
- Melo Gagliato, D., *et al.* « Tumor-infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer and Implications for Clinical Practice. » *Biochim Biophys Acta*, 2017.
- Melo-Gonzalez, F., and Hepworth, M.R. « Functional and phenotypic heterogeneity of group 3 innate lymphoid cells ». *Immunology* 150, 265–275, 2017.
- Meyer, L. M., *et al.* « Treatment of Acute Leukemia with Amethopterin (4-Amino, 10-Methyl Pteroyl Glutamic Acid) ». *Acta Haematol*, vol. 4, 1950, p. 157–167.
- Mjösberg, J.M., *et al.* « Human IL-25-and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR4 and CD16 ». *Nat. Immunol.* 12, 1055–1062, 2011.
- Miller, J. F. « Effect of Thymectomy in Adult Mice on Immunological Responsiveness ». *Nature*, 1965.

- Miller, J. F. « The role of the thymus in immunity». *Union Med Can*, 1968.
- Miller-Fleming, L., et al. « Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell ». *J. Mol. Biol.*, vol. 427, 2015, p. 3389–3406.
- Minor, D.R., et al. « Severe gastrointestinal toxicity with administration of trametinib in combination with dabrafenib and ipilimumab ». *Pigment Cell Melanoma Res*, 2015.
- Mirzaei, H. R., et al. « Chimeric Antigen Receptors T Cell Therapy in Solid Tumor: Challenges and Clinical Applications ». *Front Immunol*, 2017, p.
- Mishalian, I., et al. « Tumor-Associated Neutrophils (TAN) Develop pro-Tumorigenic Properties during Tumour Progression. » *Cancer Immunol Immunother*, vol. 62, 2013.
- Mitchell, G. F., and J. F. Miller. « Cell to Cell Interaction in the Immune Response. II. The Source of Hemolysin-Forming Cells in Irradiated Mice given Bone Marrow and Thymus or Thoracic Duct Lymphocytes ». *J. Exp. Med*, vol. 128, 1968, p. 821–37.
- Miyauchi, K., et al. « Protective Neutralizing Influenza Antibody Response in the Absence of T Follicular Helper Cells ». *Nat Immunol*, n° 17, 2016, p. 1447.
- Mizukami, M., et al. « Antitumor effect of antibody against a SEREX-defined antigen (UOEHL-1) on lung cancer xenotransplanted into severe combined immunodeficiency mice. » *Cancer Res.* 67, 8351–8357, 2007.
- Mlecnik, B., et al. « Histopathologic- based Prognostic Factors of Colorectal Cancers Are Associated with the State of the Local Immune Reaction ». *J Clin Oncol*, n° 29, 2011, p. 618.
- Modesti, A., et al. « Ultrastructural Evidence of the Mechanisms Responsible for Interleukin-4- activated Rejection of a Spontaneous Murine Adenocarcinoma ». *Int J Cancer*, 1993.
- Monte, L., et al. « Intratumor T Helper Type 2 Cell Infiltrate Correlates with Cancer-associated Fibroblast Thymic Stromal Lymphopoietin Production and Reduced Survival in Pancreatic Cancer ». *J Exp Med*, n° 208, 2011, p. 478.
- Monteran, L., & Erez, N. « The Dark Side of Fibroblasts: Cancer-Associated Fibroblasts as Mediators of Immunosuppression in the Tumor Microenvironment ». *Frontiers in Immunology*, 10, 2019.
- Morita, R., et al. « Human Blood CXCR5(+)CD4(+) T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets That Differentially Support Antibody Secretion. » *Immunity*, vol. 34, 2011.
- Moriyama, S., et al. « Sphingosine- 1- phosphate Receptor 2 Is Critical for Follicular Helper T Cell Retention in Germinal Centers ». *J Exp Med*, 2014.
- Mossman, T.R., et al. « Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.». *J Immunol*, 1986.
- Mougiakakos, D., et al. « Intratumoral Forkhead Box P3- positive Regulatory T Cells Predict Poor Survival in Cyclooxygenase- 2- positive Uveal Melanoma ». *Cancer*, n° 116, 2010, p. 2233.
- Moulder, J. E., and C. Seymour. « Radiation Fractionation: The Search for Isoeffect Relationships and Mechanisms. » *Int. J. Radiat. Biol*, vol. 2, 2017, p. 1–9.
- Moulin, V.J., et al. « Shedding of microparticles by myofibroblasts as mediator of cellular cross-talk during normal wound healing. » *J. Cell. Physiol.* 225, 734–740, 2010.
- Movahedi, K., Laoui, D., Gysemans, C., Baeten, M., Stangé, G., Van Bossche, J. Den, Mack, M., Pipeleers, D., et al. « Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. » *Cancer Res.* 70, 5728–5739, 2010.
- Mullen, A. C., et al. « Role of T- bet in Commitment of TH1 Cells before IL- 12- dependent Selection ». *Science*, n° 292, 2001, p. 1907.

- Murata, T., *et al.* « Role of Prostaglandin D2 Receptor DP as a Suppressor of Tumor Hyperpermeability and Angiogenesis in Vivo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2008, p. 20009–20014.
- Murray, H. W., *et al.* « Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. ». *J Immunol*, 1985.
- Muth, A., *et al.* « Polyamine Transport Inhibitors: Design, Synthesis, and Combination Therapies with Difluoromethylornithine ». *J. Med. Chem.*, vol. 57, 2014, p. 348–363.

N

- Nagata, K. *et al.* « Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo. » *J Immunol*, 1999.
- Nakayamada, S., Y. Kanno, *et al.* « Th1 Cell Differentiation Is Marked by a Tfh Cell- like Transition. » *Immunity*, 2011.
- Nakayamada, S., A. C. Poholek, *et al.* « Type I IFN Induces Binding of STAT1 to Bcl6: Divergent Roles of STAT Family Transcription Factors in the T Follicular Helper Cell Genetic Program ». *J Immunol*, vol. 192, 2014, p. 2156–66.
- Neill, DR, *et al.* « Nuocytes Represent a New Innate Effector Leukocyte That Mediates Type-2 Immunity. » *Nature*, vol. 7293, 2010, doi:10.1038/nature08900.
- Neri, D., and P. M. Sondel. « Immunocytokines for Cancer Treatment: Past, Present and Future ». *Curr Opin Immunol*, vol. 40, 2016, p. 96–102.
- Nieuwenhuis, P., and D. Opstelten. « Functional Anatomy of Germinal Centers ». *Am. J. Anat*, vol. 170, 1984, p. 421–35.
- Nieuwland, R., *et al.* « Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant ». *Circulation* 96, 3534–3541, 1997.
- Nishida, S., *et al.* « Randomized phase II study of WT1 peptide vaccine plus gemcitabine for advanced pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC): Clinical efficacy and immune response ». *J Clin Oncol*, vol. 34, 2016, p. (15_suppl).
- Nocentini, G., *et al.* « A New Member of the Tumor Necrosis Factor/Nerve Growth Factor Receptor Family Inhibits T Cell Receptor-Induced Apoptosis ». *Proc Nat Acad Sci*, vol. 94, 1997, p. 6216–21, doi:10.1073/pnas.94.12.6216.
- Noffz, G., *et al.* « Neutrophils but Not Eosinophils Are Involved in Growth Suppression of IL-4-Secreting Tumors ». *J Immunol*, 1998.
- Norcross, M. A. « A Synaptic Basis for T-Lymphocyte Activation. » *Ann Immunol*, 1984.
- Norton, S. E., *et al.* « Immune cell interplay in colorectal cancer prognosis ». *World J Gastrointest Oncol*, n° 7, 2015, p. 232.
- Nossal, G.J., *et al.* « Cell to cell interaction in the immune response. 3. Chromosomal marker analysis of single antibody-forming cells in reconstituted, irradiated, or thymectomized mice. ». *J Exp Med*, 1968.
- Noy, R., and J. W. Pollard. « Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. » *Immunity*, 2014, doi:10.1016/j.immuni.2014.06.010.
- Nurieva, R., *et al.* « Essential Autocrine Regulation by IL-21 in the Generation of Inflammatory T Cells. » *Nature*, vol. 448, 2007, doi:10.1038/nature05969.
- Nurieva, R. I., Y. Chung, G. J. Martinez, *et al.* « Bcl6 Mediates the Development of T Follicular Helper Cells ». *Science*, vol. 325, 2009, doi:10.1126/science.1176676.
- Nurieva, R. I., Y. Chung, D. Hwang, *et al.* « Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. » *Immunity*, vol. 29, n° 2, 2008, p. 138–49, doi:doi:10.1016/j.immuni.2008.05.009.
- Nurieva, R. I., and Y. Chung. « Understanding the Development and Function of T Follicular Helper Cells. » *Cell Mol Immunol*, vol. 7, 2010, doi:10.1038/cmi.2010.24.

Nzula, S., Going, J.J., and Stott, D.I. « Antigen-driven clonal proliferation, somatic hypermutation, and selection of B lymphocytes infiltrating human ductal breast carcinomas. » *Cancer Res.* 63, 3275–3280, 2003.

O

- Obeid, M., *et al.* « Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death ». *Nat Med*, vol. 13, n° 1, 2007, p. 54–61.
- Oberlies, N. H., and D. J. Kroll. « Camptothecin and Taxol: Historic Achievements in Natural Products Research ». *J. Nat. Prod.*, vol. 67, 2004, p. 129–135.
- Ochando, J., and M. S. Braza. « T Follicular Helper Cells: A Potential Therapeutic Target in Follicular Lymphoma. » *Oncotarget*, vol. 8, 2017.
- Odegard, J. M., *et al.* « ICOS- dependent Extrafollicular Helper T Cells Elicit IgG Production via IL- 21 in Systemic Autoimmunity ». *J Exp Med*, 2008.
- Oestreich, K. J., *et al.* « Bcl- 6 Directly Represses the Gene Program of the Glycolysis Pathway ». *Nat Immunol*, n° 15, 2014, p. 964.
- Ogbe, A., *et al.* « Early Growth Response Genes 2 and 3 Regulate the Expression of Bcl6 and Differentiation of T Follicular Helper Cells ». *J Biol Chem*, vol. 290, 2015, p. 20455–65.
- Öhlund, D., Elyada, E., & Tuveson, D. « Fibroblast heterogeneity in the cancer wound ». *Journal of Experimental Medicine*, Vol. 211, pp. 1503–1523. 2014.
- Ohtaki, Y., *et al.* « Stromal macrophage expressing CD204 is associated with tumor aggressiveness in lung adenocarcinoma ». *J. Thorac. Oncol.* 5, 1507–1515, 2010.
- Okada, T., *et al.* « Antigen- engaged B Cells Undergo Chemotaxis toward the T Zone and Form Motile Conjugates with Helper T Cells. » *PLoS Biol*, n° 3, 2005, p. 150.
- Old, L. J., and E. A. Boyse. « Specific antigens of tumors and leukemias of experimental animals ». *Med. Clin. North Am*, vol. 50, 1966, p. 901–12.
- Olkhanud, P. B., *et al.* « Tumor-Evoked Regulatory B Cells Promote Breast Cancer Metastasis by Converting Resting CD4+ T Cells to T-Regulatory Cells ». *Cancer Res*, vol. 71, 2011, p. 3505–3515.
- Ouyang, Y., *et al.* « Decreased expression of EBI3 and Foxp3 in CD4+CD25+ regulatory T cells in murine experimental allergic rhinitis ». *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.*, 2011.
- Olver, S., *et al.* « The Duplicitous Effects of Interleukin 4 on Tumour Immunity: How Can the Same Cytokine Improve or Impair Control of Tumour Growth? » *Tissue Antigens*, vol. 69, 2007.
- Owaki, T., *et al.* « IL-27 Suppresses CD28-Mediated [Correction of Medicated] IL-2 Production through Suppressor of Cytokine Signaling 3 ». *J Immunol*, vol. 176, 2006, doi:10.4049/jimmunol.176.5.2773.
- Oya, Y., *et al.* « Development of Autoimmune Hepatitis-like Disease and Production of Autoantibodies to Nuclear Antigens in Mice Lacking B and T Lymphocyte Attenuator. » *Arthritis Rheum*, vol. 58, 2008, doi:10.1002/art.23674.
- Ozaki, K., *et al.* « A Critical Role for IL- 21 in Regulating Immunoglobulin Production ». *Science*, n° 298, 2002, p. 1630.

P

- Pagès, F., *et al.* « In Situ Cytotoxic and Memory T Cells Predict Outcome in Patients with Early- stage Colorectal Cancer ». *J Clin Oncol*, n° 27, 2009, p. 5951.
- Palma, M., *et al.* « T Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia Display Dysregulated Expression of Immune Checkpoints and Activation Markers ». *Haematologica*, n° 102, 2017, p. 572.

- Pandha, H., *et al.* « Abstract CT115: Phase 1b KEYNOTE 200 (STORM Study): A Study of an Intravenously Delivered Oncolytic Virus, Coxsackievirus A21 in Combination with Pembrolizumab in Advanced Cancer Patients. » *Cancer Res*, vol. 77, 2017, p. 115.
- Papavramidou, N., *et al.* « Ancient Greek and Greco-Roman Methods in Modern Surgical Treatment of Cancer ». *Ann. Surg. Oncol*, vol. 17, 2010, p. 665–667.
- Park, H. J., *et al.* « PPARgamma Negatively Regulates T Cell Activation to Prevent Follicular Helper T Cells and Germinal Center Formation. » *PLoS One*, 2014.
- Park, J., *et al.* « Th9 Cells Promote the Survival of Myeloid Dendritic Cells in Cancer Immunotherapy. » *Cancer Immunol Immunother Cll*, 2014.
- Patel, S.P., *et al.* « A phase II study of ipilimumab plus temozolomide in patients with metastatic melanoma ». *Cancer Immunol Immunother*, 2017.
- Paul, W. E., and J. Ohara. « B- cell Stimulatory Factor- 1/Interleukin 4. » *Annu Rev Immunol*, 1987.
- Paz-Ares, L., *et al.* « CheckMate 227: a randomized, open-label phase 3 trial of nivolumab, nivolumab plus ipilimumab, or nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy in chemotherapy-naïve patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) ». *Ann Oncol*, 2017.
- Peach, R. J., *et al.* « Complementarity determining region 1 (CDR1)- and CDR3-analogous regions in CTLA-4 and CD28 determine the binding to B7-1. » *J Exp Med*, vol. 6, n° 2049–58, 1994, p. 7–1, doi:doi:10.1084/jem.180.6.2049.
- Peggs, K. S., *et al.* « Blockade of CTLA-4 on Both Effector and Regulatory T Cell Compartments Contributes to the Antitumor Activity of Anti-CTLA-4 Antibodies ». *J Exp Med*, vol. 206, 2009, p. (8).
- Peng, X., *et al.* « IL-12 up-regulates CD40 ligand (CD154) expression on human T cells. » *J Immunol*, vol. 160, 1998, p. 1166–72.
- Pepper, M., *et al.* « Opposing Signals from the Bcl6 Transcription Factor and the Interleukin-2 Receptor Generate T Helper 1 Central and Effector Memory Cells. » *Immunity*, vol. 35, 2011, doi:10.1016/j.immuni.2011.09.009.
- Pereira, J. P., L. M. Kelly, Y. Xu, *et al.* « EB12 Mediates B Cell Segregation between the Outer and Centre Follicle. » *Nature*, vol. 7259, 2009, doi:10.1038/nature08226.
- Pereira, J. P., L. M. Kelly, and J. G. Cyster. « Finding the Right Niche: B-Cell Migration in the Early Phases of T-Dependent Antibody Responses ». *Int. Immunol.*, 2010.
- Perez, V. L., *et al.* « Induction of Peripheral T Cell Tolerance in Vivo Requires CTLA-4 Engagement. » *Immunity*, vol. 6, 1997, doi:10.1016/S1074-7613(00)80284-8.
- Pericle, F., *et al.* « An Efficient Th2-Type Memory Follows CD8+ Lymphocyte-Driven and Eosinophil-Mediated Rejection of a Spontaneous Mouse Mammary Adenocarcinoma Engineered to Release IL-4 ». *J Immunol*, 1994.
- Pettipher, R., *et al.* « Antagonism of the Prostaglandin D2 Receptors DP1 and CRTH2 as an Approach to Treat Allergic Diseases ». *Nat Rev Drug Discov*, vol. 6, 2007, p. 313–325.
- Pitzalis, C., *et al.* « Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. » *Nat. Rev. Immunol.* 14, 447–462, 2014.
- Pollard, J.W. « Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer ». *J. Leukoc. Biol.* 84, 623–630, 2008.
- Porakishvili, N., *et al.* « Expansion of CD4+ T Cells with a Cytotoxic Phenotype in Patients with B- chronic Lymphocytic Leukaemia (B- CLL). » *Clin Exp Immunol*, 2001.
- Powrie, F., *et al.* « Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo ». *Eur. J. Immunol*, vol. 23, 1993, p. 3043–3049.
- Price, A. E., *et al.* « Systemically Dispersed Innate IL-13-Expressing Cells in Type 2 Immunity ». *Proc Natl Acad Sci*, vol. 25, 2010, doi:10.1073/pnas.1003988107.

- Prokopchuk, O., *et al.* « Interleukin-4 Enhance Proliferation of Human Pancreatic Cancer Cells: Evidence for Autocrine and Paracrine Actions ». *Br J Cancer*, vol. 92, 2005, p. 921–928.
- Puri, R. K., *et al.* « Human Neurological Cancer Cells Express Interleukin-4 (IL-4) Receptors Which Are Targets for the Toxic Effects of IL4-Pseudomonas Exotoxin Chimeric Protein ». *Int J Cancer*, 1994.
- Purwar, R., *et al.* « Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells ». *Nat Med*, 2012.
- Puyo, S., *et al.* « From old alkylating agents to new minor groove binders ». *Crit. Rev. Oncol. Hematol*, vol. 89, 2014, p. 43–61.
- Pylayeva-Gupta, Y., *et al.* « IL35-Producing B Cells Promote the Development of Pancreatic Neoplasia ». *Cancer Discov*, vol. 6, 2016, p. 247–255.

Q

- Qi, H., *et al.* « SAP- controlled T- B cell interactions underlie germinal centre formation ». *Nature*, n° 455, 2008, p. 769.
- Qi, H., *et al.* « T Follicular Helper Cells in Space- time. » *Nat Rev Immunol*, 2016.
- Qiu, L. *et al.* « Functionally Impaired Follicular Helper T Cells Induce Regulatory B Cells and CD14+ Human Leukocyte Antigen- DR – Cell Differentiation in Non- small Cell Lung Cancer. » *Cancer Sci*, 2018.
- Qian, B.Z., and Pollard, J.W. « Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. » *Cell* 141, 39–51, 2010.
- Qian, B.Z., *et al.* « CCL2 Recruits Inflammatory Monocytes to Facilitate Breast-Tumour Metastasis ». *Nature*, 2011.
- Quante, M. *et al.* « Bone Marrow-Derived Myofibroblasts Contribute to the Mesenchymal Stem Cell Niche and Promote Tumor Growth ». *Cancer Cell*, 19(2), 257–272, 2011.
- Quivoron, C., *et al.* « TET2 Inactivation Results in Pleiotropic Hematopoietic Abnormalities in Mouse and Is a Recurrent Event during Human Lymphomagenesis. » *Cancer Cell*, 2011, doi:10.1016/j.ccr.2011.06.003.

R

- Radoja, S., and A. B. Frey. « Cancer-Induced Defective Cytotoxic T Lymphocyte Effector Function: Another Mechanism How Antigenic Tumors Escape Immune-Mediated Killing ». *Mol Med*, 2000, p. 6–6.
- Raible, D. G., *et al.* « Mast cell mediators prostaglandin-D2 and histamine activate human eosinophils ». *Journal of immunology*, vol. 148, 1992, p. 3536–3542.
- Ray, J. P., *et al.* « The Interleukin-2-MTORc1 Kinase Axis Defines the Signaling, Differentiation, and Metabolism of T Helper 1 and Follicular B Helper T Cells. » *Immunity*, vol. 43, 2015, doi:10.1016/j.immuni.2015.08.017.
- Raz, Y., *et al.* « Bone marrow-derived fibroblasts are a functionally distinct stromal cell population in breast cancer ». *Journal of Experimental Medicine*, 215(12), 3075–3093, 2018.
- Read, K. A., *et al.* « Integrated STAT3 and Ikaros Zinc Finger Transcription Factor Activities Regulate Bcl-6 Expression in CD4(+) Th Cells. » *J Immunol*, 2017.
- Read, K. A., *et al.* « In Vitro Differentiation of Effector CD4(+) T Helper Cell Subsets. » *Methods Mol Biol*, 2019.
- Reck, M., *et al.* « Phase III randomized trial of ipilimumab plus etoposide and platinum versus placebo plus etoposide and platinum in extensive-stage small-cell lung cancer ». *J Clin Oncol*, 2016.

- Rehman, H., *et al.* « Into the Clinic: Talimogene Laherparepvec (T-VEC), a First-in-Class Intratumoral Oncolytic Viral Therapy ». *J Immunother Cancer*, vol. 4, 2016, p. 53.
- Reif, K., *et al.* « Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B- cell position ». *Nature*, n° 416, 2002, p. 99.
- Ren, G., *et al.* « CCR2-dependent recruitment of macrophages by tumor-educated mesenchymal stromal cells promotes tumor development and is mimicked by TNF α ». *Cell Stem Cell*, 11(6), 812–824, 2012.
- Ren, Y., and Savill, J. « Apoptosis: The importance of being eaten ». *Cell Death Differ.* 5, 563–568, 1998.
- Reinhardt, R. L., *et al.* « Cytokine- secreting Follicular T Cells Shape the Antibody Repertoire ». *Nat Immunol*, n° 10, 2009, p. 393.
- Rhoads, C. P. « Nitrogen Mustards in the Treatment of Neoplastic Disease; Official Statement ». *J. Am. Med. Assoc*, vol. 131, 1946, p. 656–658.
- Ruhland, M. K. *et al.* « Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis ». *Nature Communications*, 7, 2016.
- Ribas, A. « Tumor immunotherapy directed at PD-1. » *N Engl J Med*, vol. 366, 2012, p. (26).
- Ribas, A., *et al.* « Phase I study combining anti-PD-L1 (MEDI4736) with BRAF (dabrafenib) and/or MEK (trametinib) inhibitors in advanced melanoma ». *J Clin Oncol*, 2015.
- Ribas, A., *et al.* « Hepatotoxicity with combination of vemurafenib and ipilimumab. » *N Engl J Med*, 2013.
- Richters, A., and C. L. Kaspersky. « Surface Immunoglobulin Positive Lymphocytes in Human Breast Cancer Tissue and Homolateral Axillary Lymph Nodes ». *Cancer*, vol. 35, 1975, p. 129–133.
- Rigoni, A., *et al.* « The Role of Mast Cells in Molding the Tumor Microenvironment. » *Cancer Microenviron.*, vol. 8, n° 167–76, 2015, p. 10–1007, doi:doi.
- Rivera, L. B., and G. Bergers. « CANCER. Tumor angiogenesis, from foe to friend. » *Science*, vol. 349, 2015, p. 694–95.
- Rizvi, N. A., *et al.* « Nivolumab in Combination with Platinum-Based Doublet Chemotherapy for First-Line Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer ». *J Clin Oncol*, vol. 34, 2016, p. (25).
- Robinette, M.L., *et al.* « Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets ». *Nat. Immunol.* 16, 306–317, 2015.
- Roca, H. « IL-4 Induces Proliferation in Prostate Cancer PC3 Cells under Nutrient-Depletion Stress through the Activation of the JNK-Pathway and Survivin up-Regulation ». *J. Cell. Biochem*, vol. 113, 2012, p. 1569–1580.
- Roca, H. *et al.* « CCL2 and Interleukin-6 Promote Survival of Human CD11b+ Peripheral Blood Mononuclear Cells and Induce M2-type Macrophage Polarization ». *J. Biol. Chem*, 2009
- Rolf, J., *et al.* « SOM-Phosphoinositide 3-kinase activity in T cells regulates the magnitude of the germinal center reaction. » *J Immunol*, vol. 185, 2010, p. 4042–4052.
- Rosenberg, S. A., *et al.* « A New Approach to the Adoptive Immunotherapy of Cancer with Tumor-Infiltrating Lymphocytes ». *Science*, vol. 233, 1986, p. 1318–1321.
- Rößner, S., *et al.* « Myeloid Dendritic Cell Precursors Generated from Bone Marrow Suppress T Cell Responses via Cell Contact and Nitric Oxide Production in Vitro ». *Eur J Immunol*, vol. 35, 2005.
- Roth, F. « Aptamer-Mediated Blockade of IL4R α Triggers Apoptosis of MDSCs and Limits Tumor Progression ». *Cancer Res*, vol. 72, 2012, p. 1373–1383.
- Rudd, C. E., *et al.* « CD28 and CTLA-4 Coreceptor Expression and Signal Transduction ». *Immunological Reviews*, vol. 229, n° 1, 2009, p. 12–26.

- Rudin, C. M., *et al.* « Rovalpituzumab Tesirine, a DLL3-Targeted Antibody-Drug Conjugate, in Recurrent Small-Cell Lung Cancer: A First-in Human, First-in-Class, Open-Label, Phase 1 Study ». *Lancet Oncol*, 2017, p. 42–51.
- Ryder, M., *et al.* « Increased Density of Tumor-associated Macrophages Is Associated with Decreased Survival in Advanced Thyroid Cancer ». *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 15, 2008, p. 1069–74.

S

- Saenz, S. A., *et al.* « IL25 Elicits a Multipotent Progenitor Cell Population That Promotes T(H)2 Cytokine Responses. » *Nature*, vol. 7293, 2010, doi:10.1038/nature08901.
- Sad, S. Marcotte R., & Mosmann T.R. « Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. » *Immunity*, 2, pp. 271-279, 1995.
- Sage, P. T., D. Alvarez, *et al.* « Circulating T Follicular Regulatory and Helper Cells Have Memory-like Properties ». *J Clin Invest*, vol. 124, 2014, p. 5191–204, doi:doi:10.1172/JCI76861.
- Sage, P. T., C. L. Tan, *et al.* « Defective TFH Cell Function and Increased TFR Cells Contribute to Defective Antibody Production in Aging ». *Cell Rep*, vol. 12, 2015, p. 163–71, doi:doi:10.1016/j.celrep.2015.06.015.
- Sage, P. T., L. M. Francisco, *et al.* « The Receptor PD-1 Controls Follicular Regulatory T Cells in the Lymph Nodes and Blood. » *Nat Immunol*, vol. 14, 2013, doi:10.1038/ni.2496.
- Sage, P. T., and A. H. Sharpe. « T follicular regulatory cells. » *Immunol Rev*, 2016, doi:10.1111/imr.12411.
- Sahoo, A., *et al.* « Batf is important for IL-4 expression in T follicular helper cells ». *Nat Commun*, 2015.
- Sakaguchi, S., *et al.* « Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. » *Immunol Rev*, 2006.
- Sakuishi, K., *et al.* « Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. » *J Exp Med*, vol. 207, n° 10, 2010, p. 2187–94.
- Salek-Ardakani, S., *et al.* « B cell-specific expression of B7-2 is required for follicular Th cell function in response to vaccinia virus. » *J Immunol*, vol. 186, 2011, p. 5294–303, doi:doi:10.4049/jimmunol.1100406.
- Sanos, S. L., *et al.* « ROR γ t and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells ». *Nat Immunol*, 2009, doi:Jan;10(1):83-91. doi.
- Sasaki, K., *et al.* « IL- 4 Suppresses Very Late Antigen- 4 Expression Which Is Required for Therapeutic Th1 T- cell Trafficking into Tumors ». *J Immunother Hagerstown Md*, 1997.
- Satoh-Takayama, Naoko, *et al.* « IL-15 Independently Program the Differentiation of Intestinal CD3–NKp46+ Cell Subsets from Id2-Dependent Precursors ». *J Exp Med*, vol. 2, n° 273-80, février 2010, doi:doi: 10.1084/jem.20092029. Epub.
- Satoh-Takayama, N., *et al.* « Microbial Flora Drives Interleukin 22 Production in Intestinal NKp46+ Cells that Provide Innate Mucosal Immune Defense ». *Immunity* 29, 958–970, 2008.
- Sato, E., *et al.* « Intraepithelial CD8+ Tumor-infiltrating Lymphocytes and a High CD8+/Regulatory T Cell Ratio Are Associated with Favorable Prognosis Ovarian Cancer. » *Proc Natl Acad Sci*, 2005.
- Savill, J., and Fadok, V. « Corpse clearance defines the meaning of cell death. » *Nature* 407, 784–788, 2000.
- Sawa-Wejksza, K., and Kandefer-Szerszeń, M. « Tumor-Associated Macrophages as Target for Antitumor Therapy. » *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 66, 97–111, 2018.

- Schaerli, P., *et al.* « CXC Chemokine Receptor 5 Expression Defines Follicular Homing T Cells with B Cell Helper Function ». *J Exp Med*, 2000, doi:doi:10.1084/jem.192.11.1553.
- Shi, J.Y., *et al.* « Margin-infiltrating CD20+ B cells display an atypical memory phenotype and correlate with favorable prognosis in hepatocellular carcinoma. » *Clin. Cancer Res.* 19, 5994–6005, 2013.
- Shi, W., *et al.* « Follicular Helper T Cells Promote the Effector Functions of CD8(+) T Cells via the Provision of IL-21, Which Is Downregulated Due to PD-1/PD-L1-Mediated Suppression in Colorectal Cancer ». *Exp Cell Res*, vol. 372, 2018, p. 35–42.
- Schioppa, T., *et al.* « B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- α during squamous carcinogenesis. » *Proc Natl Acad Sci*, 2011.
- Shirota, H., *et al.* « IL4 from T Follicular Helper Cells Downregulates Antitumor Immunity ». *Cancer Immunology Research*, vol. 5, 2017, p. 61–71.
- Schmitt, N., R. Morita, *et al.* « Human Dendritic Cells Induce the Differentiation of Interleukin-21-Producing T Follicular Helper-like Cells through Interleukin-12. » *Immunity*, vol. 31, 2009.
- Schmitt, N., S. E. Bentebibel, *et al.* « Phenotype and Functions of Memory Tfh Cells in Human Blood ». *Trends Immunol*, vol. 2014, juillet 2014.
- Schmitt, N., Y. Liu, *et al.* « The Cytokine TGF- β Co-opts Signaling via STAT3-STAT4 to Promote the Differentiation of Human TFH Cells. » *Nat Immunol*, vol. 15, 2014, doi:10.1038/ni.2947.
- Schraml, B. U., *et al.* « The AP-1 Transcription Factor Batf Controls T(H)17 Differentiation ». *Nature*, vol. 460, 2009.
- Schreck, S., *et al.* « Prognostic Impact of Tumour-infiltrating Th2 and Regulatory T Cells in Classical Hodgkin Lymphoma ». *Hematol Oncol*, n° 27, 2009, p. 39.
- Schreiber, R. D., *et al.* « Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion ». *Science*, vol. 6024, n° 1565-70, mars 2011, doi:doi:10.1126/science.1203486.
- Schumacher, K., *et al.* « Prognostic Significance of Activated CD8+ T Cell Infiltrations within Esophageal Carcinomas ». *Cancer Res*, vol. 2001, n° 61, 2001, p. 3936.
- Schwickert, T. A., G. D. Victora, D. R. Fooksman, A. O. Kamphorst, M. R. Mugnier, A. D. Gitlin, *et al.* « A Dynamic T Cell-Limited Checkpoint Regulates Affinity-Dependent B Cell Entry into the Germinal Center ». *J Exp Med*, vol. 208, 2011, p. 1243–1252.
- Schwickert, T. A., G. D. Victora, D. R. Fooksman, A. O. Kamphorst, M. R. Mugnier, and A. D. Gitlin. « T Cell-Limited Checkpoint Regulates Affinity-Dependent B Cell Entry into the Germinal Center ». *J Exp Med*, vol. 208, 2011, p. 1243–52.
- Semenza, G. L. « The Hypoxic Tumor Microenvironment: A Driving Force for Breast Cancer Progression. » *Biochim Biophys Acta*, vol. 1863, 2016.
- Serre, K., *et al.* « Selective Effects of NF- κ B1 Deficiency in CD4(+) T Cells on Th2 and TFh Induction by Alum-Precipitated Protein Vaccines ». *Eur J Immunol*, vol. 41, 2011, p. 1573–82.
- Servais, C., & Erez, N. « From sentinel cells to inflammatory culprits: Cancer-associated fibroblasts in tumour-related inflammation ». *Journal of Pathology*, Vol. 229, pp. 198–207, 2013.
- Shankaran, V., *et al.* « IFN γ Lymphocytes Prevent Primary Tumour Development and Shape Tumour Immunogenicity. » *Nature*, 2001.
- Sharma, P., *et al.* « CD8 Tumor-infiltrating Lymphocytes Are Predictive of Survival in Muscle-invasive Urothelial Carcinoma. » *Proc Natl Acad Sci*, 2007, p. 3972.
- Sharon, Y., *et al.* « Tumor-derived osteopontin reprograms normal mammary fibroblasts to promote inflammation and tumor growth in breast cancer ». *Cancer Research*, 75(6), 963–973, 2015.

- Shaverdian, N., *et al.* « Previous radiotherapy and the clinical activity and toxicity of pembrolizumab in the treatment of non-small-cell lung cancer: a secondary analysis of the KEYNOTE-001 phase 1 trial ». *Lancet Oncol*, 2017.
- Sheu B.C., *et al.* « Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer ». *J Immunol*. 167(5):2972-8, 2001.
- Shi, J., *et al.* « PD- 1 Controls Follicular T Helper Cell Positioning and Function ». *Immunity*, n° 49, 2018, p. 274.
- Shi, W., *et al.* « Dysregulation of Circulating Follicular Helper T Cells in Nonsmall Cell Lung Cancer ». *DNA Cell Biol*, vol. 33, 2014.
- Shimamura, T., *et al.* « Interleukin-4 Cytotoxin Therapy Synergizes with Gemcitabine in a Mouse Model of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. » *Cancer Res*, vol. 67, 2007.
- Shin, C., *et al.* « CD8alpha(-) dendritic cells induce antigen- specific T follicular helper cells generating efficient humoral immune responses ». *Cell Rep*, 2015, p. 11.
- Shulman, Z., A. D. Gitlin, and J. S. Weinstein. « Dynamic Signaling by T Follicular Helper Cells during Germinal Center B Cell Selection ». *Science*, n° 345, 2014, p. 1058.
- Shulman, Z., A. D. Gitlin, and S. Targ. « T follicular helper cell dynamics in germinal centers ». *Science*, n° 341, 2013, p. 677.
- Shulman, Z., *et al.* « Lymphocyte Crawling and Transendothelial Migration Require Chemokine Triggering of High-Affinity LFA-1 Integrin ». *Immunity* 30, 384–396, 2009.
- Sica, A., and A. Mantovani. « Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas ». *J. Clin. Invest*, vol. 122, 2012, p. 787–795.
- Simpson, N., *et al.* « Expansion of Circulating T Cells Resembling Follicular Helper T Cells Is a Fixed Phenotype That Identifies a Subset of Severe Systemic Lupus Erythematosus ». *Arthritis Rheum*, n° 62, 2010, p. 244.
- Singer, K., *et al.* « Immunometabolism in Cancer at a Glance. » *Dis Model Mech*, vol. 2, 2018, doi:10.1242/dmm.034272.
- Sinicrope, F. A., *et al.* « Intraepithelial Effector (CD3+)/Regulatory (FoxP3+) T- cell Ratio Predicts a Clinical Outcome of Human Colon Carcinoma ». *Gastroenterology*, n° 137, 2009, p. 1270.
- Sionov, R. V., *et al.* « The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. » *Cancer Microenviron*, vol. 8, 2015, p. 125–58.
- Slager, E. H., *et al.* « CD4+ Th2 cell recognition of HLA-DR-restricted epitopes derived from CAMEL: a tumor antigen translated in an alternative open reading frame ». *J Immunol*, 2003.
- Smith, H. A., and Y. Kang. « The Metastasis-Promoting Roles of Tumour-Associated Immune Cells ». *J Mol Med Berl Ger*, vol. 91, 2013, p. 411–29.
- So, T., *et al.* « OX40 Complexes with Phosphoinositide 3- kinase and Protein Kinase B (PKB) to Augment TCR- dependent PKB Signaling ». *J Immunol*, n° 186, 2011, p. 3555.
- Solinas, G., *et al.* « Tumor-Conditioned Macrophages Secrete Migration-Stimulating Factor: A New Marker for M2-Polarization, Influencing Tumor Cell Motility ». *J. Immunol*, vol. 185, 2010, p. 642–52.
- Song, J., *et al.* « Sustained Survivin Expression from OX40 Costimulatory Signals Drives T Cell Clonal Expansion ». *Immunity*, n° 22, 2005, p. 631.
- Spits, H., and Di Santo, J.P. (2011). « The expanding family of innate lymphoid cells: Regulators and effectors of immunity and tissue remodeling ». *Nat. Immunol*. 12, 21–27, 2011.
- Spits, H., *et al.* « Innate Lymphoid Cells – a Proposal for Uniform Nomenclature ». *Nat Rev Immunol*, 2013, doi:Feb;13(2):145-9. doi: 10.1038/nri3365.
- Staudt, V., *et al.* « Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells.». *Immunity*, 2010.

- Stauss, D., *et al.* « The Transcriptional Coactivator Bob1 Promotes the Development of Follicular T Helper Cells via Bcl6 ». *EMBO J*, vol. 35, 2016.
- Stephens, G. L., *et al.* « Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells ». *J Immunol*, vol. 173, 2004, p. 5008–20, doi:doi:10.4049/jimmunol.173.8.5008.
- Stinson, S. E., Amrani, Y. & Brightling, C. E. « D prostanoid receptor 2 (chemoattractant receptor homologous molecule expressed on TH2 cells) protein expression in asthmatic patients and its effects on bronchial epithelial cells ». *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 395–406, 2015.
- Stone, E. L., *et al.* « ICOS Coreceptor Signaling Inactivates the Transcription Factor FOXO1 to Promote Tfh Cell Differentiation. » *Immunity*, vol. 42, 2015, doi:10.1016/j.immuni.2015.01.017.
- Stoppacciaro, A., *et al.* « Genetic Modification of a Carcinoma with the IL-4 Gene Increases the Influx of Dendritic Cells Relative to Other Cytokines. » *Eur J Immunol*, 1997.
- Stremmel, C., *et al.* « B7-2 expressed on EL4 lymphoma suppresses antitumor immunity by an interleukin 4-dependent mechanism ». *J Exp Med*, 1999.
- Stutman, O. « Chemical Carcinogenesis in Nude Mice: Comparison between Nude Mice from Homozygous and Heterozygous Matings and Effect of Age and Carcinogen Dose ». *J. Natl. Cancer Inst*, vol. 2, 1979, p. 353–58.
- Stutman, O. « Spontaneous, Viral, and Chemically Induced Tumors in the Nude Mouse ». *The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research. 1st Edition*, Fogh J., Giovanella B.C., 1978, p. 411–35.
- Stutman, O. « Tumor Development after 3-Methylcholanthrene in Immunologically Deficient Athymic-Nude Mice ». *Science*, vol. 183, 1974, p. 534–36.
- Stutman, O. « Tumor Development in Immunologically Deficient Nude Mice after Exposure to Chemical Carcinogens. » *Contemporary Topics in Immunobiology, Volume 11*, vol. 1, Rygaard J., Povlsen C.D., 1973.
- Suan, D., *et al.* « T Follicular Helper Cells Have Distinct Modes of Migration and Molecular Signatures in Naive and Memory Immune Responses. » *Immunity*, 2015.

T

- Tan, K. L., *et al.* « Tumor-Associated Macrophages Predict Inferior Outcomes in Classic Hodgkin Lymphoma: A Correlative Study from the E2496 Intergroup Trial ». *Blood*, 2012.
- Tanaka, S., *et al.* « The Interleukin-4 Enhancer CNS-2 Is Regulated by Notch Signals and Controls Initial Expression in NKT Cells and Memory-Type CD4 T Cells. » *Immunity*, vol. 24, 2006.
- Tang, C., *et al.* « Ipilimumab with stereotactic ablative radiation therapy: phase I results and immunologic correlates from peripheral T cells ». *Clin Cancer Res*, 2017.
- Tang Y., *et al.* « Antigen-specific effector CD8 T cells regulate allergic responses via IFN-gamma and dendritic cell function ». *J Allergy Clin Immunol* 129(1611–1620):e4, 2012.
- Tangye, S.G., *et al.* « The good, the bad and the ugly — TFH cells in human health and disease. » *Nat Rev Immunol*, 2013.
- Tao, H., *et al.* « Prognostic Potential of FOXP3 Expression in Non- small Cell Lung Cancer Cells Combined with Tumor- infiltrating Regulatory T Cells ». *Lung Cancer*, n° 75, 2012, p. 101.
- Tatsumi, H., *et al.* « Surgical influence on TH1/TH2 balance and monocyte surface antigen expression and its relation to infectious complications. ». *World J Surg*, 2003.
- Tatsumi, T., *et al.* « Disease-associated Bias in T Helper Type 1 (Th1)/Th2 CD4+ T Cell Responses against MAGE-6 in HLA-DRB10401+ Patients with Renal Cell Carcinoma or

- Melanoma.T Cell Responses against MAGE-6 in HLA-DRB10401+ Patients with Renal Cell Carcinoma or Melanoma ». *J Exp Med*, n° 196, 2002, p. 628.
- Tauriello DVF, *et al.* « TGFbeta drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis ». *Nature*. 554:538–43, 2018.
- Taylor, R. *et al.* « Ex vivo antibody-dependent cellular cytotoxicity inducibility predicts efficacy of cetuximab ». *Cancer Immunology Research*, 3(5), 567–574, 2015.
- Tepper, R. I., *et al.* « An eosinophil- dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin- 4 ». *Science*, n° 257, 1992, p. 551.
- Théry, C., Ostrowski, M., and Segura, E. « Membrane vesicles as conveyors of immune responses ». *Nat. Rev. Immunol.* 9, 581–593, 2009
- Thiersch, J. B. « Bone-Marrow Changes in Man after Treatment with Aminopterin, Amethopterin, and Aminoanfol; with Special Reference to Megaloblastosis and Tumor Remission ». *Cancer*, vol. 2, 1949, p. 877–883.
- Thomas, L. « Discussion. In Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States ». *Hoeber-Harper*, édité par H.S. Lawrence, Hoeber-Harper, Lawrence H.S., 1959.
- Thomas, L. « On immunosurveillance in human cancer ». *Yale J. Biol Med*, 1982, p. 55–3.
- Tivol, E. A., *et al.* « Loss of CTLA-4 Leads to Massive Lymphoproliferation and Fatal Multiorgan Tissue Destruction, Revealing a Critical Negative Regulatory Role of CTLA-4 ». *Immunity*, vol. 3, 1995, doi:10.1016/1074-7613(95)90125-6.
- Tiwari, M. « Antimetabolites: Established Cancer Therapy ». *J. Cancer Res. Ther*, vol. 8, 2012, p. 510–519.
- Todaro, M., Y. Lombardo, *et al.* « Apoptosis Resistance in Epithelial Tumors Is Mediated by Tumor-Cell-Derived Interleukin-4. » *Cell Death Diff*, vol. 15, 2008.
- Todaro, M., M. Zerilli, *et al.* « Autocrine Production of Interleukin-4 and Interleukin-10 Is Required for Survival and Growth of Thyroid Cancer Cells. » *Cancer Res*, vol. 66, 2006.
- Toellner, K. M., *et al.* « Th2 Characteristics Start to Develop during T Cell Priming and Are Associated with an Immediate Ability to Induce Immunoglobulin Class Switching ». *J Exp Med*, n° 187, 1998, p. 1193.
- Topalian, S. L., *et al.* « Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy ». *Cancer Cell*, 2015.
- Torroella-Kouri, M. « Identification of a Subpopulation of Macrophages in Mammary Tumor-Bearing Mice That Are Neither M1 nor M2 and Are Less Differentiated. » *Cancer Res*, vol. 69, 2009.
- Tosolini, M., *et al.* « Clinical Impact of Different Classes of Infiltrating T Cytotoxic and Helper Cells ». *Cancer Res*, n° 71, 2011, p. 1263.
- Trabanelli S., *et al.* « Tumour-derived PGD2 and NKp30-B7H6 engagement drives an immunosuppressive ILC2-MDSC axis ». *Nat Commun.* 8(1):593, 2017.
- Trinchieri, G., *et al.* « The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. ». *Immunity*, 2003.
- Tsuchikama, K., and Z. An. « Antibody-Drug Conjugates: Recent Advances in Conjugation and Linker Chemistries ». *Protein Cell*, vol. 9, 2018, p. (1).
- Tsuji, M., *et al.* « Preferential Generation of Follicular B Helper T Cells from Foxp3+ T Cells in Gut Peyer's Patches ». *Science*, n° 323, 2009, p. 1488.
- Tzankov, A., *et al.* « Correlation of High Numbers of Intratumoral FOXP3+ Regulatory T Cells with Improved Survival in Germinal Center- like Diffuse Large B- cell Lymphoma, Follicular Lymphoma and Classical Hodgkin's Lymphoma. » *Haematologica*, 2008.

U

- Ubukata, H., *et al.* « Evaluations of Interferon- γ /Interleukin- 4 Ratio and Neutrophil/Lymphocyte Ratio as Prognostic Indicators in Gastric Cancer Patients ». *J Surg Oncol*, n° 102, 2010, p. 747.

- Umemura, N., *et al.* « Tumor-Infiltrating Myeloid-Derived Suppressor Cells Are Pleiotropic-Inflamed Monocytes/Macrophages That Bear M1- and M2-Type Characteristics ». *J Leukoc Biol*, vol. 83, 2008, p. 1136–44, doi:doi: 10.1189/jlb.0907611.
- Uno, T., *et al.* « Eradication of Established Tumors in Mice by a Combination Antibody-Based Therapy ». *Nat Med*, n° 12, 2006, p. 6–693.

V

- Vaeth, M., *et al.* « Follicular Regulatory T Cells Control Humoral Autoimmunity via NFAT2-Regulated CXCR5 Expression. » *J Exp Med*, vol. 211, 2014.
- Van Niel, G., D'Angelo, G., and Raposo, G. « Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. » *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 213–228, 2018.
- van Vuuren, R. J., *et al.* « Antimitotic Drugs in the Treatment of Cancer ». *Cancer Chemother. Pharmacol*, vol. 76, 2015, p. 1101–1112.
- Varricchi, G., *et al.* « T follicular helper (Tfh) cells in normal immune responses and in allergic disorders ». *Allergy*, 2016.
- Velu, V., *et al.* « Enhancing SIV-Specific Immunity in Vivo by PD-1 Blockade. » *Nature*, vol. 458, 2009, doi:10.1038/nature07662.
- Verma, C. « Abnormal T Regulatory Cells (Tregs: FOXP3+, CTLA-4+), Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs: Monocytic, Granulocytic) and Polarised T Helper Cell Profiles (Th1, Th2, Th17) in Women with Large and Locally Advanced Breast Cancers Undergoing Neoadjuvant Chemotherapy (NAC) and Surgery: Failure of Abolition of Abnormal Treg Profile with Treatment and Correlation of Treg Levels with Pathological Response to NAC. » *J. Transl. Med*, vol. 11, 2013.
- Verma, S., *et al.* « Trastuzumab Emtansine for HER2 Positive Advanced Breast ». *Cancer. N Engl J Med*, vol. 367, 2012, p. 1783–1791.
- Vesalainen, S., *et al.* « Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma ». *Eur J Cancer Oxf Engl*, 1990.
- Vesely, M.D., *et al.* « Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer ». *Annu. Rev. Immunol.*, 2011
- Vicari, A. P., and C. Caux. « Chemokines in Cancer. » *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 13, 2002.
- Victoria, G. D., T. A. Schwickert, *et al.* « Germinal Center Dynamics Revealed by Multiphoton Microscopy with a Photoactivatable Fluorescent Reporter ». *Cell*, vol. 143, 2010, p. 592–605.
- Victoria, G. D., D. Dominguez-Sola, *et al.* « Identification of Human Germinal Center Light and Dark Zone Cells and Their Relationship to Human B-Cell Lymphomas. » *Blood*, vol. 120, 2012.
- Victoria, G. D., and M. C. Nussenzweig. « Germinal centers. » *Annu Rev Immunol*, vol. 30, 2012.
- Vijayanand, P., *et al.* « Interleukin-4 Production by Follicular Helper T Cells Requires the Conserved Il4 Enhancer Hypersensitivity Site V. » *Immunity*, vol. 36, 2012.
- Villadangos, J. A., and P. Schnorrer. « Intrinsic and Cooperative Antigen-Presenting Functions of Dendritic-Cell Subsets in Vivo ». *Nat Rev Immunol*, 2007, p. 7–7.
- Vinuesa, C. G., M. C. Cook, *et al.* « A RING-Type Ubiquitin Ligase Family Member Required to Repress Follicular Helper T Cells and Autoimmunity. » *Nature*, vol. 435, 2005, doi:10.1038/nature03555.
- Vinuesa, C. G., S. G. Tangye, *et al.* « Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. » *Nat Rev Immunol*, vol. 5, 2005.
- Vinuesa, C. G., M. A. Linterman, *et al.* « Follicular helper T cells. » *Annu Rev Immunol*, vol. 34, 2016,

- Virchow, R. « Cellular pathology as based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1858. » *Nutr Rev*, 1989.
- Vizler C., et al. « Relative diabetogenic properties of islet-specific Tc1 and Tc2 cells in immunocompetent hosts. » *J Immunol* 165:6314–6321, 2000.
- Vogelzang, A., et al. « A Fundamental Role for Interleukin-21 in the Generation of T Follicular Helper Cells. » *Immunity*, vol. 29, 2008, doi:10.1016/j.immuni.2008.06.001.
- Vonarbourg, C., et al. « Regulated expression of nuclear receptor ROR γ t confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing ROR γ t+ innate lymphocytes. » *Immunity* 33, 736–751, 2010.
- Vonderheide, R. H., and M. J. Glennie. « Agonistic CD40 Antibodies and Cancer Therapy. » *Clin Cancer Res*, 2013.
- Vose, B. M., et al. « Natural Cytotoxicity in Man: Activity of Lymph Node and Tumor-Infiltrating Lymphocytes ». *Eur. J. Immunol*, vol. 7, 1977, p. 353–357.
- Vose, B. M., and M. Moore. « Human Tumor-Infiltrating Lymphocytes: A Marker of Host Response ». *Semin. Hematol*, vol. 22, 1985, p. 27–40.
- Voskoboinik, I., et al. « Perforin-Mediated Target-Cell Death and Immune Homeostasis ». *Nat Rev Immunol*, vol. 6, 2006, p. 940–952.

W

- Wada, Y., et al. « Clinicopathological Study on Hepatocellular Carcinoma with Lymphocytic Infiltration. » *Hepatol Baltim Md*, vol. 27, 1998.
- Wagtmann, N., et al. « Molecular Clones of the P58 NK Cell Receptor Reveal Immunoglobulin-Related Molecules with Diversity in Both the Extra- and Intracellular Domains. » *Immunity*, vol. 2, 1995, p. 439–449.
- Waight, J. D., et al. « Myeloid-Derived Suppressor Cell Development Is Regulated by a STAT/IRF-8 Axis ». *J Clin Invest*, vol. 123, 2013, p. 4464–78.
- Wali, S., et al. « Insights into the Development and Regulation of T Follicular Helper Cells. » *Cytokine*, vol. 87, 2016, doi:10.1016/j.cyto.2016.06.010.
- Walunas, T. L., et al. « CTLA-4 Can Function as a Negative Regulator of T Cell Activation. » *Immunity*, vol. 1, 1994, doi:10.1016/1074-7613(94)90071-X.
- Wang, C. J., et al. « CTLA-4 Controls Follicular Helper T-Cell Differentiation by Regulating the Strength of CD28 Engagement. » *Proc Natl Acad Sci*, vol. 112, 2015, p. 524–9, doi:10.1073/pnas.1414576112.
- Wang, H., et al. « The Transcription Factor Foxp1 Is a Critical Negative Regulator of the Differentiation of Follicular Helper T Cells. » *Nat Immunol*, vol. 15, 2014.
- Wang, R., et al. « The Transcription Factor Myc Controls Metabolic Reprogramming upon T Lymphocyte Activation ». *Immunity*, n° 35, 2011, p. 882.
- Wang, S. S., et al. « Tumor-infiltrating B cells: their role and application in anti-tumor immunity in lung cancer. » *Cell. Mol. Immunol.* 16, 6–18, 2019.
- Wang, Y., et al. « The Transcription Factors T-Bet and Runx Are Required for the Ontogeny of Pathogenic Interferon- γ -Producing T Helper 17 Cells. » *Immunity*, 2014.
- Wang, Z., et al. « Circulating Follicular Helper T Cells in Crohn's Disease (CD) and CD-Associated Colorectal Cancer. » *Tumour Biol*, vol. 35, 2014.
- Wang, S., et al. « Regulatory Innate Lymphoid Cells Control Innate Intestinal Inflammation. » *Cell* 171, 201–216.e18, 2017.
- Warburg, O. « On the Origin of Cancer Cells ». *Science*, vol. 3191, n° 309-14, février 1956.
- Ward, S. T., et al. « The Effects of CCR5 Inhibition on Regulatory T- cell Recruitment to Colorectal Cancer ». *Br J Cancer*, n° 112, 2015, p. 328.
- Watanabe, N., et al. « BTLA Is a Lymphocyte Inhibitory Receptor with Similarities to CTLA-4 and PD-1. » *Nat Immunol.*, vol. 8, 2003.

- Weaver, C.T., et al. «Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties ». *Immunity*, 2006
- Weber, B. N., et al. « A Critical Role for TCF-1 in T-Lineage Specification and Differentiation ». *Nature*, vol. 476, 2011.
- Weber, J. P., et al. «ICOS Maintains the T Follicular Helper Cell Phenotype by Down-Regulating Kruppel-like Factor 2». *J Exp Med*, vol. 212, 2015, p. 217–33, doi:doi:10.1084/jem.20141432.
- Wei, Y., et al. « The Combination of Curcumin and 5-Fluorouracil in Cancer Therapy ». *Arch. Pharm. Res*, vol. 41, 2018, p. 1–13.
- Weinreich, M. A., et al. «KLF2 Transcription-Factor Deficiency in T Cells Results in Unrestrained Cytokine Production and Upregulation of Bystander Chemokine Receptors ». *Immunity*, vol. 31, 2009.
- Weinstein, J. S., et al. « B cells in T follicular helper cell development and function: separable roles in delivery of ICOS ligand and antigen ». *J Immunol*, n° 192, 2014, p. 3179.
- Weinstein, J. S., et al. «TFH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response ». *Nat Immunol*, vol. 2016, août 2016, doi:Oct;17(10):1197-1205. doi: 10.1038/ni.3554. Epub.
- Weinstein, J. S. et al. « STAT4 and T- bet Control Follicular Helper T Cell Development in Viral Infections ». *J Exp Med*, n° 215, 2018, p. 355.
- Weinstein, J. S. et al. « T Cells That Promote B-Cell Maturation in Systemic Autoimmunity ». *Immunol Rev*, vol. 247, 2012.
- Wiemann, B., and C. O. Starnes. «Coley's Toxins, Tumor Necrosis Factor and Cancer Research: A Historical Perspective ». *Pharmacol Ther*, vol. 3, n° 529-64, 1994.
- Weiss, G.J., et al. « A phase Ib study of pembrolizumab plus chemotherapy in patients with advanced cancer (PembroPlus) ». *Br J Cancer*, 2017.
- Wing, K., et al. « CTLA-4 Control over Foxp3+ Regulatory T Cell Function ». *Science*, vol. 322, 2008, doi:10.1126/science.1160062.
- Wise, G. J., et al. « Cytokine Variations in Patients with Hormone Treated Prostate Cancer ». *J. Urol*, vol. 164, 2000, p. 722–725.
- Wollenberg, I., et al. « Regulation of the Germinal Center Reaction by Foxp3+ Follicular Regulatory T Cells ». *J Immunol*, n° 187, 2011, p. 4560.
- Woo, J. R., et al. « Tumor infiltrating B-cells are increased in prostate cancer tissue. » *J Transl Med*, vol. 12, 2014, p. 30.
- Woo, S. R., et al. « Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. » *Cancer Res*, vol. 72, n° 4, 2012, p. 917–27.
- Woo, Turnis, SR, et al. « Immune Inhibitory Molecules LAG-3 and PD-1 Synergistically Regulate T-Cell Function to Promote Tumoral Immune Escape ». *Cancer Res*, vol. 72, 2012, p. (4).
- Woolf, E., et al. « Lymph node chemokines promote sustained T lymphocyte motility without triggering stable integrin adhesiveness in the absence of shear forces ». *Nat. Immunol.* 8, 1076–1085, 2007.
- Wu, J., et al. « Blinatumomab: A Bispecific T Cell Engager (BiTE) Antibody against CD19/CD3 for Refractory Acute Lymphoid Leukemia ». *J Hematol Oncol*, vol. 8, 2015, p. 104.
- Wu, T., et al. « TCF1 Is Required for the T Follicular Helper Cell Response to Viral Infection ». *Cell Rep*, vol. 12, 2015.
- Wu, X., et al. « Increased Circulating Follicular Regulatory T-Like Cells May Play a Critical Role in Chronic Hepatitis B Virus Infection and Disease Progression ». *Viral Immunol*, 2018.

Wurster, A. L., *et al.* « Interleukin- 4- mediated Protection of Primary B Cells from Apoptosis through Stat6- dependent Up- regulation of Bcl- xL. » *J Biol Chem*, n° 277, 2002, p. 27175.

Wyckoff, J., *et al.* « A Paracrine Loop between Tumor Cells and Macrophages Is Required for Tumor Cell Migration in Mammary Tumors ». *Cancer Res*, vol. 64, 2004, p. 7022–29.

X

Xiao, N., *et al.* « The E3 Ubiquitin Ligase Itch Is Required for the Differentiation of Follicular Helper T Cells. » *Nat Immunol*, vol. 15, 2014.

Xing, F., *et al.* « Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment ». *Front Biosci*, 2010.

Xu, H., *et al.* « Follicular T- helper Cell Recruitment Governed by Bystander B Cells and ICOS- driven Motility ». *Nature*, n° 496, 2013, p. 527.

Xu, J., *et al.* « Mice Deficient for the CD40 Ligand. » *Immunity*, vol. 1, 1994.

Xu, L., *et al.* « The Transcription Factor TCF-1 Initiates the Differentiation of T(FH) Cells during Acute Viral Infection. » *Nat Immunol*, vol. 16, 2015.

Xu, X., *et al.* « Expression of Th1- Th2- and Th17- associated Cytokines in Laryngeal Carcinoma. » *Oncol Lett*, 2016, p. 1941.

Y

Yamazaki, N., *et al.* « Phase II study of the immune-checkpoint inhibitor ipilimumab plus dacarbazine in Japanese patients with previously untreated, unresectable or metastatic melanoma ». *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015.

Yan, H., *et al.* « Plexin B2 and Semaphorin 4C guide T cell recruitment and function in the germinal center. » *Cell Rep*, 2017.

Yáñez-Mó, M., *et al.* « Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. » *J. Extracell. Vesicles* 4, 1–60, 2015.

Yang, C., *et al.* « Prognostic Significance of B-Cells and PSTAT3 in Patients with Ovarian Cancer. » *PLoS One*, vol. 8, 2013, p. 54029.

Yang, J., *et al.* « Critical roles of mTOR Complex 1 and 2 for T follicular helper cell differentiation and germinal center responses ». *Elife*, n° 5, 2016, p. 17936.

Yang, X., *et al.* « FAP Promotes immunosuppression by cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment via STAT3-CCL2 Signaling ». *Cancer Research*, 76(14), 2016.

Yoshimura, T., *et al.* « Discovery of IL-8/CXCL8 (The Story from Frederick) ». *Front Immunol*. 2015.

Yoon, N. K., *et al.* « Higher Levels of GATA3 Predict Better Survival in Women with Breast Cancer ». *Hum Pathol*, n° 41, 2010, p. 1794.

Yron, I., *et al.* « In Vitro Growth of Murine T Cells. V. The Isolation and Growth of Lymphoid Cells Infiltrating Syngeneic Solid Tumors ». *J. Immunol*, vol. 125, 1980, p. 238–245.

Yu, D., *et al.* « The Transcriptional Repressor Bcl-6 Directs T Follicular Helper Cell Lineage Commitment ». *Immunity*, vol. 31, 2009.

Yu, P. F., *et al.* « TNF α -activated mesenchymal stromal cells promote breast cancer metastasis by recruiting CXCR2 + neutrophils ». *Oncogene*, 36(4), 2017.

Yu, S., *et al.* « The TCF-1 and LEF-1 Transcription Factors Have Cooperative and Opposing Roles in T Cell Development and Malignancy ». *Immunity*, vol. 37, 2012.

Yusuf, I., *et al.* « Germinal Center T Follicular Helper Cell IL-4 Production Is Dependent on Signaling Lymphocytic Activation Molecule Receptor (CD150) ». *Journal of Immunology*, vol. 185, 2010.

Z

- Zaborowski, M.P., et al. « Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study ». *Bioscience* 65, 783–797, 2015.
- Zabuawala, T., et al. « An ets2-driven transcriptional program in tumor-associated macrophages promotes tumor metastasis ». *Cancer Res*, vol. 70, 2010, p. 1323–33.
- Zappasodi, R., et al. « Non-Conventional Inhibitory CD4(+)Foxp3(-)PD-1(Hi) T Cells as a Biomarker of Immune Checkpoint Blockade Activity ». *Cancer Cell*, vol. 34, 2018, p. 691.
- Zarour, H. M. « Reversing T-Cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer ». *Clin Cancer Res*, vol. 22, 2016, p. 1856–64.
- Zeisberg, E. M., et al. « Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts ». *Cancer Research*, 67(21), 10123–10128, 2007.
- Zeng, H., et al. « MTORC1 and MTORC2 Kinase Signaling and Glucose Metabolism Drive Follicular Helper T Cell Differentiation ». *Immunity*, n° 45, 2016, p. 554.
- Zhang, C., et al. « CD5 Binds to Interleukin-6 and Induces a Feed-Forward Loop with the Transcription Factor STAT3 in B Cells to Promote Cancer. » *Immunity* 44, 913–923, 2016.
- Zhang, W. J., et al. « IL-4-Induced Stat6 Activities Affect Apoptosis and Gene Expression in Breast Cancer Cells ». *Cytokine*, vol. 42, 2008, p. 39–47.
- Zhang, L., et al. « Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer ». *N Engl J Med*, vol. 348, n° 203, 2003.
- Zhang, M., et al. « A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients ». *J. Ovarian Res.* 7, 2014.
- Zhang, N., and M. J. Bevan. « CD8+ T cells: foot soldiers of the immune system. » *Immunity*, 2011.
- Zhang, Q. W., et al. « Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature ». *PLOS One*, 2012.
- Zhang, W. J. « Stat6 activities affect apoptosis and gene expression in breast cancer cells ». *Cytokine*, vol. 42, 2008, p. 39–47.
- Zhao, F., et al. « Positive and negative signaling through SLAM receptors regulate synapse organization and thresholds of cytotoxicity. » *Immunity*, vol. 36, 2012, doi:10.1016/j.immuni.2012.05.017.
- Zhao, Y., et al. « Dectin-1-activated dendritic cells trigger potent antitumor immunity through the induction of Th9 cells ». *Nat Commun*, vol. 7, n° 1, 2016.
- Zhong, Z., et al. « Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6 ». *Science*, 1994.
- Zhou, Z. Q., et al. « Follicular helper T cell exhaustion induced by PD-L1 expression in hepatocellular carcinoma results in impaired cytokine expression and B cell help, and is associated with advanced tumor stages ». *Am J Transl Res.*, 2016.
- Zhu, J., et al. « The transcription factor T-bet is induced by multiple pathways and prevents an endogenous Th2 cell program during Th1 cell responses. » *Immunity*, 2012.
- Zhu, W., et al. « A high density of tertiary lymphoid structure B cells in lung tumors is associated with increased CD4+ T cell receptor repertoire clonality. » *Oncoimmunology* 4, 2015.
- Zitvogel, L., et al. « Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. » *Nat Rev Immunol*, 2006.
- Zolla, S. « The effect of plasmacytomas on the immune response of mice ». *J. Immunol*, vol. 108, 1972, p. 1039–1048.
- Zotos, D., et al. « IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism ». *J Exp Med*, n° 207, 2010, p. 378.

Liste des Livres

- Campbell, N., and Reece, J. « Biologie (7ème édition) ». Editeur: *PEARSON (France)*, 2009.
- Espinosa, E. and Chillet, P. « Immunobiologie ». Editeur: *Ellipses Marketing*, 2010.

Annexes

Annexe 1

Influence des CAFs du
microenvironnement tumoral sur
le système immunitaire

Effect on immune cells	Type of immune cells	Cancer type	Molecule produced by CAFs	References
Recruitment of myeloid cells	F4/80 ⁺ macrophages	Breast	Chi3L1	Cohen <i>et al.</i>
	THP-1 monocytes	Breast	IL-6, CCL5 and CCL2	Bott <i>et al.</i>
	CD11b ⁺ Gr1 ⁺ MDSCs	CRC	CCL2	Chen <i>et al.</i>
	CXCR2 ⁺ neutrophils	Breast	CXCL1, CXCL2 and CXCL5	Yu <i>et al.</i>
	CD11b ⁺ Ly6C ⁺ monocytes, and F4/80 ⁺ macrophages	Lymphoma	CCL2	Ren <i>et al.</i>
	Granulocytic MDSCs (Ly6C ⁻ Ly6G ⁺)	Squamous cell carcinoma	SASP (CCL8; CXCL5; CCL2; CCL7; IL-6; CXCL1; CXCL14; CCL5)	Ruhland <i>et al.</i>
	CCR2 ⁺ circulating MDSCs	Hepatic	CCL2	Yang <i>et al.</i>
	Granulocytic MDSCs (Ly6C ⁻ Ly6G ⁺)	Colon, lung, breast, and melanoma	CXCL1	Kumar <i>et al.</i>
	CD11b ⁺ Gr1 ^{int} F4/80 ⁺ macrophages	PDAC		Gunderson <i>et al.</i>
	Monocytes	Prostate	SDF-1	Comito <i>et al.</i>
	CXCR4 ⁺ mast cells	Prostate	SDF-1	Ellem <i>et al.</i>
	Monocytes	Breast	CCL2	Ksiazkiewicz <i>et al.</i>
CD206 ⁺ TAMs	Breast	CCL2	Jia <i>et al.</i>	
Inhibition of T cell infiltration	CD8 ⁺ T cells	Breast	Chi3L1	Cohen <i>et al.</i>
Inhibition of T cell infiltration & activation	CD3 ⁺ T cells	Squamous cell carcinoma	SASP (CCL8; CXCL5; CCL2; CCL7; IL-6; CXCL1; CXCL14; CCL5)	Ruhland <i>et al.</i>
Recruitment and retention of Treg cells	Treg (CD3 ⁺ CD4 ⁺ FOXP3 ⁺)	Squamous cell carcinoma	SASP (CCL8; CXCL5; CCL2; CCL7; IL-6; CXCL1; CXCL14; CCL5)	Ruhland <i>et al.</i>
	CD4 ⁺ CD25 ⁺ T cells	Breast and HGSOC	SDF-1; OX40L, PD-L2, and JAM2.	Costa <i>et al.</i> Givel <i>et al.</i>
Recruitment of neutrophils	Peripheral blood neutrophils	Hepatocellular carcinoma	SDF-1	Cheng Y. <i>et al.</i>

Tableau 1 : Recrutement ou Exclusion des cellules de l'immunité par les CAFs.
D'après Monteran et Erez, 2019

Effect on immune cells	Type of immune cells	Cancer type	Molecule produced by CAFs	References
M2-like differentiation	Circulating monocytes	Prostate	SDF-1	Comito <i>et al.</i>
	TAMs	Breast	Chi3L1	Cohen <i>et al.</i>
Inhibition of Th1 immunity	Th1/Th2 cells	Breast		Liao <i>et al.</i>
Th17 Differentiation	T cells (Th17 polarization)	Lung	IL-6	Barnas <i>et al.</i>
Shaping the activity of dendritic cells	Th2 polarization via DC conditioning	Pancreatic	TSLP	De Monte <i>et al.</i>
	DC	Hepatocellular carcinoma	IL-6	Cheng J.T. <i>et al.</i>
	DC	Lung	Kyn	Hsu <i>et al.</i>
MDSCs differentiation & Activation	Monocytes	Hepatocellular carcinoma	SDF-1	Deng <i>et al.</i>
	MDSCs	Melanoma and lung adenocarcinoma	Dkk1	D'Amico <i>et al.</i>
	Peripheral blood mononuclear cells	Pancreatic	IL-6, VEGF, M-CSF, SDF-1, MCP-1	Mace <i>et al.</i> (2013 et 2018)
Treg cell Differentiation	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ Treg	Breast and HGSOc	B7H3, CD73, DPP4	Costa <i>et al.</i> Givel <i>et al.</i>

Tableau 2 : Modulation de la différenciation cellulaire de cellules du système immunitaire par les CAFs.
D'après Monteran et Erez, 2019.

Effect on immune cells	Type of immune cells	Cancer type	Molecule produced by CAFs	References
Inhibiting NK cytotoxic activities	NK cells	Melanoma	PGE2	Balsamo <i>et al.</i>
		Hepatocellular carcinoma	PGE2 and IDO	Li <i>et al.</i>
Exclusion of CD8+ T cells	T cells	Pancreatic	CXCL12	Feig <i>et al.</i> Joyce <i>et al.</i> Fearon <i>et al.</i>
		Urothelial cancer	TGF- β	Mariathasan <i>et al.</i>
Inhibition of T cell activity		Pancreatic	PD-L1,2 and COX-2	Tauriello <i>et al.</i>
		Colorectal	TGF- β	Tauriello <i>et al.</i>
Exclusion and killing of CD8+ T cells		Lung adeno-carcinoma and melanoma	FAS-L and PD-L2	Lakins <i>et al.</i>
Suppression of proliferation and activation		Breast	FAP and PDPN; TGF- β	Cremsasco <i>et al.</i>
		Cervical cancer	CD39 and CD73	De Lourdes Mora-Garcia <i>et al.</i>

Tableau 3 : Inhibition de l'activité cytotoxique anti-tumorale par les CAFs.
D'après Monteran et Erez, 2019.

Annexe 2

Liste exhaustive des immunothérapies anti-CTLA-4 et PD-1/PDL-1 approuvées par la FDA (mise à jour octobre 2018).

Annexe 3

Liste non exhaustive de combinaisons thérapeutiques utilisant des inhibiteurs d’“immune checkpoints”

Tumor type	Therapy regimes	Trial reference
Completed and ongoing clinical trials evaluating chemotherapy in combination with immune checkpoint inhibitors		
NSCLC (KEYNOTE 021) phase 1	Cohort A: Pembrolizumab (pembro) + carboplatin and paclitaxel (CP) → pembro Cohort B: Pembro + CP + bevacizumab (BEV) → pembro + BEV Cohort C: Pembro + carboplatin + pemetrexed (PEM) → pembro + PEM	Gadgeel <i>et al.</i>
NSCLC (KEYNOTE 021) phase 2	Pembro + carboplatin + PEM → pembro + PEM Carboplatin/PEM → PEM	Langer <i>et al.</i> Borghaei <i>et al.</i>
NSCLC (nonsquamous) (KEYNOTE-189)	Pembro + platinum + PEM → pembro + PEM Placebo + platinum + PEM → PEM	Gandhi <i>et al.</i>
NSCLC (squamous)	Pembro + CP → Pembro Placebo + CP	KEYNOTE-047 (ongoing)
Advanced, metastatic solid tumors (PEMBRO-PLUS)	Pembrolizumab plus gemcitabine (G), G + docetaxel (D), G + nab-paclitaxel (NP), G + vinorelbine (V), or irinotecan	Weiss <i>et al.</i>
NSCLC (CHECKMATE 012) phase 1	Nivolumab (Nivo) + gemcitabine (GEM) + cisplatin (CIS) → Nivo Nivo + PEM + CIS → Nivo Nivo (10 mg/kg) + CP → Nivo Nivo (5 mg/kg) + CP → Nivo	Rizvi <i>et al.</i>
NSCLC (CHECKMATE 227) phase 3 Ongoing	Chemotherapy alone or in combination with Nivo Squamous: CP Nonsquamous: PEM + carboplatin (or cisplatin)	Paz-Ares <i>et al.</i>
NSCLC	Atezolizumab (Atezo) + CP → Atezo Atezo + carboplatin/PEM → Atezo + PEM Atezo + carboplatin + nab-paclitaxel → Atezo	Liu <i>et al.</i>
IMpower 130 (NSCLC nonsquamous)	Atezo + carboplatin + nab-paclitaxel → Atezo	NCT02367781
IMpower 131 (NSCLC Squamous)	Atezo + CP → Atezo	NCT02367794
IMpower 132 (NSCLC nonsquamous) All ongoing	Atezo + PEM/carboplatin (or cisplatin) → Atezo + PEM	NCT02657434
NSCLC (PESEIDON) Phase 3 Ongoing	Durvalumab + tremelimumab + chemotherapy (histology-based) Durvalumab + chemotherapy (histology-based) Chemotherapy (histology-based)	NCT02537418
Metastatic/locally advanced esophageal cancer (neoadjuvant therapy)	Durvalumab in combination with standard of care chemotherapy or chemoradiation	NCT02735239
NSCLC Urothelial Cancer	Avelumab + pemetrexed/carboplatin Avelumab + gemcitabine/cisplatin	NCT03317496
Advanced NSCLC	Ipilimumab + CP Placebo + CP	Govindan <i>et al.</i>
Metastatic melanoma	Ipilimumab plus temozolomide	Patel <i>et al.</i>

Tumor type	Therapy regimes	Trial reference
SCLC	Ipilimumab + etoposide and platinum Placebo + etoposide and platinum	Reck <i>et al.</i>
Melanoma	Ipilimumab + dacarbazine	Yamazaki <i>et al.</i>
Clinical trials of BRAF targeted therapy in combination with immune checkpoint inhibitors		
BRAF V600 mutant melanoma	Dabrafenib ± trametinib + ipilimumab	Puzanov <i>et al.</i>
BRAF V600 mutant melanoma	Vemurafenib + ipilimumab	Ribas <i>et al.</i> (2013)
Both wild-type and BRAF mutant melanoma	Durvalumab + dabrafenib + trametinib Durvalumab + trametinib Trametinib → durvalumab	Ribas <i>et al.</i> (2015)
BRAF V600 mutant melanoma	Vemurafenib + ipilimumab	Amin <i>et al.</i>
Metastatic melanoma	Dabrafenib + trametinib followed by ipilimumab + nivolumab at progression vs. ipilimumab + nivolumab followed by dabrafenib + trametinib	NCT02224781
Clinical trials of immune checkpoint inhibitors in combination with poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors or vascular endothelial growth factor targeting therapy		
Gynecological cancers	Durvalumab + olaparib Durvalumab + cediranib	Lee <i>et al.</i>
Breast, gastric, ovarian and SCLC	Durvalumab + olaparib	NCT02734004
NSCLC, SCLC, breast, ovarian, colorectal, prostate	Durvalumab + olaparib Durvalumab + cediranib Durvalumab + olaparib + cediranib	NCT02484404
Breast and ovarian	Pembrolizumab + niraparib	NCT02657889
NSCLC	Nivolumab + veliparib + platinum-based chemotherapy Veliparib + platinum-based chemotherapy	NCT02944396
Breast	Veliparib + atezolizumab	NCT02849496
Gastric, GEJ adenocarcinoma, NSCLC, transitional cell carcinoma of the urothelium, biliary tract	Pembrolizumab + ramucirumab	NCT02443324
GI or thoracic malignancies	Durvalumab + ramucirumab	NCT02572687
Clinical trials of immune checkpoint inhibitors in combination with radiotherapy (RT)		
NSCLC (KEYNOTE-001)	Compared patients on pembrolizumab with previous RT to those who did not receive previous RT	Shaverdian <i>et al.</i>
NSCLC	Definitive ChemoRT → durvalumab Definitive ChemoRT → placebo	Antonia <i>et al.</i>
Inoperable or metastatic cancers	Concurrent durvalumab + RT	Levy <i>et al.</i>
Metastatic solid tumor	Ipilimumab + stereotactic ablative radiotherapy (SABR)	Tang <i>et al.</i>
Metastatic melanoma	Palliative RT + ipilimumab	Hiniker <i>et al.</i>
NSCLC	Stereotactic body radiation therapy (SBRT) in combination with Avelumab	NCT03050554
NSCLC	Single fraction nonablative radiation in combination with pembrolizumab	NCT02658097
Brain tumor	Stereotactic radiosurgery plus ipilimumab, nivolumab, or pembrolizumab	NCT03458455

Tumor type	Therapy regimes	Trial reference
Metastatic renal cell carcinoma and urothelial carcinoma	Nivolumab/atezolizumab Nivolumab/atezolizumab plus RT	NCT03115801
NSCLC	Radical-dose image guided radiation therapy daily for up to 10 days (within 2 weeks) while undergoing standard of care immunotherapy Patients who decline to undergo radiation therapy receive standard of care immunotherapy	NCT03176173

Annexe 4

Liste exhaustive des thérapies ciblées approuvées par la FDA (29 types de cancers).

Adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction: Trastuzumab (Herceptin®), ramucirumab (Cyramza®).

Bladder cancer: Atezolizumab (Tecentriq®), nivolumab (Opdivo®), durvalumab (Imfinzi™), avelumab (Bavencio®), pembrolizumab (Keytruda®), erdafitinib (Balversa™).

Brain cancer: Bevacizumab (Avastin®), everolimus (Afinitor®).

Breast cancer: Everolimus (Afinitor®), tamoxifen (Nolvadex), toremifene (Fareston®), Trastuzumab (Herceptin®), fulvestrant (Faslodex®), anastrozole (Arimidex®), exemestane (Aromasin®), lapatinib (Tykerb®), letrozole (Femara®), pertuzumab (Perjeta®), ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla®), palbociclib (Ibrance®), ribociclib (Kisqali®), neratinib maleate (Nerlynx™), abemaciclib (Verzenio™), olaparib (Lynparza™), atezolizumab (Tecentriq®).

Cervical cancer: Bevacizumab (Avastin®), pembrolizumab (Keytruda®).

Colorectal cancer: Cetuximab (Erbix®), panitumumab (Vectibix®), bevacizumab (Avastin®), ziv-aflibercept (Zaltrap®), regorafenib (Stivarga®), ramucirumab (Cyramza®), nivolumab (Opdivo®), ipilimumab (Yervoy®).

Dermatofibrosarcoma protuberans: Imatinib mesylate (Gleevec®).

Endocrine/neuroendocrine tumors: Lanreotide acetate (Somatuline® Depot), avelumab (Bavencio®), lutetium Lu 177-dotatate (Lutathera®), iobenguane I 131 (Azedra®).

Head and neck cancer: Cetuximab (Erbix®), pembrolizumab (Keytruda®), nivolumab (Opdivo®).

Gastrointestinal stromal tumor: Imatinib mesylate (Gleevec®), sunitinib (Sutent®), regorafenib (Stivarga®).

Giant cell tumor of the bone: Denosumab (Xgeva®).

Kidney cancer: Bevacizumab (Avastin®), sorafenib (Nexavar®), sunitinib (Sutent®), pazopanib (Votrient®), temsirolimus (Torisel®), everolimus (Afinitor®), axitinib (Inlyta®), nivolumab (Opdivo®), cabozantinib (Cabometyx™), lenvatinib mesylate (Lenvima®), ipilimumab (Yervoy®), pembrolizumab (Keytruda®).

Leukemia: Tretinoin (Vesanoid®), imatinib mesylate (Gleevec®), dasatinib (Sprycel®), nilotinib (Tasigna®), bosutinib (Bosulif®), rituximab (Rituxan®), alemtuzumab (Campath®), ofatumumab (Arzerra®), obinutuzumab (Gazyva®), ibrutinib (Imbruvica®), idelalisib (Zydelig®), blinatumomab (Blincyto®), venetoclax (Venclexta™), ponatinib hydrochloride (Iclusig®), midostaurin (Rydapt®), enasidenib mesylate (Ihdifa®), inotuzumab ozogamicin (Besponsa®), tisagenlecleucel (Kymriah®), gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg™), rituximab and hyaluronidase human (Rituxan Hycela™), ivosidenib (Tibsovo®), duvelisib (Copiktra™).

moxetumomab pasudotox-tdfk (Lumoxiti™), glasdegib maleate (Daurismo™), gilteritinib (Xospata®), tagraxofusp-erzs (Elzonris™).

Liver cancer: Sorafenib (Nexavar®), regorafenib (Stivarga®), nivolumab (Opdivo®), lenvatinib mesylate (Lenvima®), pembrolizumab (Keytruda®), cabozantinib (Cabometyx™).

Lung cancer: Bevacizumab (Avastin®), crizotinib (Xalkori®), erlotinib (Tarceva®), gefitinib (Iressa®), afatinib dimaleate (Gilotrif®), ceritinib (LDK378/Zykadia™), ramucirumab (Cyramza®), nivolumab (Opdivo®), pembrolizumab (Keytruda®), osimertinib (Tagrisso™), necitumumab (Portrazza™), alectinib (Alecensa®), atezolizumab (Tecentriq®), brigatinib (Alunbrig™), trametinib (Mekinist®), dabrafenib (Tafinlar®), durvalumab (Imfinzi™), dacomitinib (Vizimpro®), lorlatinib (Lorbrena®).

Lymphoma: Ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), denileukin diftitox (Ontak®), brentuximab vedotin (Adcetris®), rituximab (Rituxan®), vorinostat (Zolinza®), romidepsin (Istodax®), bexarotene (Targretin®), bortezomib (Velcade®), pralatrexate (Folotylin®), ibrutinib (Imbruvica®), siltuximab (Sylvant®), idelalisib (Zydelig®), belinostat (Beleodaq®), obinutuzumab (Gazyva®), nivolumab (Opdivo®), pembrolizumab (Keytruda®), rituximab and hyaluronidase human (Rituxan Hycela™), copanlisib hydrochloride (Aliqopa™), axicabtagene ciloleucel (Yescarta™), acalabrutinib (Calquence®), tisagenlecleucel (Kymriah®), venetoclax (Venclexta™), mogamulizumab-kpkc (Poteligeo®), duvelisib (Copiktra™).

Microsatellite instability-high or mismatch repair-deficient solid tumors: Pembrolizumab (Keytruda®).

Multiple myeloma: Bortezomib (Velcade®), carfilzomib (Kyprolis®), panobinostat (Farydak®), daratumumab (Darzalex™), ixazomib citrate (Ninlaro®), elotuzumab (Empliciti™).

Myelodysplastic/myeloproliferative disorders: Imatinib mesylate (Gleevec®), ruxolitinib phosphate (Jakafi®).

Neuroblastoma: Dinutuximab (Unituxin™).

Ovarian epithelial/fallopian tube/primary peritoneal cancers: Bevacizumab (Avastin®), olaparib (Lynparza™), rucaparib camsylate (Rubraca™), niraparib tosylate monohydrate (Zejula™).

Pancreatic cancer: Erlotinib (Tarceva®), everolimus (Afinitor®), sunitinib (Sutent®).

Prostate cancer: Cabazitaxel (Jevtana®), enzalutamide (Xtandi®), abiraterone acetate (Zytiga®), radium 223 dichloride (Xofigo®), apalutamide (Erleada™).

Skin cancer: Vismodegib (Erivedge®), sonidegib (Odomzo®), ipilimumab (Yervoy®), vemurafenib (Zelboraf®), trametinib (Mekinist®), dabrafenib (Tafinlar®), pembrolizumab (Keytruda®), nivolumab (Opdivo®), cobimetinib (Cotellic™), alitretinoin (Panretin®), avelumab (Bavencio®), encorafenib (Braftovi™), binimetinib (Mektovi®), cemiplimab-rwlc (Libtayo®).

Soft tissue sarcoma: Pazopanib (Votrient®), alitretinoin (Panretin®).

Solid tumors with an NTRK gene fusion: Larotrectinib sulfate (Vitrakvi®).

Stomach cancer: Pembrolizumab (Keytruda®).

Systemic mastocytosis: Imatinib mesylate (Gleevec®), midostaurin (Rydapt®).

Thyroid cancer: Cabozantinib (Cometriq®), vandetanib (Caprelsa®), sorafenib (Nexavar®), lenvatinib mesylate (Lenvima®), trametinib (Mekinist®), dabrafenib (Tafinlar®).

Source :

- Site internet : National Cancer Institute (NIH)
- Lien : <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies/targeted-therapies-fact-sheet>

Résumé

Il est maintenant acquis que le système immunitaire occupe une place importante dans l'évolution des cancers (Hanahan *et al.*, 2011). La compréhension actuelle de la réponse immunitaire adaptative en fait une cible de choix dans ce contexte. Il est apparu que les lymphocytes T CD4⁺, acteurs majeurs de la composante adaptative du système immunitaire, présentent des actions distinctes sur le contrôle de la croissance tumorale. Ainsi, les lymphocytes Th2 et Tfh, tous deux activateurs des lymphocytes B dans des conditions de lutte contre des infections pathogéniques, présentent des rôles ambivalents dans un contexte de cancer. En effet, de nombreuses études montrent que la présence de Th2 est corrélée à une progression de la maladie (notamment via l'action de l'IL-4 qu'ils sécrètent) (Koller *et al.*, 2010 ; Roca *et al.*, 2012) alors que les Tfh, seraient plutôt associés à un bon pronostic pour les patients (Gu-Trantien *et al.*, 2013, 2017).

Nos investigations actuelles nous ont permis de mettre en avant une caractéristique nouvelle de la biologie des lymphocytes Tfh. En effet, les Tfh expriment l'Hemathopoietic Prostaglandin D2 synthase (HPGDS). Cette enzyme de la voie de biosynthèse des eicosanoïdes est responsable de la production de Prostaglandine D2 (PGD2). Plusieurs travaux montrent que les cellules Th2 expriment le récepteur CRTH2, spécifique de la PGD2. Cette molécule agit sur ces cellules comme chemoattractant et permet également une augmentation de leur production cytokinique. Ainsi, nous posons l'hypothèse d'une communication potentielle entre lymphocytes Tfh et Th2 via la PGD2. Le projet présenté ici est alors axé sur la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents à cette communication au sein des deux sous-types ainsi que sur son impact dans un contexte de cancer. Ce projet ayant également pour but de mettre en avant la PGD2 comme nouvelle cible thérapeutique dans le cancer.

Mots clés : Tfh, Th2, HPGDS, PGD2, Communication cellulaire, Cancer