

Lymphocytes T résidents mémoires dans les tumeurs du poumon et ORL: sous-populations et mécanismes de migration

Charlotte Blanc

► To cite this version:

Charlotte Blanc. Lymphocytes T résidents mémoires dans les tumeurs du poumon et ORL: sous-populations et mécanismes de migration. Immunologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2019. Français. NNT: 2019USPCB046. tel-03142812

HAL Id: tel-03142812 https://theses.hal.science/tel-03142812

Submitted on 16 Feb 2021

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.



ersité Sorbonne

Paris Cité



Thèse de doctorat

de l'Université de Paris



Préparée à l'Université Paris Descartes

Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité - ED 562

Laboratoire INSERM U970, équipe 10 « Immunothérapie et traitement anti-angiogénique en cancérologie »

Lymphocytes T résidents mémoires dans les tumeurs du poumon et ORL : souspopulations et mécanismes de migration

Par Charlotte Blanc

Thèse de doctorat d'immunologie

Dirigée par Eric Tartour

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 24 juin 2019

Devant un jury composé de :

Antonino Nicoletti Svlvie Garcia

Pascale Jeannin Philippe Deterre

Eric Tartour

Président du jury Rapporteur Rapporteur Examinateur Directeur de thèse Université de Paris Institut Pasteur Université d'Angers CNRS Université de Paris **Titre** : Lymphocytes T résidents mémoires dans les tumeurs du poumon et ORL : sous-populations et mécanismes de migration.

Résumé :

De grands bouleversements sont apparus au début du 21^{ème} siècle dans la compréhension de la physiopathologie du cancer avec l'énoncé de la théorie de l'immunoédition complétant le concept de l'immunosurveillance. La communauté scientifique s'accorde désormais sur le fait que le système immunitaire et particulièrement les lymphocytes T (LT) CD8+ tiennent une place essentielle dans le contrôle de la croissance tumorale. Toutefois, par pression de sélection, la cellule tumorale développe des mécanismes de résistance aux attaques du système immunitaire, neutralisant ainsi l'effet cytotoxique des LT. Restaurer leurs fonctions antitumorales est une stratégie thérapeutique qui a fait ses preuves avec l'immunothérapie. Cependant, ces traitements ne sont pas toujours efficaces et peuvent être optimisés par une meilleure compréhension de l'immunité antitumorale. Dans ce but, nous nous sommes intéressés au déroulement de la réponse antitumorale des LT CD8+ en nous attardant sur les LT résidents mémoires (Trm) particulièrement efficaces contre la tumeur et au fort impact pronostique, qui pourraient être une cible thérapeutique pertinente.

L'induction d'une réponse antitumorale efficace requiert une présentation antigénique optimale conduisant à l'activation du LT CD8+ et à sa migration dans la tumeur via le réseau chimiokine/récepteur. Dans le premier travail, le récepteur de chimiokine CXCR6 a été identifié comme molécule de *homing* fortement exprimée par les LT CD8+ Trm du poumon. Sa chimiokine CXCL16 peut être sécrétée par les cellules présentatrices d'antigènes, les cellules épithéliales et tumorales mais le rôle de l'axe CXCR6/CXCL16 dans l'immunosurveillance des cancers n'est pas connu à ce jour. Pour en comprendre les mécanismes, des expériences de vaccinations antitumorales par voie intranasale (i.n.) réalisées dans des modèles de souris déficientes en CXCR6 ont permis de mettre en évidence l'impact de CXCR6 dans l'établissement d'une infiltration optimale en LT CD8+ spécifiques et Trm dans le lavage broncho-alvéolaire et au sein des tumeurs des voies aérodigestives supérieures. L'axe CXCR6/CXCL16 pourrait représenter un outil thérapeutique intéressant pour les vaccins anticancéreux ou pour les thérapies de transferts adoptifs de LT modifiés dont l'infiltration intra-tumorale est limitée.

Les Trm ont la particularité d'exprimer des intégrines (CD103, CD49a) impliquées dans leur interaction avec le microenvironnement tumoral. Ils présentent un phénotype original microenvironnement-dépendant qui leur confère des avantages en termes d'activités cytotoxiques dans les tumeurs et expliquant leur impact pronostique favorable. Une meilleure connaissance de leur phénotype et de leurs mécanismes d'induction permettrait d'optimiser la réponse antitumorale.

Le second travail s'est concentré sur l'étude de deux intégrines principales CD103 et CD49a dans les cancers pulmonaires par des techniques multiparamétriques d'immunofluorescence *in situ* et de cytométrie en flux. Les résultats montrent que leur expression explique l'infiltration des LT CD8+ et leur contact avec la cellule tumorale, en lien avec leur forte implication dans la survie des malades. Nos données suggérèrent également la possibilité d'un *priming* local pulmonaire nécessaire à l'induction du phénotype Trm par des modèles de vaccinations i.n. et d'un lien entre les structures lymphoïdes tertiaires et les Trm.

Ces travaux ont montré l'importance de l'analyse de l'immunité locale avec les LT CD8+ Trm pour la compréhension de cette réponse antitumorale. Etudier le phénotype Trm a permis de mettre en lumière leur rôle crucial et leur potentiel comme cible thérapeutique. Une meilleure connaissance des mécanismes sous-jacents à l'induction des Trm permettra à terme de les cibler pharmacologiquement pour optimiser les thérapies et donc la survie des malades.

Mots clés : cancer, Trm, CXCR6, vaccin, sous-populations.

Title : Resident memory T cells in lung and head and neck tumors: subpopulations and migration mechanisms.

Abstract :

With the immunoediting theory, new concept in the cancer physiopathology has appeared in the beginning of the 21st century. It is now established that the immune system and CD8+ T cells play a crucial role in tumor growth control. However, by selective pressure, the tumor cell develops mechanisms to avoid immune destruction and to inhibit T cells cytotoxicity. Reinvigorating antitumor functions is a well-proven therapeutic strategy with immunotherapy. Nevertheless, patients do not always respond to these treatments which could be optimized. In this context, we have studied antitumor response induction by focusing on CD8+ T cells and especially on resident memory T cells (Trm), new cytotoxic cells correlated with a good prognosis and which could be a relevant therapeutic target.

A potent antitumor response requires an optimal antigenic presentation to prime CD8+ T cells and to favor their migration into the tumor through chemokine network. In a first study, we identified a chemokine receptor CXCR6, highly expressed by lung CD8+ Trm. Its chemokine CXCL16 is produced by antigen presenting cells, epithelial and tumor cells, but the role of the CXCR6/CXCL16 axis in cancer immunosurveillance is not known yet. To understand its mechanisms, antitumor vaccination strategies by intranasal (i.n.) route had been set up in CXCR6-deficient mice and have shown the role of CXCR6 on promoting the infiltration of specific CD8+ T cells and Trm in lung tissue and head and neck tumors. The CXCR6/CXCL16 axis could then represent an interesting therapeutic tool for antitumor vaccines or adoptive cell transfer in which tumor infiltration is a challenge.

Trm have the particularity to express integrins (CD103, CD49a) involved in the interaction with the tumor microenvironment. They exhibit an original and an heterogenous phenotype, microenvironment-dependent. Their phenotype is involved in their cytotoxic activities, highlighting their high prognostic impact and their potential to be a suitable therapeutic target. Better understanding Trm phenotype complexity and their induction mechanisms are crucial to further optimize antitumor response. The second work of this thesis focused on the expression of two main integrins CD103 and CD49a in lung cancer by an *in situ* multiparametric immunofluorescence technique and by multicolor flow cytometry. The results showed that their expression determine their contact with the tumor cells and their involvement in patient survival. Our data obtained by i.n. vaccination models and by tertiary lymphoid structures analysis suggest the possibility of a priming in the lung to induce the Trm phenotype.

Our work shows the necessity of analyzing local immunity and CD8+ Trm T cells for a better understanding of antitumor response. Studying Trm phenotype has highlighted their crucial role and their potential to be a relevant therapeutic target. Identifying and targeting their mechanisms of induction might optimize therapies and patient's survival.

Keywords : cancer, Trm, CXCR6, vaccine, subpopulations.

A Joseph,

pour toutes les personnes anonymes ou non, remerciées ci-après

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury, à qui je dédie également ce manuscrit :

Au Professeur Antonino Nicoletti pour avoir accepté de présider ce jury, pour son écoute et ses conseils.

Au Docteur Sylvie Garcia pour nos échanges dans le cadre des comités de suivi de thèse, pour toutes ses recommandations pour améliorer ces travaux et pour ses encouragements.

Au Professeur Pascale Jeannin pour avoir accepté de relire et d'évaluer ce travail.

Au Docteur Philippe Deterre pour avoir bien voulu examiner cette thèse.

Au Professeur Eric Tartour pour ces années de travail, en remerciement pour les belles opportunités qu'il m'a données ainsi que pour sa confiance.

Je tiens particulièrement à remercier et à dédier ce manuscrit aux personnes qui ont contribué à rendre possible l'écriture de ce manuscrit, notamment le Professeur Patrick Vicart dans le cadre de la médiation mais également le Docteur Geneviève de Saint-Basile et le Docteur Chantal Boulanger, spécialement pour son écoute et son soutien.

Je remercie également le Professeur Laurence Weiss pour ses précieuses remarques dans le cadre des comités de suivi et le Professeur Rachel Golub dans le cadre de notre collaboration sur le projet CXCR6.

J'ai pris la décision de poursuivre mes remerciements sans mentionner de nom. Pour que tout le monde y trouve sa place, par pudeur, discrétion ou par amitié, je laisse à l'interprétation de chacun d'y trouver une raison.

A ma famille, debout près de mes moments de doutes, pour leur réconfort.

Particulièrement à mes parents à qui je dois tout, dont un certain nombre de bidons de lait... Merci de m'avoir donné le goût du travail et appris la persévérance et le respect de chacun.

A ma sœur, partenaire de vie et d'aventures. Que ce manuscrit soit pour toi un témoignage qu'à la fin de chaque chemin, il y a la lumière.

A mes grands-parents pour leur soutien. A mes oncles et tantes. A mes trois cousins, loin des yeux et toujours près du cœur.

A mes amis de toujours ou pour toujours. A ceux qui sont toujours là, ceux perdus, ceux que j'ai retrouvés et à toi.

A mes professeurs, mes maîtres de stage, à toutes les équipes que j'ai côtoyées, à ceux qui m'ont transmis leur passion avec bienveillance.

A mis familias en Panama. Gracias por darme paz y alegría de vivir. A tous mes compagnons de route.

Aux patients que j'ai eu la chance de côtoyer, à ces rencontres qui restent gravées.

Mes derniers remerciements vont à mon équipe de recherche pendant ces années de thèse et plus : aux anciens, à ceux qui ont initié les questions scientifiques, aux titulaires, à ceux qui étaient ou sont de passage, aux étudiants et particulièrement à ceux que j'ai eu la chance d'encadrer. Je pense également aux équipes et aux personnels du PARCC, du monde de la recherche en France et à l'étranger que j'ai côtoyés.

Pour m'avoir formée, m'avoir partagé leur savoir, leur expérience et transmis leur passion, Pour leur accompagnement pendant toutes ces années, pour leur encadrement et leur suivi, Pour leur disponibilité et leurs conseils, Pour nos discussions scientifiques enrichissantes, Pour avoir toujours répondu à toutes mes questions et m'avoir tendu la main, Pour m'avoir apporté de l'aide dans les manips et dans mes réflexions, Pour avoir pris le temps de relire et corriger ce manuscrit, mes présentations, mes abstracts et mon poster.

Pour leur bonjour, leur sourire et leur bonne humeur, Pour m'avoir encouragée et poussée, Pour nos entretiens qui nous font nous sentir moins seul, Pour m'avoir appris la patience et m'avoir montré mes faiblesses, Pour avoir été indulgent et patient avec ma maladresse et naïveté, Pour leur soutien au quotidien, leur écoute précieuse et leurs conseils dans les épreuves, Pour m'avoir fait grandir.

Pour m'avoir partagé vos petits bonheurs, pour vos petits mots sur mon bureau et vos cadeaux, Pour la rivière sauvage, nos fous-rires, nos repas, nos restos et nos soirées, Pour votre amitié.

Aux personnes bienveillantes pour leur question et leur prise de température, ainsi qu'aux attentionnées qui pensent à l'équipe, même pendant leurs vacances. Vous êtes précieux.

Aux travailleurs de l'ombre pour leur silence et leur humilité, pour porter et avoir porté l'équipe. A vous si facilement oubliés et qu'on ne remercie pas assez. Vous avez mon admiration.

Aux travailleurs communicatifs, engagés, infatigables et dynamiques, forces de propositions, pour insuffler un vent frais, pour leurs mails remplis d'idées et de motivations. Aux persévérants et fidèles pour leur présence en lab meeting et aux conférences-sandwich. Vous êtes les piliers et les exemples des jeunes.

Que ce manuscrit soit pour vous le témoignage de mon respect et de mon amitié. Pour que vous n'oubliez pas que c'est vous qui faites la recherche et que vous en êtes l'espoir.

Table des matières

Remerciements				
Table des figures				
Liste des abréviations11				
Introduction 13				
1 Immunosurveillance et cancer				
1.1 Propriétés du cancer14				
1.2 Concept d'immunosurveillance				
1.3 Effecteurs de la réponse immunitaire antitumorale17				
1.3.1 Rôle des Natural Killers17				
1.3.2 Rôle des lymphocytes T CD8+ 18				
1.3.3 Rôle des lymphocytes T CD4+ 19				
1.3.4 Autres effecteurs T 20				
1.4 Mécanismes d'échappement de la tumeur à la réponse antitumorale 22				
1.4.1 Théorie de l'immunoédition21				
1.4.2 Actions immunomodulatrices au sein de la tumeur				
1.5 Immunothérapies dans le traitement du cancer28				
1.5.1 Transfert cellulaire adoptif				
1.5.2 Inhibiteurs de point de contrôle (IPC)				
1.5.3 Vaccination thérapeutique				
2 Déroulement de la réponse T CD8+ antitumorale				
2.1 Activation de la réponse immunitaire T CD8+ 35				
2.1.1 Priming des lymphocytes T CD8+				
2.1.2 Différenciation des lymphocytes T CD8+ mémoires				
2.2 Infiltration tumorale des lymphocytes T CD8+ 44				
2.2.1 Chimiokines et migration 44				

2.	.2.2	Réseau vasculaire tumoral et infiltration tumorale	48
2.3	Interac	tions avec le microenvironnement tumoral	50
2.	.3.1	Mécanismes de rétention dans la tumeur	50
2.	.3.2	Conditions métaboliques et physiologiques dans la tumeur	51
2.	.3.3	Conséquences sur le phénotype et la fonction du lymphocyte T	52
3 In	nplicatio	on des lymphocytes T CD8+ résidents mémoires (Trm) dans la physiopathologie	du r 4
cancer	•••••		54
3.1	Généra	alités sur l'étude des Trm	54
3.	.1.1	Arguments en faveur de l'existence des Trm	54
3.	.1.2	Méthodes d'étude des Trm	56
3.2	Phénot	type des Trm dans le cancer	60
3.	.2.1	Infiltration dans les tumeurs solides	60
3.	.2.2	Profil transcriptomique et protéomique	61
3.3	Argum	ents en faveur du rôle des Trm dans le contrôle de la croissance tumorale	67
3.	.3.1	Rôle pronostique	67
3.	.3.2	Trm et protection tumorale	70
3.4	Trm et	stratégies thérapeutiques	75
3.	.4.1	Induction et vaccination locale	75
3.	.4.2	Epuisement et IPC	76
3.	.4.3	Transfert cellulaire adoptif de Trm	77
Object	tifs		78
Travai	l 1		80
Travai	2	1	.10

Di	Discussion				
1	ld	lentification des lymphocytes T résidents mémoires au sein des tumeurs 153			
	1.1	Choix des marqueurs pour l'étude des Trm 153			
	1.2	Présence de sous-populations de Trm au sein des tumeurs155			
	1.3	Correspondance entre le phénotype et l'identification des Trm 157			
2	In	npact du phénotype Trm sur la réponse antitumorale158			
	2.1	CXCR6 et recrutement des lymphocytes T dans la tumeur158			
	2.2	CD103 et interaction avec la cellule tumorale 159			
	2.3	CD49a et immunosurveillance			
	2.4	Rôle des Trm dans la formation de structures lymphoïdes tertiaires intra-tumoraux 161			
3	In	térêt de l'étude de la réponse immunitaire dans l'évaluation de l'efficacité thérapeutique			
	1	62			
	3.1	Vaccination antitumorale locale et réponse Trm162			
	3.2	Sous-populations de Trm et réponse aux IPC 164			
	3.3	Optimisation du transfert adoptif pour les tumeurs solides 164			
Сс	onclu	ision165			
Ré	éfére	nces167			
Ar	nnex	e194			

Table des figures

Figure 1 : Evolution des caractéristiques de la cellule tumorale la distinguant de la cellule saine . 15
Figure 2 : Les trois étapes de la théorie de l'immunoédition 22
Figure 3 : Molécules de costimulation inhibitrices et activatrices régulant les réponses des
lymphocytes T
Figure 4 : Construction des différentes générations de CAR T cells
Figure 5 : Classes d'antigènes tumoraux en fonction de leurs caractéristiques
Figure 6 : Le cycle du cancer
Figure 7 : Etapes de l'induction de lymphocytes T mémoires
Figure 8 : Fonctions et phénotype des sous-populations de lymphocytes T CD8+ mémoires 40
Figure 9 : Chimiokines et récepteurs associés 46
Figure 10 : Phénotype et fonctionnalité associés aux Trm humains
Figure 11 : Régulation transcriptomique des Trm64
Figure 12 : Rôle de CD103 dans la fonction cytotoxique antitumorale des lymphocytes T CD8+ Trm

Liste des abréviations

αGalCer	alpha-galactosylcéramide
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AhR	Aryl hydrocarbon Receptor
ARN	Acide RiboNucléique
BALT	Bronchus-Associated lymphoid tissue
CAR	Récepteur antigénique chimérique (Chimeric Antigen Receptor)
CBNPC	Cancer bronchique non à petites cellules
CCR	C-C chemokine receptor
CD	Cluster de Différenciation
СМН	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
СРА	Cellule présentatrice d'antigènes
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4
CXCR	C-X-C chemokine receptor
DC	Cellule dendritique (<i>dendritic cell</i>)
FoxP3	forkhead box P3
FT	Facteur de Transcription
HEV	Veinule à endothélium épais (High Endothelial Venule)
HSV	Virus de l'herpès simplex
IC	Immune Checkpoint
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygénase
IE	Intra-Epithélial
IEL	Lymphocytes intraépithéliaux (IntraEpithelial Lymphocyte)
IL	Interleukine
i.n.	Intranasal
i.m.	Intramusculaire
IFN-γ	Interféron gamma
IPC	Inhibiteur de Point de Contrôle
ΙΤΙΜ	Tyrosine-Based Inhibitory Motif
KLF2	Krüppel-like Factor 2
LBA	Lavage Broncho-Alvéolaire
LAG-3	Lymphocyte-activation gene 3
LT	Lymphocyte T

MDSC	Myeloid-Derived Suppressor Cells
MFI	Mean Fluorescence Intensity
NK	Lymphocyte Natural Killer
NKG2D	Natural Killer Group 2D
ORL	Oto-rhino-laryngologie
PD-1	Programmed Death protein 1
PD-L1	Programmed Death Ligand 1
PRR	Pattern Recognition Receptor
S1PR1	Sphingosine 1 Phosphate Receptor 1
SLO	Organe lymphoïde secondaire (Secondary Lymphoid Organ)
ST	Stroma
ТАР	Transporter Associated Antigen Processing
TCF1	T Cell Factor 1
TCGA	The Cancer Genome Atlas
Tcm	LT central mémoire
TCR	T Cell Receptor
Tem	LT effecteur mémoire
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
TIL	LT infiltrant les tumeurs
Tim-3	T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3
TLS	Structure lymphoïde tertiaire (Tertiary Lymphoid Structure)
ΤΝΕ-α	Tumor Necrosis Factor
Treg	LT CD4+ régulateur
Trm	LT résident mémoire (tissue-resident memory)
Tscm	LT souche mémoire (stem cell memory T cell)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Introduction

1 Immunosurveillance et cancer

Le cancer est la première cause de mortalité en France d'après le rapport ministériel de 2017 concernant « l'état de santé de la population en France» et la deuxième cause de mortalité dans le monde, et ce malgré les nombreuses stratégies thérapeutiques (1,2). Cette pathologie touche de plus en plus de malades avec une incidence en croissance (3). Face à ce besoin médical fort, le cancer fait l'objet de nombreuses recherches qui ont notamment permis l'essor actuel que connait l'immunothérapie, utilisant le système immunitaire pour l'élimination de la tumeur. Dans ce contexte, la compréhension de la place de l'immunité dans l'oncogenèse prend toute son importance.

1.1 Propriétés du cancer

Le cancer est une pathologie qui résulte de la prolifération incontrôlée de cellules transformées à la suite de dommages génétiques et de dérégulations protéiques. Ces modifications vont conduire à une résistance aux procédés internes mis en place pour arrêter l'emballement mitotique. Au cours de l'oncogenèse, les cellules acquièrent également de nouvelles propriétés présentées dans la **figure 1A** qui conduisent à déjouer les systèmes de protection en favorisant leur survie, concourant à la croissance tumorale et à l'envahissement de l'organisme avec la formation de métastases.

Le système immunitaire tient une place importante parmi les mécanismes de défense de l'organisme contre le développement d'une tumeur. Cependant, bien que son rôle dans le contrôle de la croissance tumorale ait été suggéré dès la fin du XIX^{ème} siècle, ce n'est qu'au début du XXI^{ème} que les données ont permis de mettre d'accord le monde scientifique jusque-là hostile à ce concept. Il est intéressant de noter que dans les premiers « *hallmarks of cancer* » publiés en 2000 par Douglas Hanahan et Robert Weinberg, le rôle de l'immunité n'apparaissait pas (4), tandis que dans son actualisation en 2011, de nouvelles propriétés du cancer ont été rapportées comme la capacité de la cellule tumorale à résister aux attaques de l'immunité (**Figure 1B**) (5). Depuis, le nombre d'études dans le domaine récent de l'immuno-oncologie ne fait qu'augmenter, ajoutant de nouvelles preuves à cette aptitude tumorale et appuyant l'impact clinique considérable du système immunitaire sur le contrôle de la croissance tumorale.



Figure 1 : **Evolution des caractéristiques de la cellule tumorale la distinguant de la cellule saine.** Adaptée de Hanahan D et Weinberg R (5).

A. Initialement, les principales aptitudes de la cellule tumorale la distinguant de la cellule saine étaient la résistance à la mort cellulaire, le maintien des signaux de prolifération, l'échappement aux signaux antiprolifératifs, l'acquisition de capacités d'invasion et de migration, l'immortalité réplicative et l'induction de l'angiogenèse. B. Récemment de nouvelles aptitudes ont été certifiées dont l'instabilité du génome concourant à l'apparition de mutations génétiques, en plus de l'inflammation, caractéristiques sous-jacentes aux autres. Les progrès des dernières décennies ont également permis de mettre en évidence la capacité de reprogrammation des mécanismes énergétiques et la résistance aux attaques du système immunitaire.

1.2 Concept d'immunosurveillance

Initialement énoncé à partir de la fin des années 50 par Burnet et Thomas (6–8), le concept de l'immunosurveillance décrit le rôle essentiel du système immunitaire dans le contrôle tumoral et indique que les cellules immunitaires ont la capacité de détecter et d'éliminer efficacement les cellules tumorales. Longtemps controversé, ce concept a finalement été accepté par la communauté scientifique au début du XXI^{ème} siècle et se base sur des données expérimentales et cliniques, que nous décrirons brièvement.

En effet, il a été observé que l'absence ou la défaillance du système immunitaire accroît considérablement l'incidence du cancer. Des études épidémiologiques ont ainsi permis de mettre en évidence une relation entre la survenue d'un cancer avec le statut immunodéprimé de l'hôte (9–11).

Des études cliniques et non cliniques ont par ailleurs montré la présence d'une réponse immunitaire spécifique et spontanée vis-à-vis d'antigènes tumoraux (12). A cette observation s'ajoute une association entre un fort infiltrat lymphocytaire et la survie des patients (13–15).

On notera finalement le récent succès clinique des immunothérapies stimulant l'immunité (avec les inhibiteurs de point de contrôle) ou délivrant directement des effecteurs de la réponse immunitaire (avec le transfert adoptif de cellules T modifiées), reflet de l'action primordiale du système immunitaire sur la régression tumorale. Ces traitements seront détaillés dans la partie 1.5.

Parmi les différents composants du système immunitaire, plusieurs effecteurs sont particulièrement impliqués dans l'immunosurveillance des cancers pour favoriser un contrôle de la croissance tumorale efficace.

1.3 Effecteurs de la réponse immunitaire antitumorale

Le système immunitaire est classiquement divisé en deux groupes qui interagissent entre eux : l'immunité innée, spontanée, non-spécifique et rapide à mettre en place et l'immunité adaptative, spécifique et plus tardive. Les différents composants du système immunitaire peuvent être amenés à rentrer en contact avec la tumeur.

A l'immunité innée, on attribue principalement un rôle de phagocytose des débris de cellules tumorales, d'activation et de modulation de la réponse inflammatoire et de l'immunité adaptative via les macrophages et les cellules dendritiques (DC). Ce système complexe participe également à l'élimination directe de la tumeur par cytotoxicité avec notamment des lymphocytes Natural Killer (NK).

Pour l'immunité adaptative, spécifique de la tumeur, nous noterons la part prépondérante dans la lyse tumorale de l'immunité à médiation cellulaire ou Th1 avec les lymphocytes T (LT) CD8+ et CD4+, et un rôle moindre de l'immunité à médiation humorale représentée par les lymphocytes B (LB) et les anticorps.

Nous nous attarderons ici sur les principaux acteurs de la réponse antitumorale.

1.3.1 Rôle des Natural Killers

Les cellules NK appartiennent aux cellules innées lymphoïdes et sont impliquées dans la détection de cellules cancéreuses. Elles ont les capacités de reconnaître les cellules transformées présentant peu ou pas de complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) couplé au peptide tumoral, de façon complémentaire aux LT CD8+, en l'absence d'immunisation spécifique préalable. Leur activité cytotoxique (relargage de granules lytiques) dépend de l'intégration des signaux délivrés par leurs récepteurs dits activateurs (NKG2D ou *Natural Killer Group 2D*, NKp46) ou inhibiteurs (KIR ou *Killer-cell immunoglobulin-like receptor*) leur permettant de détecter les cellules anormales. Elles exercent également un effet antitumoral via leur récepteur Fc (fragment constant), responsable de la lyse anticorps-dépendante (ADCC) et leur production de cytokines pro-inflammatoires comme l'interféron gamma (IFN-γ) et le TNF (*Tumor Necrosis Factor*).

1.3.2 Rôle des lymphocytes T CD8+

Les lymphocytes T CD8+ sont les acteurs majeurs de l'immunité adaptative antitumorale. Ils sont activés par trois signaux délivrés par la DC dans les organes lymphoïdes. Le premier signal fait suite à l'interaction entre le récepteur T ou TCR (*T Cell Receptor*) et le complexe CMH-I-peptide tumoral présenté par une cellule présentatrice d'antigène (CPA). Le second signal correspond à l'intégration des signaux délivrés par la DC via les molécules de costimulation activatrices (CD28, OX40) ; ce deuxième signal est essentiel pour l'activation du LT, sans quoi celui-ci rentrerait dans un état anergique. Le troisième signal est délivré par les cytokines (interleukines (IL) -2, -7, -15 et -21) promouvant l'activation et la réponse des LT CD8+. Leur activation concourra à leur migration dans la tumeur où par leur TCR, ils reconnaissent spécifiquement les antigènes associés au CMH-I, présents à la surface des cellules tumorales. L'activation des voies de signalisation en aval de la liaison du TCR avec le complexe CMH-I-peptide va enclencher la fonction cytotoxique du LT CD8+, conduisant *in fine* à la lyse de la cellule cible. Plusieurs mécanismes sont possibles pour détruire la cellule :

- La libération d'enzymes protéolytiques telles que les perforines et granzymes. Cette voie enzymatique permet en effet, via la formation de pores transmembranaires par la perforine, l'internalisation des granzymes responsables de l'apoptose de la cellule tumorale après un clivage des caspases.
- 2) La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN-γ et le TNF. Ces molécules en plus d'avoir une action directe sur la cellule cible agissent également de manière indirecte. A titre d'exemple, l'IFN-γ contribue à la reconnaissance de la cellule tumorale en induisant de l'expression du CMH-I à sa membrane mais aussi en permettant un meilleur recrutement des cellules effectrices. Le TNF favorise, quant à lui, le recrutement de macrophages sur le site tumoral.
- Les interactions ligand-récepteur entre le LT CD8+ et la cellule tumorale telles que Fas-FasL ou TRAIL-DR5 permet également une signalisation intracellulaire pro-apoptotique.

Ces propriétés cytotoxiques expliquent le rôle pronostique qu'ont les LT CD8+. Effectivement, dans la majorité des cancers à quelques exceptions (tumeur du rein, de la prostate), leur infiltration est associée à une meilleure survie des malades (13,16). Par leur efficacité cytolytique, ils représentent naturellement une bonne cible thérapeutique à induire ou à amplifier. L'immunothérapie les place ainsi avec succès au centre de ses mécanismes d'action avec les inhibiteurs de point de contrôle (IPC) et les transferts adoptifs de LT CD8+ génétiquement modifiés. Leur préexistence dans les cancers est d'ailleurs associée avec une meilleure réponse aux IPC (17). Dans les parties suivantes, nous nous intéresserons à leur induction dans le contexte tumoral et à une sous-population particulière, étudiée au cours de cette thèse.

1.3.3 Rôle des lymphocytes T CD4+

Les LT CD4+ sont décrits comme une population immunomodulatrice.

Contrairement aux LT CD8+ qui peuvent reconnaître directement la cellule tumorale, le TCR des LT CD4+ se lie à un complexe antigénique apprêté par le CMH de classe II, préférentiellement exprimé par les CPA. Cette population lymphocytaire se distingue également par une hétérogénéité dans ses phénotypes et profils d'expression cytokinique, en réponse à différents signaux de différenciation. On classe traditionnellement les LT CD4+ en deux catégories : les auxiliaires ou helpers et les régulateurs. On attribue un rôle antitumoral aux lymphocytes auxiliaires immunostimulants (Th1 et Th9) et un rôle pro-tumoral aux cellules immunosuppressives ou antagonistes au profil Th1 (Th2, LT régulateurs) (13).

Cette dichotomie pro- et antitumorale reste néanmoins simplifiée et dépend de la localisation tumorale (18). La population Th17 par exemple exerce des effets paradoxaux à la fois protecteurs et délétères (19,20).

Une autre population pourtant cruciale dans l'établissement d'une réponse immunitaire, les LT CD4+ folliculaires, est peu décrite dans la littérature. Intimement liés aux réponses B, ils infiltrent les tumeurs et plus particulièrement les structures lymphoïdes tertiaires (TLS) (21) et pourraient intervenir dans l'induction d'une réponse antitumorale locale.

Lymphocytes T CD4+ Th1

On attribue aux LT CD4+ Th1 un rôle antitumoral par leur sécrétion d'IFN-γ et de TNF. Ils contribuent également à l'amplification de l'immunité protectrice à médiation cellulaire par la sécrétion d'IL-2 immunostimulante et les interactions CD40-CD40L avec les CPA lors de l'activation des LT CD8+ et de leur différenciation en cellules mémoires.

Lymphocytes T CD4+ Th9

Les LT CD4+ Th9 interviennent par leur production d'IL-9 et d'IL-21 dans l'amplification de la réponse immunitaire antitumorale des NK, des mastocytes et des LT CD8+. Ils ont également la particularité d'exprimer des granzymes témoignant de leur capacité cytotoxique directe, amplifiée en présence d'IL-1β (22,23).

1.3.4 Autres effecteurs T

D'autres LT dits non conventionnels par leur système de reconnaissance participent à l'immunosurveillance des tumeurs tels que les LT $\gamma\delta$ et les lymphocytes NKT.

Les LT $\gamma\delta$ reconnaissent un panel de phospho-antigènes sans obligation d'un apprêtement par le CMH. En première ligne dans la réponse antitumorale de par leur localisation tissulaire, ils sont capables d'une cytotoxicité directe envers la cellule tumorale mais également indirecte via la production d'IFN- γ et de TNF ; néanmoins, ils pourraient exercer des activités pro-tumorales suivant les sous-types de LT $\gamma\delta$ (24).

A mi-chemin entre l'immunité innée et adaptative, les NKT quant à eux réagissent aux glycopeptides présentés par une molécule du CMH non conventionnelle, le CD1d, et sont composés de plusieurs populations. Parmi les sous-populations de NKT, c'est le type I qui apparaît doté de capacités antitumorales par la production d'IFN-γ notamment (25,26).

Le système immunitaire avec l'immunité à médiation cellulaire représentée par les LT CD8+ est particulièrement impliqué dans l'immunosurveillance des tumeurs, par sa capacité de détection et d'élimination de la cellule tumorale. Le développement d'un cancer est par conséquent associé à une résistance des cellules tumorales aux attaques de l'immunité.

1.4 Mécanismes d'échappement de la tumeur à la réponse antitumorale

1.4.1 Théorie de l'immunoédition

La prise de conscience d'une interaction physique et dans le temps entre la tumeur et le système immunitaire a fait évoluer le concept d'immunosurveillance au début du 21^{ème} siècle en théorie des 3E ou immunoédition (*immunoediting*), décrite par Dunn et Schreiber. Cette théorie propose une modification du microenvironnement tumoral au cours de l'oncogenèse suite à des signaux tumoraux et immunitaires. L'immunoédition se décompose en trois étapes dans le déroulement de l'oncogenèse en lien avec l'action de l'immunité antitumorale : élimination, équilibre et échappement (**Figure 2**) (27).

Lors d'une première phase dite d'élimination, le système immunitaire et en particulier les effecteurs de l'immunosurveillance sont capables de détecter et d'éliminer les cellules tumorales dans leur totalité. En effet, les débris tumoraux vont être pris en charge par les cellules de l'immunité innée comme les macrophages de type M1 et les DC. A la suite de la capture d'antigènes tumoraux, les DC, CPA professionnelles, acquièrent un phénotype activé, dégradent les antigènes et présentent dans les organes lymphoïdes les peptides tumoraux aux LT. Les LT spécifiques désormais activés migrent et infiltrent la tumeur où ils contribueront à l'élimination des cellules tumorales (28).

Toutefois si la destruction des cellules tumorales n'est pas optimale, se met en place un état intermédiaire d'équilibre au cours duquel la prolifération tumorale est maîtrisée mais persistante. Cet état conduit à une pression de sélection des variants tumoraux, contribuant à l'émergence de clones résistants aux attaques du système immunitaire. Cette étape aboutira enfin à la phase d'échappement avec l'installation d'un microenvironnement pro-tumoral et immunosuppresseur qui signera l'échec de l'immunosurveillance ou *immunosubversion*.



Figure 2 : Les trois étapes de la théorie de l'immunoédition. Adaptée de Dunn GP et al (27).

La cellule saine va subir une transformation sous l'influence de plusieurs paramètres comme les carcinogènes, les radiations, une inflammation chronique ou encore les microorganismes, conduisant à des modifications génétiques de la cellule. Les cellules de l'immunité innée et adaptative concourent à l'élimination dans un premier temps des cellules transformées. Dans certains cas, un équilibre va s'installer conduisant à une immunosélection des variants tumoraux résistants à l'immunité pour finalement échapper au contrôle immunitaire.

1.4.2 Actions immunomodulatrices au sein de la tumeur

1.4.2.1 Propriétés intrinsèques à la cellule tumorale

L'instabilité génétique et l'immunosélection vont contribuer à l'acquisition d'un phénotype tumoral peu immunogène et par conséquent induire une tolérance du système immunitaire vis-àvis de la tumeur. En effet, la reconnaissance par l'immunité des cellules cancéreuses peut être altérée par une faible, voire par une absence d'expression du CMH ou de molécules impliquées dans l'apprêtement de l'antigène tumoral, telles que les sous-unités du protéasome et de protéines transporteuses de peptides du cytosol au réticulum endoplasmique (TAP ou *Transporter Associated Antigen Processing*) (29,30). La perte des molécules activatrices des cellules NK comme NKG2D limite également l'action de ces cellules cytotoxiques (31). La tumeur peut perdre sa susceptibilité aux voies de l'apoptose par la surexpression de molécules anti-apoptotiques (BCL-2, BCL-X, FLIP) rendant inefficace l'action de l'immunité (32,33). Elle peut détourner ces mécanismes contre les lymphocytes par l'expression de FasL, responsable de l'induction de l'apoptose des lymphocytes Fas+ (34).

1.4.2.2 Médiateurs solubles immunomodulateurs

La cellule tumorale peut être à l'origine d'une immunosuppression par l'intermédiaire de médiateurs solubles immunomodulateurs comme IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase), TGF-β, VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), ... Ces protéines immunosuppressives peuvent être produites directement par la cellule tumorale ou par les cellules du microenvironnement, et interviennent à différents niveaux dans le contrôle de l'immunité.

A titre d'exemple, l'enzyme IDO induit l'arrêt du cycle cellulaire T par son activité catalytique du tryptophane et par conséquent, par accumulation de métabolites (35). Pour sa part, le TGF- β contribue à une polarisation préférentielle des LT CD4+ en Th17 et active les LT CD4+ régulateurs (Treg) (36,37). Quant au VEGF, molécule connue pour être pro-angiogénique, il empêche la maturation des DC, favorise l'infiltration en MDSC (*Myeloid-Derived Suppressor Cells*)et en Treg et induit une surexpression des protéines inhibitrices des LT comme les molécules de costimulation inhibitrices (PD-1, Tim-3), témoins d'un épuisement lymphocytaire (38).

1.4.2.3 Recrutement de cellules immunomodulatrices

La tumeur participe à l'établissement d'un microenvironnement pro-tumoral voire immunosuppresseur. La production de chimiokines par la tumeur (CCL2, CCL17, CCL22) favorise en effet le recrutement de cellules tolérogènes voire immunosuppressives comme les Treg, les MDSC et les macrophages de type M2.

Les LT CD4+ régulateurs

Les Treg, caractérisés par l'expression du CD25, la chaine α du récepteur de l'IL-2 et du facteur de transcription (FT) FoxP3 (*forkhead box P3*), sont les acteurs principaux du maintien de la tolérance périphérique à l'état normal mais également dans un contexte tumoral. Leur infiltration dans les tumeurs est généralement associée à un mauvais pronostic et à une croissance tumorale plus importante (15,39), même si des exceptions existent (40).

Les Treg agissent sur l'immunité antitumorale par plusieurs mécanismes.

Ils sont capables de cytolyse directe de leur cible (les LT CD8+ et CD4+, les NK et les DC) via la libération de perforines et granzymes mais peuvent agir par des mécanismes indirects sur les LT antitumoraux. Ils vont en amont de la réponse T, limiter la maturation des DC via des signaux inhibiteurs comme CTLA-4 (41). Dans la tumeur, ils sont à l'origine de sécrétions cytokiniques inhibant les LT, telles que le TGF- β (*Transforming Growth Factor*), l'IL-10 ou l'IL-35. Les Tregs privent également les LT d'apports énergétiques essentiels à leur fonctionnement et à leur survie notamment par leur grande consommation d'IL-2 et par leur expression d'ectonucléotidases CD39 et CD73, responsables de la réduction de l'ATP (Adénosine TriPhosphate) en adénosine immunosuppressive (42).

Les cellules myéloïdes immunosuppressives

Les MDSC correspondent à des cellules myéloïdes immatures suite à un blocage dans leur différenciation. Elles contribuent à l'installation d'un microenvironnement pro-tumoral par la production de VEGF et de cytokines immunomodulatrices et inductrices de Tregs comme l'IL-10 et le TGF-β. De plus, par leur expression d'enzymes (arginase A, oxyde nitrique synthétase), elles limitent l'apport des LT en acides aminés et donc leur activité.

Les macrophages associés aux tumeurs de type 2

Dans le cancer, on distingue classiquement deux catégories de macrophage : les macrophages de type 1 ou M1 antitumoraux et les macrophages de type 2 ou M2. Les macrophages présentent une grande plasticité de phénotype, influencée par leur microenvironnement tissulaire de résidence : un microenvironnement inflammatoire (IFN- γ , TNF- α , lipopolysaccharide) va favoriser le type 1 alors qu'un environnement immunosuppresseur anti-inflammatoire (IL-4, IL-13, IL-10, TGF- β) promeut une signature M2 (43).

A l'inverse du profil M1, les macrophages M2 sont impliqués dans l'angiogenèse et le développement tumoral par la production de facteurs solubles comme les facteurs de croissance (VEGF, EGF, FGF) et les métalloprotéases favorisant la migration des cellules cancéreuses. Leur effet immunosuppresseur est reflété par leur sécrétion d'IL-10 et de TGF- β maintenant le statut protumoral du microenvironnement. Des facteurs de l'immunité comme l'IFN- γ pourraient révoquer leurs activités pro-tumorales (44).

1.4.2.4 Points de contrôle immunitaire

A l'état physiologique, l'activation du LT va provoquer l'expression de molécules de costimulation inhibitrices ou « points de contrôle » (*immune checkpoints* ou IC) avec en chefs de fil PD-1 (*Programmed Death protein 1*), Tim-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3*), CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4*), LAG-3 (*Lymphocyte-Activation Gene 3*), garantes de l'homéostasie lymphocytaire (**Figure 3**). Contrairement aux molécules de costimulation activatrices impliquées dans l'activation du LT, l'expression des IC par les LT permet de contrôler l'emballement de la réponse T par la liaison avec leur ligand. Dans le cadre du cancer, les IC sont retrouvés sur les LT infiltrant les tumeurs (TIL). Cette expression résulte notamment d'une stimulation antigénique chronique au sein des tumeurs qui peut conduire à une tolérance vis-à-vis de la tumeur. Il en résulte une perte de fonctionnalités et d'activation du LT d'autant plus grande que le nombre de molécules inhibitrices est importante sur la cellule lymphoïde. Cet état peut être réversible après re-stimulation.

Un des mécanismes d'échappement de la tumeur est d'exprimer les ligands des molécules de costimulation inhibitrices comme PD-L1 (*Programmed Death Ligand 1*). On remarquera, en plus des mécanismes épigénétiques, que l'expression de PD-L1 peut notamment être régulée par l'IFNγ, produit par le LT lui-même. Nous détaillerons ici plus précisément les trois principaux IC que nous étudierons par la suite: CTLA-4, PD-1 et Tim-3.



Figure 3 : Molécules de costimulation inhibitrices et activatrices régulant les réponses des lymphocytes T. Adaptée de Pardoll DM et al (45).

Les CPA et les LT interagissent en parallèle du signal 1, donné par l'interaction entre le TCR et le complexe CMH-I-peptide. Les molécules de costimulation activatrices (CD27,CD28, OX40) vont délivrer le signal 2 d'activation du LT alors que les molécules inhibitrices (PD-1, CTLA-4, Tim-3) vont provoquer une dysfonction du LT. Ces interactions peuvent avoir lieu dans les organes lymphoïdes ou dans les tissus périphériques.

CTLA-4

CTLA-4 ou CD152 est membre de la superfamille des immunoglobulines et se lie à des protéines de la famille B7 (CD80, CD86), ligands qu'il partage avec son homologue activateur CD28. CD28 est impliqué dans le second signal lors de l'activation du LT au sein des organes lymphoïdes, en parallèle de l'engagement du TCR. La liaison avec CTLA-4 étant plus affine que celle de CD28, l'aspect immunosuppresseur de CTLA-4 réside principalement dans la compétition avec CD28 pour l'interaction avec leurs ligands, ce qui en fait principalement un acteur de la tolérance centrale.

PD-1

PD-1 ou CD279, membre également de la famille des immunoglobulines, est retrouvé à la surface des LT dont les Treg, des NK et des CPA. Sa découverte en 1992 a valu à Tasuku Honjo le prix Nobel de médecine 2018.

PD-1 est induit après engagement du TCR lors de l'activation du LT et participe plus particulièrement à la tolérance périphérique. Les deux principaux ligands de PD-1 sont retrouvés dans la tumeur : PD-L1 (CD274) est exprimé par les CPA et par les cellules cancéreuses, alors que PD-L2 (CD273) est essentiellement présent à la surface des CPA et des tumeurs hématologiques.

La signalisation intracellulaire de PD-1 est liée à son motif ITIM (*Tyrosine-Based Inhibitory Motif*) et ITSM ou *immunoreceptor tyrosine-based switch motif*. La liaison avec son ligand va causer l'inhibition de kinases via la phosphatase SHP2, responsable du blocage de la signalisation du TCR et de CD28, pour conduire à l'arrêt du cycle cellulaire (46).

Tim-3

La molécule inhibitrice Tim-3 ou CD366 est exprimée par les LT (parfois en co-expression avec PD-1), les LB, les NK et les cellules myéloïdes. Elle possède plusieurs ligands membranaires (Ceacam-1, galectine-9, phosphatidylsérine) qui peuvent être exprimés par les cellules tumorales, ou des ligands solubles (HMGB1, corps apoptotiques) libérés en cours d'apoptose ou en réponse au stress cellulaire. La liaison de Tim-3 avec ses ligands va déclencher une cascade de phosphorylations de tyrosines, qui libère la protéine chaperonne Bat3 et permet à la kinase Fyn de se lier au domaine intracellulaire de Tim-3, ce qui conduira principalement à un effet tolérogène en fonction du type cellulaire (47).

La cellule tumorale peut acquérir un grand nombre de mécanismes d'échappement au système immunitaire. La compréhension de ces phénomènes a permis le développement de thérapies pour rétablir une immunité antitumorale efficace et finalement améliorer la survie des malades.

1.5 Immunothérapies dans le traitement du cancer

Initialement, les traitements anticancéreux s'attardaient à éliminer les cellules hautement prolifératives avec des traitements cytotoxiques comme les chimiothérapies et la radiothérapie. Plus récemment, et devant les importants effets indésirables de ces produits, les thérapies ciblées spécifiques des cellules tumorales du malade ont constitué une avancée majeure avec l'imatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase mutée dans les cancers hématologiques. Ces thérapies se sont étendues aux cancers solides. Cependant, ces traitements ne sont pas exempts d'effets indésirables lourds voire graves et restent sujets à des résistances et des rechutes. L'identification des mécanismes d'échappement de la tumeur au système immunitaire et du rôle de l'immunosurveillance dans le contrôle de la croissance tumorale a permis de comprendre que le rétablissement d'une immunité antitumorale efficace était un objectif thérapeutique à atteindre. L'immunothérapie utilise justement le système immunitaire comme outil ou comme cible et a su s'imposer dans l'arsenal thérapeutique. Il existe plusieurs stratégies que l'on peut classer en deux catégories en fonction de leurs mécanismes d'actions différents :

- Les immunothérapies passives pour lesquelles sont directement délivrés les effecteurs de la réponse immunitaire antitumorale. On retrouve le transfert cellulaire adoptif (tisagenlecleucel, axicabtagen ciloteucel) et les anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes tumoraux (anti-HER2 trastuzumab, anti-CD20 rituximab) ou des médiateurs solubles (anti-VEGF bevacizumab).
- Les immunothérapies actives, à l'instar d'une prodrogue, elles nécessitent une activation du système immunitaire du patient comme par exemple les inhibiteurs de point de contrôle ou IPC (anti-CTLA-4 ipilimumab, anti-PD-1 nivolumab), les vaccins thérapeutiques (sipuleucel-T) et les molécules immunomodulatrices (inhibiteurs d'IDO, cytokines, agonistes PRR ou *Pattern Recognition Receptor*).

On notera tout de même que les traitements conventionnels (chimiothérapie, radiothérapie, chirurgie), les thérapies ciblées et la nouvelle thérapie des virus oncolytiques (Talimogene laherparepvec) participent également à l'amplification de la réponse immunitaire via des mécanismes directs ou par destruction et libération d'antigènes tumoraux (48).

Seront développées ici uniquement les classes d'immunothérapies discutées par la suite dans ce travail.

1.5.1 Transfert cellulaire adoptif

Le transfert adoptif de cellules immunocompétentes est un outil thérapeutique qui repose sur l'administration au patient de cellules antitumorales compétentes. Initialement, il s'agissait de mettre en culture des TIL issus de la tumeur du patient, pour les expandre *ex vivo*. Par la suite, les techniques de manipulation génétique ont permis d'utiliser directement des LT périphériques autologues et de modifier génétiquement leur récepteur TCR pour accroître la reconnaissance de la tumeur. Le TCR y était remplacé par un récepteur transgénique et maintenant par un récepteur antigénique chimérique, appelé *Chimeric Antigen Receptor* ou CAR, pour donner les CAR T cells. La construction des CAR a évolué au cours du temps pour optimiser leur cytotoxicité et leur survie (**Figure 5**). De manière générale, le CAR est constitué de la partie variable des anticorps à laquelle

est ajoutée un ou plusieurs domaines intracellulaires de transduction du signal du TCR. Par ce système, l'affinité du LT modifié pour sa cible antigénique est optimisée et permet une reconnaissance directe en s'affranchissant de l'apprêtement du peptide par le CMH. La signalisation intracellulaire contribue de façon cruciale à l'amplification de la réponse et à la persistance du LT dans l'organisme, ce qui a conduit à des améliorations au cours du temps (49).



Figure 4 : Construction des différentes générations de CAR T cells. Adaptée de Sharma A et al (50).

La première génération de CAR T cells est composée du domaine intracellulaire CD3 de signalisation du LT, d'un domaine transmembranaire et des domaines variables extracellulaires pour la liaison avec l'antigène.

Ceux de deuxième et de troisième générations possèdent un ou plusieurs domaines des molécules de costimulation activateurs (CD28, CD27, 4-1BB, OX40) pour amplifier leur cytotoxicité et leur persistance. Le CAR T cell de quatrième génération, également appelé « TRUCK » (*T Cell Redirected for Universal Cytokine Killing*), présente la même construction que les précédents, avec en plus la particularité d'exprimer des transgènes de cytokines pro-inflammatoires comme par exemple l'IL-12.

Depuis 2017, deux CAR T cells de deuxième génération avec Kymriah[®] (tisagenlecleucel) et Yescarta[®] (axicabtagene ciloleucel), dirigés contre l'antigène tumoral CD19 ont fait leurs preuves et sont indiqués dans les lymphomes B (51,52). Le transfert cellulaire adoptif dans les cancers solides apparaît plus complexe pour des questions de *homing* ou d'infiltration dans la tumeur, en plus de l'interaction avec le microenvironnement tumoral généralement immunosuppresseur.

1.5.2 Inhibiteurs de point de contrôle (IPC)

Véritable révolution, les IPC connaissent un essor toujours actuel dans le traitement du mélanome et du cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) dans un premier temps. Ces traitements consistent à administrer un anticorps monoclonal ciblant la voie des IC pour empêcher l'interaction inhibitrice récepteur-ligand et restaurer la fonction cytotoxique des LT. Le premier anticorps développé est l'ipilimumab, un anti-CTLA-4 ayant fait ses preuves dans le traitement du mélanome métastatique, autorisé depuis 2011 et ayant fait l'objet d'un prix Nobel de médecine en 2018 (53,54). Depuis, d'autres IPC ont été développés : des anti-PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) et des anti-PD-L1 (atezolizumab, durvalumab, avelumab). Ces traitements sont progressivement indiqués dans de plus en plus de cancers solides (cancer du rein, cancer épidermoïde de la tête et du cou, carcinome urothélial, cancer du foie) ou hématologiques (lymphome de Hodgkin).

Les IPC sont des thérapies coûteuses qui sont efficaces pour 30% des patients (55). La recherche de biomarqueurs prédictifs de la réponse aux IPC est par conséquent nécessaire pour une meilleure sélection des patients-candidats aux IPC. Jusqu'à présent le seul critère de sélection est l'expression du ligand PD-L1 pour les traitements anti-PD-1, même si la réponse clinique ne dépend pas toujours de l'expression de PD-L1 (56,57). D'autres facteurs prédictifs pourraient être envisagés à l'avenir comme la charge mutationnelle de la tumeur ou la réponse immunitaire notamment des LT CD8+ (17,56,58,59).

1.5.3 Vaccination thérapeutique

Le principe de la vaccination antitumorale repose sur une immunisation active pour induire une réponse effectrice contre un ou plusieurs antigènes associés à la tumeur. Il existe deux types de vaccination : préventif et thérapeutique.

Le vaccin prophylactique a pour but le développement d'une immunité spécifique chez l'individu sain en vue d'une protection, en cas d'une rencontre avec l'antigène. Dans le cadre d'une infection par un virus oncogène (virus du papillome humain ou de l'hépatite B), les vaccins en empêchant l'entrée du virus dans l'organisme préviennent le développement d'un cancer causé par ces pathogènes dans le futur.

A la différence des vaccins préventifs ou prophylactiques, les vaccins thérapeutiques sont administrés chez le malade pour traiter la pathologie en stimulant et amplifiant son immunité. L'objectif ici est l'induction des cellules immunitaires spécifiques de la tumeur et compétentes dans la destruction de la cellule tumorale, c'est-à-dire les LT CD8+.

Il existe cinq catégories d'antigènes tumoraux pouvant être reconnus par le système immunitaire, en fonction de leur site, de leur niveau d'expression, de leur origine et de leurs propriétés (Figure 4) :

- Les antigènes de différenciation
- Les antigènes du soi surexprimés ou exprimés de façon aberrante
- Les antigènes appartenant au groupe « cancer-testis »
- Les antigènes issus d'un virus oncogène
- Les antigènes du soi mutés

Le choix de l'antigène tumoral dans la formulation du vaccin est crucial pour l'induction d'une réponse optimale et doit se baser sur des critères de sélection précis comme leur rôle dans l'oncogenèse, leur immunogénicité ou leur spécificité tumorale (60). En effet, certains antigènes sont partagés avec les cellules saines ce qui pourrait provoquer une rupture de la tolérance immunitaire et par conséquent des réactions auto-immunes.

De façon intéressante, les vaccins peuvent prendre plusieurs formes galéniques : protéiques ou peptidiques, cellulaires (DC ou cellules tumorales) ou génétiques (ADN, ARN) (61).

Catégories	Antigènes associés à la tumeur				spécifiques de la tumeur	
Types	Antigènes de différenciation	Antigènes surexprimés	Antigènes appartenant au groupe <i>cancer</i> <i>testis</i>	Antigènes issus de micro-organismes	Antigènes mutés	
Caractéris tiques	Antigènes exprimés par les cellules tumorales et les cellules saines issues d'un même tissu	Antigènes exprimés par les cellules tumorales et les cellules saines mais à de plus faibles taux	Antigènes exprimés par les cellules tumorales et les cellules germinales	Antigènes produits par les cellules tumorales infectées par des micro- organismes oncogènes	Antigènes exprimés uniquement par les cellules tumorales après mutagenèse	
Exemples d'antigènes exprimés par la tumeur	Mart1, gp100, tyrosinase : dans le mélanome PSA, PAP, PSMA : dans le cancer de la prostate	Her2/neu : dans les cancers du sein, de l'ovaire, le carcinome rénal MUC1 : dans les adénocarcinomes	MAGE-3 : dans le mélanome, le cancer de la vessie NY-ESO1 : dans le mélanome et le cancer de l'ovaire	E6 et E7 du VPH : dans le cancer du col de l'utérus, anal et ORL HBs du virus de l'hépatite B : dans l'hépatocarcinome cellulaire	p53 muté : dans 50 % des cancer RAS muté : dans 15 à 20 % des cancers	

Figure 5 : Classes d'antigènes tumoraux en fonction de leurs caractéristiques. Adaptée de Blanc C et al (62).

Le tableau représente les caractéristiques des cinq différentes classes d'antigènes tumoraux, accompagnées d'exemples. De gauche à droite, les antigènes sont de moins en moins susceptibles d'être exprimés par les cellules saines de l'organisme, et donc d'être plus spécifiques de la tumeur et plus immunogène, moins soumis à la tolérance immunitaire. De plus, les antigènes partagés entre les cellules tumorales et les cellules saines sont plus susceptibles de provoquer des réactions auto-immunes, en cas d'administration par une vaccination. Toutes ces caractéristiques sont donc à prendre en compte dans le choix de l'antigène vaccinal.

Bien que cette stratégie ait été pensée dès la fin du 19^{ème} siècle avec William Coley, un seul vaccin thérapeutique est à ce jour autorisé sur le marché. Il s'agit de sipuleucel-T (Provenge[®]) un vaccin à base de DC pulsées par un antigène prostatique PAP (*Prostatic Acid Phosphatase*), indiqué dans le cancer de la prostate (63). Malgré des années de recherche et d'essais cliniques, la vaccination ne parvient pas à atteindre les objectifs d'efficacité prédits. Il semble que l'hétérogénéité antigénique de la tumeur et que son microenvironnement immunosuppresseur soient des obstacles pour l'efficacité des LT antitumoraux induits par l'immunisation.

Des optimisations galéniques et pharmacocinétiques peuvent être apportées pour améliorer la réponse des LT comme un vaccin multi-antigénique, un meilleur ciblage des DC impliquées dans l'activation des LT ou une voie d'administration innovante (64). Pour pallier à l'inactivation des LT par un microenvironnement immunosuppresseur, il est aussi proposé que les protocoles cliniques soient revisités pour associer les IPC à la vaccination (65).

Notre équipe a d'ailleurs montré dans des modèles pré-cliniques une synergie entre la vaccination antitumorale et le traitement par anti-PD-1 pour l'élimination des tumeurs (66).

De grands bouleversements sont apparus au début du 21^{ème} siècle avec l'énoncé de la théorie de l'immunoédition complétant le concept de l'immunosurveillance. La communauté scientifique s'accorde désormais sur le fait que le système immunitaire, et particulièrement les LT CD8+, tiennent une place à part entière dans le contrôle de la croissance tumorale. Toutefois, par pression de sélection, la cellule tumorale développe des mécanismes de résistance aux attaques du système immunitaire, neutralisant ainsi l'effet cytotoxique des LT. Restaurer leurs fonctions antitumorales est une stratégie thérapeutique qui a fait ses preuves avec l'immunothérapie, avec moins d'effets indésirables et des réponses durables. Cependant, ces traitements ne sont pas toujours efficaces et peuvent être optimisés avec également une perspective de combinaison des différents traitements. Dans ce but, nous nous intéresserons à mieux comprendre le déroulement de la réponse T CD8+ antitumorale pour finalement nous attarder sur la population lymphocytaire des LT résidents mémoires particulièrement efficace contre la tumeur et qui pourrait être une cible thérapeutique pertinente.

2 Déroulement de la réponse T CD8+ antitumorale

L'induction de LT CD8+ se déroule en plusieurs étapes et dans plusieurs localisations : au sein de la tumeur et dans les organes lymphoïdes (**Figure 6**). Elle nécessite une présentation de l'antigène tumoral, capté dans la tumeur par les CPA, pour la délivrance des trois signaux nécessaires à l'activation du LT spécifique. Le LT pourra suivre plusieurs voies de différenciation qui impacteront ses fonctions effectrices, sa localisation et sa durée de vie. Les LT circulants, après activation, migreront dans la tumeur via le réseau de chimiokines et le réseau vasculaire pour détecter et détruire la cellule cancéreuse. Dans cette deuxième partie, nous reviendrons sur chacune de ces étapes.





L'induction d'une réponse immunitaire antitumorale est un processus cyclique qui peut se propager de manière autonome, conduisant à une accumulation de facteurs immuno-stimulateurs qui, en principe, devraient amplifier la réponse des LT. Ce cycle peut être divisé en sept étapes principales, à commencer par la libération des antigènes de la cellule cancéreuse (1) qui seront captés par les CPA pour activer les LT dans les organes lymphoïdes secondaires (2-3). Les LT activés migreront dans l'organisme jusqu'à infiltrer la tumeur via les cellules endothéliales (4-5) pour finalement interagir, reconnaître via son TCR (6) et détruire la cellule tumorale (7). APC : cellule présentatrice d'antigène ; CTL : lymphocytes T cytotoxiques.

2.1 Activation de la réponse immunitaire T CD8+

L'activation ou *priming* du LT naïf dans les organes lymphoïdes secondaires (SLO) nécessite trois signaux délivrés par la DC comme énoncé dans la partie 1.3.2. Cette étape est cruciale pour le bon déroulement de la réponse immunitaire et dépend essentiellement de l'interaction avec la DC.

2.1.1 Priming des lymphocytes T CD8+

2.1.1.1 Cellules dendritiques

Les DC jouent un rôle central dans l'orientation de la réponse immunitaire de manière générale, par l'activation des LT. Leur organisation est complexe de par leur origine, leur phénotype et leur dynamique qui diffèrent, ce qui conduit à les classer en plusieurs sous-populations : les DC plasmacytoïdes pDC, les DC conventionnelles cDC1 et cDC2 et les DC dérivées de monocytes MoDC (**Tableau 1**).

Populations	Facteurs de transcription	Marqueurs souris	Marqueurs Homme	Fonctions
pDC	E2-2	CD11c ^{int} , Ly6C, B220,	CD123, CD303, CD304	Production d'IFN-I
		Siglec-H		Présentation croisée
cDC1	Baft3, Irf8	CD11c, Clec9a, XCR1	CD11c, XCR1, Clec9a,	Induction de réponse Th1
		CD8α (SLO) ou CD103	CD141	Présentation croisée
		(tissu)		
cDC2	Irf4	CD11c, CD11b, CD172a	CD11c, CD1c, CD172a	Induction de réponse Th1
MoDC		CD11b, F4/80, Ly6C,	CD11b, CD206, CD172a,	Production de TNF
		CD64	CD1c	

Tableau 1 : Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des sous-populations de cellules dendritiques.Chacune des populations de DC présentent des marqueurs et des fonctions propres. On notera qu'il existe deux catégoriesde cDC1 en fonction de leur localisation : dans les organes lymphoïdes elles expriment CD8α et CD103 dans les tissus.pDC : DC plasmacytoïdes, MoDC : DC dérivée d'un monocyte, SLO : organes lymphoïdes secondaires.
L'activation des LT CD8+ a la particularité de nécessiter une présentation antigénique croisée par le biais du CMH-I et donc d'une machinerie intracellulaire particulière, ce qui fait que seules certaines DC sont spécialisées dans ce *priming*. Les cDC1 Batf3-dépendantes et à un moindre niveau les pDC sont capables de présentation croisée (67,68). Après internalisation, les protéines exogènes vont en effet subir une étape de dégradation en peptides par le protéasome. Ces peptides sont ensuite transloqués dans le réticulum endoplasmique pour être associés aux molécules du CMH-I et enfin transportés à la surface de la DC. On notera également que l'activation des LT CD8+ requiert une interaction CD40-CD40L entre le LT CD4+ et la DC.

Les cDC1 CD103+ sont en effet les CPA majoritaires des LT CD8+ antitumoraux (69,70). Les souris déplétées pour le FT Baft3 présentaient une réduction du nombre de DC, associée à un faible infiltrat en LT CD8+ (71). Cette population cellulaire serait d'ailleurs la seule impliquée dans le transport des antigènes tumoraux vers le ganglion (69). Dans cette même étude, les auteurs ont également mis en évidence chez l'Homme une association entre l'expression transcriptomique globale au sein de la tumeur de *BATF3* et celle de *CD8A*, suggérant ainsi un impact important des cDC1 dans l'induction de la réponse antitumorale des LT CD8+.

La capture d'antigènes tumoraux se fait essentiellement sur le site tumoral où l'infiltration des DC dans les tumeurs a été rapportée dans plusieurs cancers. Néanmoins, leur rôle pronostique est complexe à définir en absence de standardisation puisque les études les identifient à travers un grand nombre de marqueurs et en fonction de leur stade de maturation (72). On remarquera toutefois une corrélation avec un pronostic favorable pour le marqueur de DC matures DC-LAMP, signe de structure lymphoïde tertiaire (TLS), pour plusieurs cancers dont le CBNPC (73).

2.1.1.2 Facteurs influençant le priming

Pour présenter efficacement, la DC doit capter l'antigène tumoral et acquérir un phénotype mature avec une expression plus importante en CMH, en molécules de costimulation activatrices impliquées dans le second signal (CD80, CD87), et en protéines de migration vers les organes lymphoïdes comme CCR7. La maturation de la DC est induite après détection des signaux de dangers tels que PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*) ou DAMP (*Damage-Associated Molecular Pattern*) via des récepteurs PRR. L'intégration de ces signaux initie la maturation de la DC est sa différenciation vers un profil inflammatoire antitumoral ou au contraire tolérogène.

La cellule tumorale en apoptose influence ces étapes. En effet, une mort immunogénique des cellules cancéreuses est à la fois source d'antigènes tumoraux ainsi que de signaux « mangemoi » (calréticuline, phosphatidylsérine) et de maturation (74,75). Ces informations sont captables par la DC et contribuent au bon déroulement de sa différenciation en un profil pro-inflammatoire. *A contrario*, lorsque la mort des cellules tumorales est peu immunogénique avec des signaux « ne me mange pas » (CD31, CD47), la phagocytose sera inhibée et la tolérance immunitaire favorisée (75).

D'autres paramètres du microenvironnement tumoral influencent le profil inflammatoire ou tolérogène des DC. En effet, les conditions physiologiques au sein de la tumeur comme l'hypoxie, des facteurs solubles (adénosine, VEGF, cytokines anti-inflammatoires) et un pH acide sont connues pour impacter négativement la fonction des DC (76,77). A titre d'exemple, dans un modèle de tumeur mammaire, l'IL-10 inhibait la production d'IL-12 pro-Th1 des cDC CD103+ infiltrant la tumeur et exprimant un fort taux d'IL-10R comparés aux DC spléniques contrôles (78). Dans ces conditions, les DC acquièrent un profil tolérogène qui se reflète par une moindre expression des molécules inhibitrices comme PD-L1 (79), promouvant l'immunosuppression et l'anergie des LT. Toutefois, le blocage de la voie de l'IL-10 permettrait de restaurer la production d'IL-12 et par conséquent la réponse antitumorale (78). D'autres stratégies thérapeutiques s'attachent à restaurer ou à amplifier l'activité inflammatoire des DC. On citera les thérapies basées sur l'administration de DC matures pulsées comme le vaccin thérapeutique antitumoral Provenge[®] ou l'utilisation d'adjuvants.

2.1.1.3 Localisation du priming, cas des structures lymphoïdes tertiaires

Après maturation des DC, il est établi que l'activation lymphocytaire T se déroule dans les SLO comme les ganglions et donc à la périphérie des tumeurs solides. Toutefois, des données rapportent la présence d'agrégats lymphoïdes ou TLS dans les tumeurs, suggérant la possibilité d'un *priming* local directement dans le tissu tumoral.

Les TLS sont des structures lymphoïdes tertiaires qui se développent après la naissance dans les tissus non lymphoïdes. Ils sont décrits avec une organisation similaire aux SLO, composée d'une zone T, d'une zone B et de vaisseaux spécialisés, des veinules à endothélium épais ou HEV (*High Endothelial Venule*). On y retrouve également des chimiokines caractéristiques des organes lymphoïdes, impliquées dans le recrutement de cellules immunitaires (CXCL13, CCL19, CCL21). Ces structures se développent à la suite d'une stimulation antigénique chronique et disparaissent après clairance de l'antigène. Elles sont retrouvées dans les zones marginales de la tumeur, mais également dans le stroma tumoral (80). Leur présence est associée, dans un grand nombre de cancers dont le cancer du poumon, à un bon pronostic (81,82), ce qui pourrait être expliqué par une signature cytotoxique Th1 et une infiltration plus forte en LT (73,81).

Ces structures pourraient être à l'origine d'une induction locale tissulaire de LT antitumoraux. Même si des arguments vont dans ce sens, ce *priming* local n'a pas été démontré à ce jour. Dans un modèle murin $Lta^{-/-}$ déplété en lymphotoxine- α , ne présentant pas de SLO, une cytokine essentielle pour la formation d'organes lymphoïdes, une réponse pulmonaire au virus de la grippe a été identifiée, en parallèle de la présence de TLS pulmonaires ou BALT (*Bronchus-Associated Lymphoid Tissue*) (83). Dans ces TLS, on retrouvait des LT en prolifération suggérant une activation des LT.

Les TLS infiltrant le CBNPC chez l'Homme sont composés d'éléments essentiels pour un priming efficace avec la présence de LT CD4+ folliculaires, de DC matures et du marqueur CD40L (84). De plus, une corrélation a été rapportée entre la présence de TLS et un plus fort infiltrat lymphocytaire en cytométrie en flux, en immunohistochimie dans le compartiment tumoral et par une analyse transcriptomique (73,85). Il s'agira dans l'avenir de mieux comprendre le rôle que tiennent les TLS dans la protection tumorale et leur impact sur le *priming* des LT antitumoraux.

Le *priming* des LT CD8+ requiert donc un environnement favorable. Il va influencer la réponse immunitaire et directement la différenciation des LT CD8+.

2.1.2 Différenciation des lymphocytes T CD8+ mémoires

La réponse en LT CD8+ se déroule en trois phases : expansion, contraction et phase mémoire (**Figure 7**). A la suite de l'activation du LT par la DC, les LT vont en effet proliférer et migrer pour éliminer la cellule cible. Après clairance de l'antigène, la majorité des LT effecteurs (ou SLEC pour *short-lived effector cell*) entreront en apoptose (contraction) et une petite quantité de LT (ou MPEC pour *memory precursor effector cell*) sera maintenue pendant une longue période et constituera le pool mémoire. La différence entre cellules effectrices et mémoires est régie par des FT et des régulations métaboliques.





Au cours d'une infection, les LT spécifiques vont rapidement proliférer et s'expandre ce qui conduira à la clairance du pathogène. La plupart des LT mourront au cours des semaines suivantes pendant la phase dite de contraction. Seulement un petit pourcentage des LT effecteurs (5–10%) survivront et initieront le pool de cellules mémoires qui sera maintenu dans le temps.

Les LT CD8+ mémoires constituent une population hétérogène par leur phénotype, leurs fonctionnalités et leur localisation (**Figure 8**). Quatre sous-populations de lymphocytes mémoires ont été identifiées : les LT centraux mémoires (Tcm), LT effecteurs mémoires (Tem), LT résidents mémoires (Trm) et plus récemment les LT souches mémoires (Tscm).



Figure 8 : Fonctions et phénotype des sous-populations de lymphocytes T CD8+ mémoires. Adaptée de Jandus C et al (87).

Les Tscm et les Tcm présentent une bonne aptitude métabolique, une meilleure persistance à long terme et une meilleure plasticité transcriptionnelle comparées aux Tem et Trm, qui correspondent aux cellules effectrices sur les sites inflammatoires. En gris se trouvent répertoriés les marqueurs murins et en violet les marqueurs humains.

Différents modèles de différenciation des sous-populations mémoires ont été décrits (87,88). Un premier modèle « *one cell one fate* » suggère que chaque cellule naïve a une différenciation prédéterminée. Le modèle « one cell multiple fates » propose que les différentes populations de LT peuvent être dérivées d'une même cellule et se différencieraient à la suite de modifications épigénétiques, au cours de l'activation ou de la réponse immunitaire via :

- des divisions asymétriques conduisant à la génération de deux cellules filles différentes,
- des intensités différentes de signaux activateurs,
- ou via des expositions à l'antigène ou aux cytokines inflammatoires.

Ces modèles restent l'objet d'une discussion au sein de la communauté scientifique.

2.1.2.1 Lymphocytes T CD8+ centraux et effecteurs mémoires

Les Tcm ont une localisation restreinte aux SLO, expliquée par leur expression de CD62L et CCR7. Ces deux molécules favorisent la rétention ganglionnaire, la lectine-L CD62L étant une molécule d'adhésion dont les ligands sont présents à la surface des cellules endothéliales et CCR7 un récepteur pour les chimiokines ganglionnaires CCL19 et CCL21. Contrairement aux Tcm, les Tem ont des capacités migratoires qui s'étendent aux tissus non lymphoïdes et donc aux tumeurs solides. Ils présentent par conséquent une absence d'expression de CD62L et CCR7. Au niveau de leurs fonctionnalités, de façon générale, les Tcm montrent un potentiel prolifératif important avec une production d'IL-2 alors que les Tem ont une meilleure capacité cytotoxique.

Même si le rôle des Tem dans le contrôle de la croissance tumorale apparaît plus évident par leurs capacités effectrices et migratoires au sein des tissus, peu d'études se sont attardées sur les rôles différentiels des Tcm et des Tem dans les tumeurs. Toutefois, les Tcm sont également impliqués dans cette réponse antitumorale (89). Le transfert adoptif de Tcm serait même plus efficace pour éradiquer la tumeur que l'administration de Tem, avec une meilleure persistance à long terme (90–92). Cette meilleure réponse pourrait notamment être expliquée par la plasticité du phénotype des Tcm. Dans un modèle murin, les Tcm avaient en effet la capacité de se différencier en d'autres populations comme les Trm, suggérant ainsi l'intérêt des Tcm comme outil thérapeutique (93).

2.1.2.2 Lymphocytes T CD8+ résidents mémoires

Depuis une quinzaine d'années, il a été mis en évidence la présence locale dans les tissus non lymphoïdes de LT CD8+ résidents, appelés Trm pour *Tissue-resident memory*. Ces cellules ne sont pas présentes dans le sang mais sont retrouvées dans les tractus respiratoire, génital, gastrointestinal, dans la peau, et dans d'autres tissus. Elles ne recirculent pas dans l'organisme. Comme la plupart des LT activés, les Trm sont caractérisés par le marqueur précoce d'activation CD69, ce qui fait que les Trm sont souvent confondus avec les LT effecteurs dans les stratégies de *gating* simples. Cette lectine de type C est impliquée dans la modulation de l'expression du FT KLF2 (*Krüppel-like Factor 2*), régulant S1PR1 (*Sphingosine 1 Phosphate Receptor 1*), responsable de la rétention des LT dans les organes lymphoïdes via un gradient de S1P (*Sphingosine 1 Phosphate*). L'absence de molécules de *homing* ganglionnaires CD62L et CCR7 et l'expression d'intégrines comme CD103 et CD49a constituent des éléments d'identification plus précis de ces Trm. Résidents dans les tissus, les Trm sont fortement impliqués dans l'immunosurveillance où ils constituent une barrière directe de défense contre les pathogènes (94). Leur rôle dans le contrôle de la croissance tumorale sera détaillé dans la partie 3.

Les Trm proviendraient des LT précurseurs mémoires KLRG1^{neg} et dériveraient aussi bien des Tem que des Tcm (93,95–97).

Concernant les mécanismes de différenciation des LT CD8+ en Trm, il apparaît que les cytokines tissulaires (IL-2, -12, -15, -18, -33, TGF- β) produites par les CPA, les cellules stromales et épithéliales aient un impact sur l'induction du phénotype de résidence. Par exemple, le TGF- β est connu pour moduler l'expression de CD103, en parallèle d'une activation du TCR. Son inhibition chez la souris par un anticorps neutralisant ou par l'inactivation de ses récepteurs induisait une réduction du nombre de LT CD8+ exprimant CD103 (97–99). Le transfert de LT CD8+ chez des souris *ll15^{-/-}* impactait également l'expression de cette intégrine (100). La persistance des Trm dans la peau, les glandes salivaires et le rein dépendrait en effet de l'IL-15, mais cette observation n'est pas vraie pour tous les tissus comme pour les organes génitaux ou l'intestin (97,101).

Les DC, sources de ces cytokines et de par leur interaction avec les LT CD8+, contribuent de façon plus générale au phénotype Trm. La coculture *in vitro* de LT CD8+ avec différentes sous-populations de DC a permis de mettre en évidence que seules les cDC1, et pas les cDC2, pouvaient induire le phénotype Trm notamment via un mécanisme dépendant de clec9a/DNGR-1 (102). Le blocage des signaux de *priming* délivrés par les cDC1 (CD24, IL-12, IL-15) modulait en effet, uniquement l'induction des Trm, mais pas celle des Tem. *A contrario*, chez l'Homme, les DC CD1c+, et non pas les cDC1 CD141+, favorisaient *in vitro* l'expression de CD103 sur les LT CD8+ de manière dépendante du TGF-β1 (103). Les DC reprogrammées via la dectine-1 induiraient également la génération d'un phénotype Trm de façon dépendante du TGF-β (104).

Les mécanismes d'induction de la signature Trm sont donc complexes et souvent liés au tissu de résidence. Puisque ce sont les principaux acteurs lymphocytaires de l'immunosurveillance au sein des tissus, un approfondissement des connaissances concernant l'induction de ces cellules pourrait permettre de mieux les générer et de mieux protéger l'organisme contre les pathogènes et les tumeurs.

2.1.2.3 Lymphocytes T CD8+ souches mémoires

Les Tscm ont été récemment identifiés et pourraient être les cellules à l'origine des populations de LT mémoires. Ils sont dotés de capacités d'auto-renouvellement et de pluripotentialité pour se différencier en sous-populations lymphocytaires. Ils expriment les FT : TCF1 (*T Cell Factor 1*) et T-bet (88).

Ce sous-type cellulaire est retrouvé en faible pourcentage dans le sang, dans les ganglions mais serait également présent dans les tumeurs (105). Une analyse transcriptomique en cellules uniques a en effet mis en évidence dans les CBNPC la présence de LT CD8+ CXCR5+ Tim-3- au profil Tscm, confirmée par leur fort potentiel prolifératif *in vitro* (106). Dans le mélanome, des LT CD8+ au profil Tscm exprimant TCF1 et PD-1 ont également été identifiés (107).

Bien que leur rôle soit principalement prolifératif, les Tscm exerceraient également des activités cytotoxiques. Dans un modèle de vaccination thérapeutique, la déplétion en TCF1 inhibait la régression tumorale initialement observée (107) ; ce résultat est cependant à modérer car TCF1 n'est pas uniquement spécifique de la sous-population Tscm puisqu'il semblerait que d'autres populations de LT CD8+ TCF1^{int}, non Tscm, présentent des propriétés effectrices plus importantes et une moindre capacité d'auto-renouvellement que les LT CD8+ TCF1^{hi} au profil semblable aux Tscm (108). Dans une autre étude, l'administration de Tscm humains, contrairement aux Tem et Tcm, favorisait un contrôle de la croissance tumorale chez des souris humanisées (109), soulignant ainsi leur rôle antitumoral.

Grâce à l'avancement des connaissances et des technologies, quatre sous-populations de LT mémoires sont donc à ce jour identifiées. Elles sont différenciables par leur signature phénotypique, leur distribution dans l'organisme et leurs fonctions. Les Trm apparaissent comme la population principale dans les tissus et pourraient donc être fortement impliqués dans l'immunosurveillance des tumeurs. Même si nous ne l'avons pas mentionné, nous noterons que cette classification est également valable pour les LT CD4+.

2.2 Infiltration tumorale des lymphocytes T CD8+

Après activation, les LT effecteurs quittent les SLO, suite à une régulation négative de S1PR1 et à une modulation positive de molécules de migration comme les récepteurs de chimiokines. Le réseau de chimiokines va permettre aux LT de se diriger dans l'organisme et donc leur recrutement ou *homing* dans le tissu tumoral grâce aux vaisseaux sanguins et aux molécules d'adhésion.

2.2.1 Chimiokines et migration

Les chimiokines sont de petites protéines majoritairement sécrétées, au rôle principalement chimiotactique. Elles participent notamment à la migration des cellules exprimant leur récepteur, via des gradients de concentration. Elles correspondent à la plus importante des familles de cytokines. Elles sont caractérisées par la présence de résidus cystéines en position N-terminale qui permet de les classer en quatre catégories : les C, CC, CXC et CX₃C (**Figure 9**). Les chimiokines exercent leur activité biologique par liaison avec des récepteurs aux protéines G qui suivent la même nomenclature que leurs chimiokines. Une chimiokine peut se fixer à plusieurs récepteurs et inversement, ce qui génère un phénomène important de redondance et de pléiotropie.

Chimiokines et migration des LT antitumoraux

Dans le microenvironnement tumoral, la tumeur et les cellules stromales et immunitaires sont les principales sources de chimiokines. Cette production cytokinique est favorisée par un environnement tumoral hypoxique, des altérations géniques et des régulations métaboliques induites dans la cellule tumorale (110) mais également par des traitements antitumoraux cytotoxiques (111,112).

L'axe chimiokine-récepteur va contribuer au trafic cellulaire intra-tumoral et ainsi réguler l'infiltrat immunitaire. A titre d'exemple, une expression fréquente de CXCR3 est retrouvée sur les TIL (113,114). Ce récepteur permet une migration via un gradient de concentration de ces ligands CXCL9 et CXCL10 présents dans la tumeur. Une concentration élevée en CXCL9 et CXCL10 est d'ailleurs corrélée avec un infiltrat tumoral en LT CD8+ plus important (112,115,116). Il a été montré notamment que la sécrétion de ces chimiokines étaient dépendantes des cDC1 CD103+ Batf3+ (3). Une autre chimiokine importante est CXCL16, unique ligand de CXCR6 exprimé par les LT activés. Dans un modèle murin de tumeur mammaire, il a été montré que la déplétion de CXCR6 réduisait l'infiltration des LT dans les tumeurs et impactait par conséquent la régression tumorale induite par les traitements cytotoxiques (117). Dans le cancer colorectal chez l'Homme, il a d'ailleurs été rapporté une corrélation entre un marquage *in situ* dense en CXCL16 et un fort infiltrat CD8/CD4 en lien avec une meilleure survie des patients (118). Nous nous intéresserons à cette voie dans le premier travail de cette thèse pour mieux comprendre son impact sur l'infiltration des LT CD8+ antitumoraux dans le cadre des cancers des voies aérodigestives supérieures et du poumon. Dans le cancer du nasopharynx, CCR5 était aussi retrouvé avec CXCR6 sur les TIL, où les cellules tumorales exprimaient leur chimiokine respective CCL4 et CXCL16 (119). L'expression de CCR5

amplifie l'infiltration des LT CD8+ dans la tumeur et favorise également leur *priming* via une plus forte expression de CD40L par LT CD4+ (120).

L'expression des récepteurs de chimiokines par les LT est donc un élément crucial pour leur infiltration dans la tumeur. Dans la conception des CAR T cells, il est ainsi question d'en forcer l'expression pour optimiser la migration des LT modifiés dans les tumeurs solides (121).

On notera toutefois que la production de chimiokines intra-tumorale peut être modulée, limitant par conséquent le recrutement intra-tumoral des cellules effectrices. La régulation de ces chimiokines est, en effet, attribuée à un mécanisme de résistance développé par la cellule tumorale pour contrer l'immunosurveillance antitumorale (125,126). Par exemple, la nitrosylation de CCL2, ligand de CCR5 notamment, par les espèces réactives de l'oxygène au sein de la tumeur limite son effet chimio-attractant (127). D'autres phénomènes épigénétiques sont également à l'origine d'une régulation négative des chimiokines (128).

Chimiokines et TLS intra-tumoraux

Le réseau de chimiokines tient également d'autres rôles comme l'activation cellulaire ou la formation des TLS. A l'état physiologique, l'expression de CCL19 et CCL21 est prépondérante dans les organes lymphoïdes et permet un recrutement et la rétention des DC activées et des LT CCR7+. D'ailleurs, comme vu précédemment, la perte de ce récepteur de chimiokine signe la sortie ganglionnaire des LT vers les tissus. Dans les tissus tumoraux, on retrouve également une sécrétion de CCL19 et CCL21 (122–124) où ces cytokines seraient impliquées avec CXCL13 dans le développement des TLS, via le recrutement de cellules CCR7+, de LB et LT CD4+ folliculaires CXCR5+.



Figure 9 : Chimiokines et récepteurs associés. Adaptée de Nagarsheth N et al (110).

Cette figure représente la liste des chimiokines en fonction de leur famille, associées à leurs récepteurs chez l'Homme et la souris. Les rectangles bleus correspondent aux interactions chimiokines-récepteurs identifiées uniquement chez la souris et les rectangles rouges chez l'Homme. Entre parenthèses se trouvent les autres appellations de ces molécules.

Chimiokines et infiltrat tumoral immunomodulateur

Les chimiokines interviennent également dans le recrutement de cellules immunomodulatrices, comme notifié dans la partie 1.4.2. L'axe CCR4/CCL22 est notamment reconnu pour contribuer à la migration intra-tumorale des Treg.

Dans ce cadre, l'administration d'un antagoniste de CCR4 amplifiait la réponse vaccinale pour l'induction de LT antitumoraux et induisait une réduction de la croissance des tumeurs murines (129). De même, le blocage de CCL2, recrutant des cellules immunomodulatrices, amplifie l'infiltrat immunitaire protecteur et réduit l'immunosuppression dans des modèles murins de cancer du poumon (130). Ce type de stratégie ciblant les axes chimiokines/récepteurs existe déjà dans un contexte infectieux pour le blocage de l'entrée via CCR5 du virus de l'immunodéficience humaine avec le maraviroc. Cette classe thérapeutique pourrait être également utilisée dans le traitement du cancer pour favoriser la migration d'effecteurs antitumoraux ou inhiber l'afflux de cellules suppressives.

Chimiokines et cellules tumorales

A noter que ces médiateurs plurifonctionnels de l'immunité sont aussi directement impliqués dans l'oncogenèse par la promotion de la croissance tumorale, de l'angiogenèse et de la formation de métastases (131). Les cellules tumorales expriment d'ailleurs des récepteurs de chimiokines. Par exemple, suite à des modifications épigénétiques, le récepteur CXCR4 est fréquemment retrouvé *de novo* sur les cellules cancéreuses du sein, bien qu'il ne soit pas exprimé par les cellules épithéliales mammaires du tissu initial (132,133). Les cellules tumorales reçoivent et intègrent donc les signaux transduits après interaction entre la chimiokine et son récepteur. Pour le cas de l'axe CXCR4/CXCL12, plusieurs phénomènes liés à la progression tumorale vont découler de son activation. Il est ainsi retrouvé une corrélation entre l'expression de CXCR4 sur les cellules tumorales et la présence de métastases (134,135).

CXCR6 peut aussi être exprimé par les cellules tumorales et participe à la migration des cellules cancéreuses via la liaison à sa chimiokine CXCL16 (136). La densité du marquage de CXCL16 dans les CBNPC a d'ailleurs été montrée comme significativement plus élevée en présence de métastases (137). L'administration intraveineuse chez la souris de cellules tumorales déficientes pour le gène *Cxcr6* réduisait ainsi considérablement le développement tumoral et le nombre de métastases pulmonaires (138).

Le blocage de ces interactions chimiokines/récepteurs pourrait s'avérer être une cible thérapeutique de choix mais il faudra également prendre en compte le rôle essentiel que ces liaisons apportent quant au *homing* tumoral des LT CD8+ et de l'immunité protectrice.

2.2.2 Réseau vasculaire tumoral et infiltration tumorale

L'entrée des LT dans les tissus et donc dans la tumeur solide se fait via les vaisseaux. Les LT y pénètrent à la suite de mouvements de roulement ou *rolling* à la surface des cellules endothéliales par des liaisons de faibles affinités entre des sélectines et leurs ligands. L'activation des molécules d'adhésion permet ensuite la fixation à l'endothélium, et finalement l'infiltration tissulaire du LT suivant des gradients de chimiokines.

Cellules endothéliales et infiltrat tumoral

Dans le cadre d'une tumeur, le réseau vasculaire est cependant perturbé et modifié à cause d'une induction désorganisée de l'angiogenèse pour répondre au besoin croissant en énergie de celle-ci (**Figure 1**) (5). L'angiogenèse tumorale génère la formation de nouveaux vaisseaux anormaux, peu organisés architecturalement, tortueux et par conséquent peu fonctionnels. Au niveau cellulaire, les cellules endothéliales sont peu cohésives. De ces défauts résultent une perméabilité vasculaire importante, une dilatation, un flux sanguin aberrant et ainsi des fuites vasculaires, ce qui limite l'infiltration et provoque des conditions d'hypoxie et d'acidité délétères pour l'immunité antitumorale (139).

Par ailleurs, en plus d'une inhibition par ces mécanismes physiques du *homing* des LT, les cellules endothéliales tumorales présentent un phénotype immature, amplifiant l'exclusion des LT hors de la tumeur. Elles sont en effet caractérisées par une réduction de leurs molécules d'adhésions (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine) et *a contrario* on remarque une induction de molécules impliquées dans le recrutement de cellules immunosuppressives comme CLEVER-1 (140,141). Ce phénotype est notamment favorisé par des facteurs solubles du microenvironnement comme le VEGF. Il est suggéré que les traitements anti-angiogéniques restaurent et normalisent l'endothélium et pourraient ainsi améliorer l'infiltration immunitaire antitumorale (142,143). On notera toutefois la présence dans certaines tumeurs, de HEV, vaisseaux spécialisés dans le trafic des LT dans les ganglions et adjacent aux TLS, comme vu précédemment dans la partie 2.1.1., et plutôt de bon pronostic.

Cellules endothéliales et immunosuppression

Les cellules endothéliales sont également impliquées dans l'immunosuppression directe par la sécrétion de molécules immunomodulatrices (TGF-β, VEGF, IDO) ou par l'expression de molécules inhibitrices (PD-L1, PD-L2) par exemple (140,144).

Il est aussi décrit que les cellules endothéliales peuvent présenter à leur surface FasL qui déclenchera l'apoptose des LT Fas+ (145,146). L'ensemble de ces phénomènes contribuera à l'induction d'un épuisement ou à la mort lymphocytaire.

L'induction d'une réponse antitumorale efficace des LT CD8+ repose donc sur leur activation par une DC, leur différenciation et leur migration dans la tumeur. Chacune de ces étapes influence, est influencée par les caractéristiques de la tumeur et impactera la densité et la qualité de l'infiltrat immunitaire tumoral. On peut ainsi classer les cancers en trois catégories : 1°) les tumeurs dites « froides », présentant un désert immunitaire souvent associé à des anomalies moléculaires de la cellule tumorale comme l'activation de la voie Wnt/β-caténine ou la délétion du gène de la phosphatase PTEN (147,148), 2°) les tumeurs où l'immunité est exclue et se trouve en périphérie, 3°) les tumeurs inflammatoires fortement infiltrées dites « chaudes » (149). Dans cette classification est sous-entendue une différence d'interaction entre les LT et le microenvironnement tumoral.

2.3 Interactions avec le microenvironnement tumoral

2.3.1 Mécanismes de rétention dans la tumeur

La tumeur est en général constituée d'îlots de cellules tumorales nichées dans un stroma contenant des fibroblastes, des vaisseaux et une matrice extracellulaire riche en collagène et en fibronectine. Les cellules immunitaires sont principalement présentes dans le stroma et cette localisation à distance des cellules tumorales est un obstacle à la protection antitumorale. Des expériences *ex vivo* dans le cancer du poumon ont montré que la disposition des fibres du stroma semblait être à l'origine de cette exclusion. En effet, cette architecture influence la trajectoire des TIL en provoquant une motilité parallèle à la tumeur et limite donc l'interaction avec la tumeur (150,151).

Il est d'ailleurs connu que les TIL peuvent exprimer des ligands des constituants de la matrice extracellulaire. A titre d'exemple, la chaîne α_1 de l'intégrine $\alpha_1\beta_1$, VLA-1, appelée aussi CD49a, est connue pour se lier au collagène I, IV et à la laminine et est retrouvée sur plus de 25% des TIL CD8+ dans le cancer du poumon, notamment des Trm (98). L'interaction entre CD49a et ses ligands pourrait contribuer ainsi à la rétention des LT dans le stroma.

De plus, l'interaction entre le LT CD8+ et la cellule tumorale se fait par la liaison TCR-CMH-I-peptide mais également par des molécules d'adhésion. La molécule CD103, chaîne α_{E} de l'intégrine $\alpha_{E}\beta_{7}$, se fixe à l'E-cadhérine présente à la surface des cellules tumorales épithéliales et caractérise notamment les Trm. On remarque de façon intéressante que la majorité des LT au contact de la cellule tumorale E-cadhérine+ expriment CD103 : 70% dans le CBNPC contre 30% dans le stroma (98). Cette localisation préférentielle intra-tumorale des LT CD103+ est également retrouvée dans d'autres cancers (152–154). Comme vu dans la partie 2.1.2., le TGF- β une cytokine immunomodulatrice fréquemment retrouvée dans les cancers et au rôle plutôt pro-tumoral est d'ailleurs capable d'induire l'expression de CD103. Dans le cancer du poumon, il accroît ainsi le recrutement des LT dans les îlots tumoraux et facilite l'adhésion aux cellules E-cadhérine+, via l'interaction du domaine intracellulaire de CD103 avec la kinase ILK phosphorylée par TGFBR1 (*activin receptor-like kinase-5*) conduisant à la transduction de la voie de la protéine kinase B PKB/AKT (155).

2.3.2 Conditions métaboliques et physiologiques dans la tumeur

Le site tumoral est un environnement pauvre au point de vue nutritionnel à cause des besoins accrus et de la dérégulation métabolique des cellules cancéreuses (5). Une hypoglycémie et un pH acide, une hypoxie, un manque d'acides aminés et une hyperkaliémie sont décrits dans le microenvironnement tumoral (156) et impactent les TIL ainsi que leurs fonctions antitumorales.

L'activité des LT activés étant dépendante d'une glycolyse aérobie, les conditions de privation glycosidique de la tumeur, en plus de l'acidose provoquée par la catalyse du glucose en lactate altèrent considérablement les fonctions cytotoxiques (157–159).

La réduction de la tension en oxygène est essentiellement causée par une angiogenèse tumorale anormale et par la forte consommation des cellules cancéreuses. L'hypoxie provoque une immunosuppression locale en favorisant la différenciation des LT CD4+ en Treg et l'expression de PD-L1 sur les macrophages, les MDSC et les cellules tumorales (160,161). Elle conduit également à une augmentation de la concentration intra-tumorale en adénosine, inhibant les LT CD8+ (162). Paradoxalement, il a été rapporté que l'hypoxie, en plus de l'hypoglycémie locale, conduit à une reprogrammation des voies métaboliques des LT et, de façon intéressante, à la restauration de leurs fonctions effectrices. Il a été rapporté que ces conditions induisaient un accroissement des signaux impliqués dans la production d'énergie via PPAR- α (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) et promeuvent ainsi le catabolisme des acides gras, excessivement présents dans la tumeur (163). De plus, cette modification de métabolisme influencerait le phénotype mémoire et les activités effectrices des LT (164,165). On notera également que le potentiel de membrane mitochondriale est également impliqué dans la cytotoxicité et la longévité des TIL (156,166,167).

En plus du glucose et de l'oxygène, les acides aminés comme le tryptophane, l'arginine ou la glutamine sont des éléments importants pour des fonctions effectrices efficaces. Leur biodistribution peut être perturbée pour des questions de consommations accrues par la tumeur ou par la présence de catalyses enzymatiques. Par exemple, comme vu dans la partie 1.4.2., il est connu que l'enzyme IDO présente dans le microenvironnement tumoral métabolise le tryptophane, réduisant ainsi ses concentrations et par conséquent l'activité antitumorale (168). Pour finir, l'hyperkaliémie au sein de la tumeur impacte la réponse immunitaire antitumorale. Dans un modèle murin de mélanome, des niveaux élevés de potassium extracellulaire présents dans les fluides interstitiels de la tumeur inhibent également la cytotoxicité des LT CD8+ (169). La mort cellulaire excessive dans la tumeur provoque en effet le relargeage dans le compartiment extracellulaire des ions K+, à une concentration jusqu'à 5 à 10 fois plus élevée que celle contenue dans le sérum. Ces données de Eil *et al.* suggéraient que la forte concentration extracellulaire serait à l'origine d'une hyperkaliémie intracellulaire provoquant le blocage des signaux en aval du TCR. La surexpression de canaux potassiques amplifiant l'efflux des ions K+ pourrait ainsi faire l'objet d'une stratégie thérapeutique pour limiter leurs effets néfastes sur l'immunité protectrice (169).

2.3.3 Conséquences sur le phénotype et la fonction du lymphocyte T

Ainsi, les interactions entre le LT CD8+ et le microenvironnement tumoral vont affecter, comme vu précédemment, sa migration, sa localisation tumorale, son métabolisme et par conséquent ses activités cytotoxiques. En plus de l'immunosuppression locale énoncée dans la partie 1.4., l'ensemble de ces phénomènes concourt à l'induction d'un phénotype épuisé ou *exhausted*. Contrairement à l'anergie causée par un défaut du second signal lors de l'activation du LT, l'état d'épuisement touche les LT activés et fait suite à une stimulation antigénique chronique.

Ce phénotype dysfonctionnel a été décrit dans plusieurs cancers dont le cancer du poumon (57) et est caractérisé par l'expression de modules de gènes codant les IC : *LAG3*, *PDCD1* (pour la protéine PD-1), *CTLA4*, *HAVCR2* (pour la protéine Tim-3). Comme vu dans la partie 1.4., la liaison entre les IC et leurs récepteurs exprimés par les cellules tumorales ou stromales conduit à la perte progressive des fonctions effectrices du LT. Cela se traduit par une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IFN- γ , TNF) et de molécules cytotoxiques (perforines, granzymes) accompagnée d'une réduction de la capacité de prolifération (171).

Cependant, ces informations sont à modérer pour certaines populations comme les Trm qui expriment de hauts niveaux d'IC, mais qui conservent une activité effectrice (154,172). Nous rediscuterons de cette caractéristique concernant les Trm dans la partie 3.4.2.

On notera toutefois que les niveaux d'expression des IC notamment de PD-1 sont importants à prendre en compte. On ne distingue pas deux populations PD-1⁺ et PD-1^{neg} en cytométrie en flux dans la tumeur, mais plutôt un continuum d'expression de PD-1 principalement séparé en trois catégories : PD-1^{hi}, PD-1^{int} et PD-1^{low/-}.

Ces trois populations présentent des profils transcriptomiques et métaboliques différents (173) avec un niveau graduel d'épuisement, proportionnel au niveau d'expression de PD-1. Les PD-1^{hi} sont notamment caractérisés par une expression accrue en IC, une perte des fonctions effectrices, une hyperclonalité du répertoire TCR et une dérégulation du métabolisme mitochondrial accompagnées d'une augmentation du catabolisme lipidique. Dans la population exprimant de faibles niveaux d'expression de PD-1, on retrouvera notamment les Tscm, comme présenté dans la partie 2.2.

Dans cette partie, nous avons vu les éléments indispensables et influant le bon déroulement de la réponse antitumorale des LT CD8+, acteurs essentiels du contrôle de la croissance tumorale. Nous avons énoncé brièvement les possibilités d'interaction entre le microenvironnement tumoral et les LT CD8+, et plus particulièrement la sous-population mémoire Trm exprimant les intégrines CD103 et CD49a. Il apparaît progressivement depuis le début du XXI^{ème} siècle que ces Trm seraient fortement impliqués dans la physiopathologie du cancer. Nous en détaillerons les principaux arguments dans la partie suivante.

3 Implication des lymphocytes T CD8+ résidents mémoires (Trm) dans la physiopathologie du cancer

3.1 Généralités sur l'étude des Trm

3.1.1 Arguments en faveur de l'existence des Trm

Les LT CD8+ Trm n'ont été identifiés qu'au début du XXI^{ème} siècle. Cette découverte tardive est expliquée du fait de leur localisation tissulaire, difficile d'accès chez l'Homme, en plus de leur similitude phénotypique avec les LT effecteurs (CD44+ CCR7^{neg} CD62L^{neg} CD69+) avec lesquels ils sont généralement confondus. Pendant longtemps, il était en effet établi que les LT tissulaires étaient recrutés depuis le sang en réponse à un stimulus inflammatoire (174) et que les tissus non inflammatoires contenaient très peu de LT. Ces cellules après la résolution de l'infection entraient en apoptose ou sortaient du tissu. Plusieurs observations et expérimentations, d'abord dans des contextes non tumoraux, ont permis au cours des vingt dernières années de mettre en lumière la propriété résidente de certains LT mémoires dans les tissus non lymphoïdes avant de les identifier comme Trm.

Des premières études en 2001 ont montré dans des modèles murins, la présence de LT CD8+ persistants dans les tissus après clairance virale, et ce pendant plusieurs mois (175–177). Chez l'Homme, dans le cadre de l'infection herpétique (HSV), des LT aux propriétés cytotoxiques subsistaient également dans la peau après résolution de l'infection (178). Gebhardt et *al*, ont montré chez la souris que ces LT CD8+ résidents de la peau ne recirculaient pas dans l'organisme et présentaient un phénotype particulier CD62L^{neg} CD122^{neg} CD69+ CD103+ CD49a+ (179). Ces cellules contribuaient à la protection en cas de réinfection par le virus HSV.

Une autre équipe mit en évidence la présence de LT CD8+ $\alpha_4\beta_7$ + dans l'intestin, considérés à l'époque comme des lymphocytes intraépithéliaux (IEL). L'administration de FTY720 ne modifiait pas le pool de LT intestinaux, suggérant qu'ils y résidaient (180). Par ailleurs, la transplantation d'intestin de souris naïve dans une souris immunisée permettait un équilibre des LT au bout de 42 jours dans les ganglions locaux mais ne permettait pas de diffusion des IEL de l'hôte dans le greffon donneur ; cette expérience confirmait donc l'hypothèse de la résidence et de la non-recirculation de ces cellules.

En 2004, une expérience de transplantation révélait aussi la présence de LT pathogènes résidents dans les tissus. Cette étude se basait sur une greffe de peau non lésionnelle d'un patient atteint de psoriasis chez une souris immunodéficiente ; elle avait induit l'apparition de lésions psoriasiques chez la souris receveuse (181).

Il a été montré que ces cellules étaient maintenues de façon indépendante du pool mémoire circulant (182). Des LT CD8+ persistaient dans le cerveau après infection par le virus de la stomatite vésiculaire. La déplétion de CD103 impactait leur rétention tissulaire (182). Cette même équipe a par la suite mis en évidence que les LT CD8+ CD103+ possédaient une signature transcriptomique unique, distincte des autres LT CD8+ CD103^{neg} retrouvés dans le cerveau et des LT spléniques (183). Une dernière observation clinique permit d'attester l'existence des Trm chez des patients atteints de lymphome T. Ces malades avaient été traités par de faibles doses d'anti-CD52 (alemtuzumab) pour éliminer les LT pathogènes CCR7+. Ils présentaient une lymphopénie, accompagnée d'un maintien du pool des LT CD8+ CCR7^{neg} de la peau dont 40% exprimaient CD103 (184,185), validant l'hypothèse d'une population résidente mémoire tissulaire.

Finalement, on notera que sans état inflammatoire, des LT tissulaires endogènes demeurent dans les tissus. Deux études dénombraient d'ailleurs près de 2x10¹⁰ LT dans la peau avec un phénotype essentiellement CLA+ CCR4+, CCR6+, CCR7^{neg} et 1x10¹⁰ dans les poumons non inflammatoires exprimant notamment VLA-1 (CD49a), CXCR4 et CXCR3 (186,187).

Par la suite, d'importants efforts ont été fournis pour comprendre la place des Trm dans l'immunité infectieuse alors que dans l'immunité antitumorale, leur intérêt n'est que récent. L'expression du marqueur de Trm CD103 sur les TIL avait cependant été décrite dès 1988 (188). Nous décrirons les méthodes d'étude des Trm, l'historique de la découverte des Trm dans les tumeurs et enfin leur phénotype.

3.1.2 Méthodes d'étude des Trm

Le terme de résidence fait référence à la localisation spatiale des LT dans un tissu donné et à leur persistance tissulaire avec une recirculation limitée. Cette caractéristique clé des Trm permet de les identifier, en plus de leur propriété mémoire. Il existe plusieurs approches expérimentales souvent complexes pour les décrire et les étudier. Ces méthodes s'inspirent essentiellement des techniques utilisées dans les modèles murins infectieux puisque très peu d'études ont été réalisées dans un contexte tumoral. Nous avons fait le choix de classer ces différentes méthodes en fonction de leur apport principal sur la connaissance des Trm : étude de leur phénotype, de leur propriété mémoire et de résidence. Cette classification est arbitraire et les techniques sont utilisables pour plusieurs catégories d'analyses.

3.1.2.1 Etudes phénotypiques des Trm

L'identification des Trm peut se faire par une étude phénotypique de leur expression des marqueurs CD45+ CD3+ CD8+ CD69+ CD44+ CD103+ CD49a+ CD62L^{neg} CCR7^{neg}. Pour éviter toutes confusions avec les autres sous-populations de LT, vues dans la partie 2.1.2., il est nécessaire d'utiliser des approches multiparamétriques en combinant plusieurs marqueurs. De plus, il est important de savoir que les Trm présentent un phénotype hétérogène inter- et intratissulaire qui sera développé dans la partie 3.2.2. et qui sera donc à prendre en compte dans le choix des marqueurs étudiés.

Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est un exemple de technique simple et rapide qui permet une analyse multiparamétrique. Cependant, elle requiert le traitement de l'échantillon en amont ; ce traitement peut nécessiter une digestion enzymatique, pouvant altérer les molécules de surface, ce qui est non négligeable. Cette technique n'élimine pas non plus la contamination de cellules sanguines circulantes mais peut être réduite par une perfusion de l'organe, possible chez la souris.

Microscopie

L'analyse d'images de microscopie peut quant à elle, exclure les cellules du sang. En plus de l'étude du phénotype, elle permet d'obtenir des données concernant la localisation *in situ* des Trm et leur interaction avec leur microenvironnement. Néanmoins, cette technique est limitée en termes de nombre de marqueurs et ne permet pas une caractérisation exhaustive. Cette affirmation est à nuancer avec le développement exponentiel de la microscopie spectrale et des analyses multiparamétriques complexes comme le système d'amplification TSA (*Tyramide Signal Amplification*) permettant de s'affranchir de l'espèce des anticorps.

Ces techniques conventionnelles d'étude protéique peuvent également être le point de départ d'analyses plus approfondies avec le recueil sélectif du matériel d'intérêt. La cytométrie en flux peut en effet être utilisée pour le tri de populations pour des études *in vitro* ou transcriptomiques. L'analyse *in situ* peut quant à elle être couplée à d'autres technologies comme la microdissection pour une étude transcriptomique. Des techniques plus modernes comme la cytométrie de masse permettent d'élargir encore plus le panel de marqueurs étudiés.

3.1.2.2 Etudes basées sur la propriété mémoire des Trm

Cinétique

Les Trm appartiennent à la catégorie des cellules mémoires. La persistance à long terme dans les tissus après clairance de l'antigène est une des caractéristiques clés des Trm qui mérite d'être utilisée pour les identifier et est d'ailleurs à l'origine de leur découverte chez l'Homme. La difficulté de ce type d'analyse reste parfois la faible quantité de Trm infiltrant les organes.

Transplantation tissulaire

La greffe tissulaire est un des outils pour également mettre en évidence le rôle des Trm. Par la transplantation d'un tissu issu d'un donneur immunisé, les cellules résidentes mémoires protectrices vont permettre un transfert de la protection au receveur naïf. Cependant, elle nécessite une chirurgie et pour certains organes, cette méthode n'est pas envisageable. La greffe peut également apporter des LT circulants, à prendre en compte dans l'analyse.

3.1.2.3 Etudes basées sur la résidence des Trm

La résidence dans les tissus et leur absence dans la circulation caractérisent les Trm. L'une des problématiques majeures de l'étude de cellules tissulaires concerne le risque de contamination par les cellules circulantes du sang, qui peut être limitée par une perfusion des organes préalablement à leur recueil.

Marquage sanguin

Une des techniques pour décrire uniquement les LT tissulaires est l'administration intraveineuse chez la souris d'un anticorps ciblant une protéine de la lignée lymphocytaire avant sacrifice. L'anticorps marquera les LT circulants et non pas les cellules tissulaires. Au cours de l'analyse, la population marquée sera exclue pour ne conserver que les cellules parenchymateuses. Cette technique nécessite une gestion du temps précise, dépend du flux sanguin et donne une information à un instant donné sans exclure les possibles recirculations en dehors de cette durée.

Parabiose

Pour étudier le rôle des Trm dans les physiopathologies, il est possible d'utiliser la propriété de non recirculation des Trm avec des parabioses. La parabiose permet, après chirurgie, un équilibre des LT circulants entre les parabiontes. Cependant, le pool de LT tissulaires résidents sera présent uniquement dans la parabionte immunisée. Un challenge par réinfection de la parabionte naïve permettra d'évaluer l'effet de la réponse immunitaire en absence de Trm et donc de façon indirecte, leur rôle. Cette technique reste néanmoins lourde par la chirurgie qu'elle nécessite en plus d'un suivi post-opératoire important des animaux.

FTY720

Il est également possible de forcer pharmacologiquement la séquestration des LT circulants dans les SLO. Le FTY720 ou fingolimod, utilisé dans le traitement de la sclérose en plaques, réduit notamment l'expression de S1PR1, la circulation des LT et par conséquent induit une lymphopénie. Dans les tissus, ne seront donc retrouvées que les cellules résidentes, sans possibilité de recrutement de nouveaux LT. Cette méthode permet un enrichissement tissulaire en Trm et la mise en évidence de façon directe du rôle des Trm dans les pathologies, en absence de LT circulants. Cependant, ce traitement n'empêche pas entièrement la circulation des LT et sur le plan pratique requiert une injection quotidienne au vu de sa demi-vie de 24 heures. Nous avons vu les modèles d'étude des Trm et de leur identification, nous allons désormais aborder leur identification dans les tumeurs solides.

3.2 Phénotype des Trm dans le cancer

3.2.1 Infiltration dans les tumeurs solides

Une étude datant de 1988 a été la première à identifier HML1/CD103 comme marqueur des TIL en immunohistochimie (188). Cette étude montrait que les TIL des tumeurs gastrointestinales exprimaient CD103 et qu'ils étaient localisés dans l'épithélium tumoral.

Dix ans après, une étude décrivit dans le cancer du pancréas l'expression de CD103, en parallèle du marqueur mémoire CD45RO, sur 20% des TIL CD8+ (189). Cette seconde étude suggérait que les TIL CD103+ étaient essentiellement localisés dans le stroma à la périphérie des îlots tumoraux.

Une étude de 2001 montrait en terme de pourcentage dans le cancer de la vessie que la majorité des LT CD8+ CD103+ étaient présents à distance de la tumeur (190): 58% des LT CD8+ exprimaient CD103 dans le compartiment tumoral contre 82% dans le stroma.

En 2003, une analyse décrivait quant à elle dans le cancer colorectal l'infiltration dans les régions tumorales avec une instabilité des microsatellites (donc des zones fortement mutées) de cellules CD103+, associées aux cellules CD8+ (191).

Ces études princeps réalisées sur de petits échantillons (<35 patients) ont permis d'assoir l'expression par les TIL de l'intégrine CD103, dans plusieurs cancers avec des localisations différentes. Depuis, des études plus approfondies ont été effectuées, sur de plus grandes cohortes de malades, de cancers, avec plus de marqueurs combinés, des techniques différentes comme de l'immunohistochimie multiparamétrique ou des analyses en cytométrie en flux.

On dénombre désormais un grand nombre de cancers pour lesquels l'infiltration en Trm est décrite : des cancers de la sphère respiratoire, uro-génitale ou gastrointestinale en passant par les cancers du sein et les mélanomes. L'expression de CD103 sur les TIL dépend de plusieurs facteurs dont la localisation tumorale, le type histologique, le stade, le sexe, l'âge et dans le CBNPC la consommation de tabac (192). Les Trm représentent d'ailleurs la population de LT CD8+ majoritaire dans le cancer de la vessie, devant les Tem (193).

La présence de TIL au profil Trm a également été décrite dans les métastases. Dans le cadre du mélanome, les métastases du poumon, de la peau et du cerveau contenaient en effet des LT CD8+ exprimant CD49a, CD103 et CD69 (194).

Si dès les premières études la localisation des LT CD8+ CD103+ a été l'une des questions posée, l'approfondissement de ce point a été poursuivi jusqu'à nos jours. Comme énoncé dans la partie 2.3.1., les études s'accordent désormais sur une localisation préférentielle des cellules CD103+ à proximité de la zone tumorale épithéliale où est exprimée le ligand E-cadhérine (98,152,195,196).

L'intégrine CD103 a donc été le marqueur principal d'étude des LT CD8+ Trm infiltrant les tumeurs dès la fin des années 80. Par la suite, ces TIL ont fait l'objet d'une caractérisation plus précise décrite dans la partie suivante.

3.2.2 Profil transcriptomique et protéomique

Les Trm jouent un rôle essentiel dans l'immunosurveillance des tissus périphériques. La caractérisation de ces cellules dans les contextes infectieux a rapidement été un enjeu scientifique pour établir leur parenté avec les autres LT et leur rôle (**Figure 10**). Dans le cancer, seules des études récentes se sont intéressées à une caractérisation plus poussée des Trm, au-delà du seul marqueur CD103. On relève des similitudes avec les Trm décrits dans les précédentes études en termes de protéines de rétention tissulaire et de cytotoxicité mais on note une plus forte expression des IC dans le cancer (192,197,198).



Figure 10 : Phénotype et fonctionnalité associés aux Trm humains. Adaptée de Kumar BV et al (199).

Les Trm non-tumoraux isolés de différents tissus possèdent des protéines de rétention tissulaire (CD49a, CD103, CRTAM) et de *homing* (CXCR6), des molécules inhibitrices (IL-10, PD-1) et pro-inflammatoires (IFN, IL-2, -17). Ils présentent une réduction des signaux de sortie ganglionnaire (CD62L, S1PR1, CX3CR1, S1PR5) et du marqueur de prolifération (Ki67) comparée aux LT CD69^{neg}. En vert, les protéines surexprimées et en rouge les sous-exprimées.

Phénotype classique des Trm dans le cancer

Dans le CBNPC, les LT CD3+ CD8+ CD103+ présentaient un phénotype caractéristique des cellules mémoires non Tcm : CD62L^{neg} CD28^{neg} CD27+/- CD45RO+ CCR7^{neg} (192). Cette étude indiquait également que cette population lymphocytaire exprimait la molécule de survie Bcl-2 mais pas KLRG1, la protéine antagoniste de CD103 qui se lie aussi à l'E-cadhérine. Toujours dans le CBNPC, les expressions de *ITGAE* (CD103) et de *CD8A* étaient associées à de faibles taux de transcrits *S1PR1, CCR7* et *SELL* (CD62L), impliqués dans la rétention ganglionnaire (172) et les LT CD8+ CD103+ avaient d'ailleurs dans une autre étude une expression réduite en *S1PR1* comparée aux TIL non CD103 (192).

On retrouve également des molécules d'adhésion comme l'intégrine CD49a (98,172,194) et des protéines impliquées dans le chimiotactisme comme les récepteurs de chimiokines CCR5, CCR6 ou CXCR6 (172,192,200).

Régulation transcriptomique

Classiquement, les Trm surexpriment les FT Hobit et Blimp-1, régulés respectivement par d'autres FT : T-bet et Runx3 (**Figure 11**). Ces molécules modulent négativement les gènes codant KLF2 et TCF-1 et les signaux de *homing* ganglionnaire en aval (S1PR1, CD62L, CCR7). D'autres FT sont impliqués dans le phénotype Trm comme Notch, NR4A1 et AhR (*Aryl hydrocarbon Receptor*) mais leurs cibles directes n'ont pas encore été identifiées. La voie de signalisation Notch pourrait contribuer à l'expression de la voie de l'IFN- γ et à la pertinence des Trm dans les tissus, comme AhR.

Dans le cancer, peu d'études se sont intéressées aux FT des TIL Trm. On voit apparaître depuis deux ans seulement des descriptions d'expression transcriptomique. La signature Trm était ainsi corrélée à un faible taux de transcrits des FT : *KLF2* (172) et *TCF7* (TCF-1) (201). Paradoxalement aux études précédentes dans des contextes non tumoraux, une analyse transcriptomique en cellules uniques sur plus de 12 000 TIL issus du CBNPC a identifié CD103 dans un cluster n'exprimant pas ZNF683 (Hobit) (200). Quant à Runx3, ce FT est impliqué dans la différenciation en Trm et sa déplétion dans les LT limitait l'infiltration des LT dans la tumeur (202).

Ces FT sont modulés épigénétiquement par le microenvironnement de la cellule. L'IL-15 est connue pour réguler le FT T-bet, dont des taux résiduels sont nécessaires à la différenciation des Trm. Cela pourrait expliquer la forte corrélation entre l'expression locale d'IL-15 et la quantité d'infiltration des Trm dans le mélanome (203).

La liaison du TGF- β avec son récepteur va, elle, favoriser l'expression de CD103 comme vu précédemment dans la partie 2.3.1., en parallèle du signal du TCR. L'administration d'un anti-TGF- β dans un modèle murin de cancer orthotopique ORL réduisait d'ailleurs le nombre de Trm infiltrant les tumeurs (98).

63



Figure 11 : Régulation transcriptomique des Trm. Adaptée de Amsen D et al (96).

L'expression de CD69 et de CD103 est médiée par plusieurs FT comme Notch, Nur77, AhR et Runx3. IL-15 et le TGF-β sont impliqués dans l'expression de T-bet et Runx3 pour l'induction de Blimp-1 et Hobit, responsables de la sous-expression des marqueurs de rétention et de *homing* ganglionnaire *S1PR1*, *SELL* (CD62L) et *CCR7*.

Phénotype associé à la fonctionnalité

Dans le cancer du poumon et du sein, les LT CD8+ CD103+ présentaient des ARN codant des molécules cytotoxiques comme *IFNG* (IFN- γ), *RAB27A* et les enzymes lytiques granzymes et perforines *GZMA*, *GZMB*, *PRF1* ou amplifiant la fonction comme *SIRPG* (172,192,204). Ce profil antitumoral est notamment confirmé par une étude en cytométrie en flux de l'expression de granzyme B et d'IFN- γ dans le CBNPC (172). D'ailleurs, les LT CD8+ CD103+ présentaient plus d'IFN- γ et de granzymes B que les LT CD8+ CD103^{neg} (204).

Aussi, en plus de leur expression de CD69, dans le cancer du poumon et de l'ovaire, les Trm présentaient un phénotype activé avec une expression de HLA-DR et du marqueur de prolifération Ki67 (201).

Nous relèverons que les Trm peuvent paradoxalement à leur rôle antitumoral exprimer des molécules immunosuppressives comme CD38, CD39 ou KIR2DL4 (*Killer cell Immunoglobulin-like Receptor 2DL4*). L'ectonucléotidase CD39 était notamment retrouvée dans plusieurs cancers dont ORL, colorectal, ovarien et dans le mélanome. Son expression était d'ailleurs corrélée avec un phénotype épuisé, caractérisé par une forte expression d'IC (201).

Phénotype épuisé

Bien que les TIL Trm présentent un phénotype activé, ils sont décrits avec une forte concentration en molécules de costimulation inhibitrices (192). Dans le cancer du col, une forte corrélation entre l'expression de CD103 et celle des IC comme *PDCD1* (PD-1), *HAVCR2* (Tim-3), *LAG3* et *TIGIT* a été observée dans la base de données du TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) (195). Cette observation a été également rapportée dans le cancer du sein sur cellules uniques (204). Ces résultats ont été confirmés au niveau protéique dans plusieurs cancers dont celui de l'ovaire, de l'endomètre, du poumon et dans le mélanome (152,192,198,203,205). Dans la classification des LT infiltrant le CBNPC de Guo et *al*, les Trm appartiennent même au groupe, appelé « épuisé », caractérisé par leur expression particulière de *LAYN* (200). LAYN ou layiline est retrouvée également sur les Trm du cancer du sein et de l'ovaire (204,206) et associée à un phénotype « épuisé » dans le cancer du foie (207).

Nous verrons dans la partie 3.4.2. le lien entre ce phénotype épuisé et la dysfonction du LT.

Même si ce sont davantage les IC inhibiteurs qu'ils expriment, ils peuvent également présenter des molécules de costimulation activatrices comme ICOS mais pas CD28 (172,192,201).

Hétérogénéité intra- et inter-tissulaire

L'analyse du phénotype Trm révèle la variabilité de la signature génétique des Trm entre les tissus. L'expression de CD103 par exemple n'est pas décrite sur tous les Trm (200,208), les chimiokines et intégrines ne sont pas les mêmes entre les tissus (209). Par exemple, $\alpha_4\beta_7$ est retrouvé sur les Trm intestinaux et CLA sur les Trm de la peau. Ces différences peuvent être expliquées par des microenvironnements distincts mais cette observation pose également la question de la plasticité du phénotype Trm.

Dans une même tumeur, des sous-populations de Trm peuvent être identifiées sur la base de leur phénotype. Deux études dans le mélanome ont mis en évidence la diversité des TIL en termes d'intégrines et de façon intéressante, le phénotype était associé à des fonctions cytotoxiques distinctes. Dans la première étude, les TIL OT-1 CD103+CD49a+ après restimulation *ex vivo* exprimaient de plus grandes quantités d'IFN-γ, de granzymes B et de PD-1, que les CD103-CD49a+ et que les cellules doubles négatives, dans un ordre décroissant (194).

Dans une autre étude, dans le mélanome métastatique, il a été identifié cinq populations de TIL CD8+ en fonction de leur expression de CD103, CD49a et CD49b, la sous-unité α_2 de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (210). La fraction CD49a+ CD103^{neg} CD49b^{neg} secrétait une multitude de cytokines contrairement aux autres populations CD49a+, capables de produire uniquement de l'IFN- γ . La population triple positive exprimait quant à elle de fort taux de perforine et d'IC. Nous avons à ce jour peu de connaissances sur ces sous-populations, que ce soit sur leur origine, leur localisation tumorale ou sur leur existence dans d'autres cancers. Un des challenges de l'étude des Trm dans le cancer est de cartographier et d'expliquer ces différences et leur impact sur la fonctionnalité de ces TIL. Dans le second travail de cette thèse, nous essayerons d'approfondir les connaissances sur ces sous-populations dans le CBNPC.

Des LT CD8+ au profil Trm infiltrent donc les tumeurs avec un phénotype proche de ceux décrits dans d'autres contextes. Ces cellules pourraient avoir une place dans l'immunosurveillance des cancers. Les arguments en faveur d'un rôle dans le contrôle de la croissance tumorale seront détaillés dans la partie suivante.

3.3 <u>Arguments en faveur du rôle des Trm dans le contrôle de la croissance</u> <u>tumorale</u>

3.3.1 Rôle pronostique

Si dès la fin du XX^{ème} siècle des études avaient permis d'identifier la présence de TIL au profil Trm, ce n'est qu'à partir de 2014 que l'on voit apparaître dans la littérature des analyses de leur impact pronostique, avec une première étude dans le cancer de l'ovaire (154). On remarque depuis une explosion exponentielle du nombre d'études du rôle pronostique des Trm dans le cancer.

Dans ces études, l'élément pronostique le plus couramment analysé reste le niveau d'expression de CD103, classé généralement en CD103^{high} et CD103^{low}. Il a ainsi été montré que l'expression de CD103 était associée positivement à la survie des patients dans plusieurs cancers répertoriés dans le **tableau 2** : cancers urogénitaux, colorectal, des voies respiratoires, du sein, de la peau. Jusqu'à présent, il n'existe qu'une seule étude ayant trouvée un impact délétère du niveau de densité de cellules CD103+ sur la survie. Cette analyse avait été réalisée dans les sous-groupes de cancers colorectaux : cancers du côlon et cancers KRAS non mutés (211).

Toutefois, il est important de noter que l'étude du rôle pronostique des Trm dans le cancer nécessite un marquage lymphocytaire T CD8+ en plus de celui de CD103 puisque l'intégrine α_E n'est pas uniquement exprimée par les LT CD8+ mais également par les LT CD4+ dont les Treg et par les cDC (98,192,204). Pour des raisons techniques, la plupart des études ne se sont intéressées qu'au seul impact du marqueur CD103, les auteurs considérant les cellules CD103+ directement comme des TIL CD8+ et les cellules CD8^{neg} CD103+ comme minoritaires (192,196,212,213). Cette distinction n'est, de plus, pas toujours explicite dans les publications. Seules quelques études, identifiables en gris dans la colonne « marqueur(s) étudié(s) » du **tableau 2**, ont en fait révélées le rôle pronostique des Trm dans le cancer.

En plus des analyses univariées, des analyses multivariées viennent consolider ces observations notamment dans le CBNPC et dans le mélanome où les cellules CD8+ CD103+ présentent un meilleur impact pronostique que les CD8+ totaux qu'ils soient CD103 ou non (98,203).

On voit apparaître dans la littérature depuis quelques mois, non pas l'étude de CD103 mais l'étude de la combinaison de plusieurs marqueurs regroupés sous le terme de « signature Trm ». Cette signature génétique montrait notamment dans le cancer du sein un bon pronostic avec un hazard ratio à 0,3, meilleur que celui de CD103 à 0,99 (204).

67

Elle contient plus de 170 gènes incluant des protéines d'adhésion (intégrines, récepteurs de chimiokines) et des molécules liées à leurs fonctionnalités (granzymes, chimiokines, IC, CD39). Cette observation était également vraie dans le mélanome où une autre signature moins dense était décrite par les marqueurs *CD8A*, *ITGAE* (CD103), *CD69*, *CD244*, et *TNFRSF18* (203). Une autre étude montrait, quant à elle, une association en fonction des stades tumoraux : dans le cancer de la vessie, l'infiltration en Trm est associée aux stades précoces les moins avancés (193).

De façon intéressante, la numération des Trm est étudiée au sein de la tumeur dans son ensemble ou alors après segmentation en stroma et épithélium tumoral. Leur puissance statistique est d'ailleurs particulièrement élevée si leur localisation est prise en compte : à titre d'exemple, les LT CD8+ CD103+ intra-épithéliaux ont un meilleur impact pronostique dans les CBNPC comparés aux Trm du stroma (212).

La problématique de ces études reste l'accessibilité du matériel, qui ne peut être que la masse tumorale du fait de la propriété résidente de Trm. Une étude effectuée sur les cellules sanguines dans le cadre du mélanome avait mis en évidence la présence de LT CD8+ spécifiques de l'antigène tumoral melan-A exprimant VLA-1/CD49a, associés à un bon pronostic (194). Cette observation témoigne de la présence de cellules au phénotype Trm dans le sang, qui pourraient donc infiltrer les tissus tumoraux et souligne bien la nécessité d'une analyse plus complète pour exclure ces cellules des analyses Trm.

Pour comprendre le rôle pronostique favorable des Trm, seront détaillés dans la partie suivante, leurs mécanismes d'action dans la protection tumorale.

Type de Cancer	Marqueur(s) étudié(s)	Technique utilisée	Nombre de patients	Grade et caractéristiques	Analyse pronostique		Dáfáranas
					Univariée	Multivariée	Rejerence
Colorectal	CD103	IHC	121 cancers du colon	T1-T4	Mauvais	Mauvais	(211)
			125 non KRAS mutés		Mauvais	Mauvais	
	ITGAE (CD103)	TCGA	492	/	Bon	Bon	(214)
		TCGA	386	/	Bon	Bon	
		FUSCC	276	T1-T4	Bon	Bon	
Endomètre	ITGAE (CD103)	TCGA	291	FIGO I-IV	Bon	/	(195)
	CD103	IHC	460		Bon	/	
	CD103	IHC	253	FIGO I-IV	Bon	NS (p=0,054)	(152)
Mélanome	Signature Trm	TCGA	/	/	Bon	/	(203)
	CD8+ CD103+	IHC	44	III	Bon	/	
	CD8+ CD103+ tétramère+ VLA-1+	CEF	18	III/IV	Bon	/	(194)
	(CD49a) sanguins			Patients vaccinés			
ORL	CD103	IHC	183	I-IV	Bon	/	(213)
	CD103+ CD39+ CD8+	CEF	62	Tout grade et HPV négatif	Bon	Bon	(201)
Ovaire	CD103	IHC	Séreux : 198	FIGO I-III	Bon	/	(154)
			Mucineux : 31		Bon	/	
			Endométrioïde : 125		NS	/	
			Cellules claires : 131		NS	/	
	CD103	IHC	84	FIGO IIb	Bon	/	(215)
			102	FIGO-IIb	NS	/	
	CD103	IHC	119	FIGO I-IV	Bon	Bon	(206)
	ITGAE (CD103) CXCL13 MSS	TCGA			1	/	
Poumon	CD103+ totaux et IE	IHC	98	Stade I	Bon	Bon	(192)
	ITGAE (CD103)	RNA-seq	698	Stade précoce	Bon	/	(172)
	CD8+ CD103+ totaux et IE	IHC	96	Т1-Т3	Bon	Bon	(98)
	CD103 IE	IHC	132 et 378		Bon	Bon	(212)
	CD103 stroma				NS	NS	
Rein	CD103	IHC	100	I-IV	Bon	Bon	(216)
Sein	CD103 IE	IHC	63	1-111	Bon	/	(153)
	ITGAE (CD103)	RNA-seq	329	I-IV	/	NS	(204)
	Signature Trm				Bon	Bon	
Vessie	CD103	IHC	302	T1-T4	Bon	Bon	(196)

Tableau 2 : Résumé des principales études du rôle pronostique des Trm dans les cancers humains.

Les lignes grises correspondent aux études ayant pris en compte le marqueur CD8 dans leur analyse pronostique. RNA-seq: séquençage ARN, CEF : cytométrie en flux, FUSCC : base de données Fudan University Shanghai Cancer Center, HPV : virus du papillome humain, IHC : immunohistochimie, IE: intra-épithéliaux, MSS: stabilité des microsatellites, TCGA : base de données The Cancer Genome Atlas.

3.3.2 Trm et protection tumorale

3.3.2.1 Rôle des Trm dans la protection tumorale

Peu d'études ont réellement prouvé la présence de Trm dans les tumeurs, autrement que par des études phénotypiques protéiques et transcriptomiques en lien avec les découvertes dans les modèles infectieux.

Notre équipe a montré que, dans un modèle murin orthotopique de cancer ORL exprimant l'antigène E7 du virus du papillome humain, des LT CD8+ CD103+ CD49a+ infiltraient les tumeurs et persistaient localement après régression tumorale (98,217). Ces cellules étaient induites par une immunisation intranasale (i.n.) par le vaccin STxB-E7 composé de la sous-unité B de la toxine de *Shigella dysenteriae* couplée à l'antigène E7. Les challenges successifs augmentaient le nombre de Trm locaux, en lien avec une régression tumorale complète (98). Sun et *al*, ont également montré dans un contexte de tumeur génitale, l'infiltration de LT CD8+ spécifiques au profil Trm $\alpha_4\beta_7$ + et CCR9+ après vaccination (218).

Pour identifier le rôle des Trm dans la protection tumorale, des techniques permettent le suivi de la croissance tumorale en absence de LT circulants. Après vaccination anticancéreuse, l'administration du FTY720 a permis de mettre en évidence la capacité des Trm à contrôler la croissance tumorale, en absence de LT circulants dans plusieurs modèles murins (93,98,219). La coopération avec les LT circulants reste toutefois nécessaire pour obtenir une réponse optimale. Milner et *al*, montrait qu'une densité en Trm plus forte, induite par la surexpression de Runx3, conduisait à un meilleur contrôle des mélanomes murins (202). Runx3, en plus de contrôler les fonctions effectrices des LT, serait impliqué dans la survie cellulaire et leur maintenance à long terme.

D'autres méthodes indirectes ont permis de montrer l'impact de l'absence de Trm sur la régression tumorale. Pour cela, il existe plusieurs modèles dont la parabiose et le blocage de la formation des Trm.

La vaccination par voie i.n. avec STxB-E7 de l'une des deux parabiontes ne permettait pas de contrôler la greffe tumorale de la parabionte naïve, bien qu'elle possède les LT circulants spécifiques de la tumeur (98).

Les blocages des voies du TGF- β ou de Runx3 ont notamment été décrits dans la littérature comme inhibiteurs de la formation des Trm. Leur déplétion réduisait considérablement la survie des souris en lien avec un plus faible infiltration lymphocytaire (98,202).

Ces études sont des preuves de plus de l'existence des Trm dans les tumeurs et de leur impact sur la survie. Leurs mécanismes d'action seront décrits dans la sous-partie suivante.

3.3.2.2 Mécanismes d'action des Trm

Spécificité tumorale

La localisation préférentielle des Trm au contact des cellules cancéreuses et leur rôle pronostique sont des arguments pour poser l'hypothèse d'une spécificité antitumorale des Trm.

Une des techniques pour détecter la spécificité des LT est l'utilisation d'un marquage tétramère. Le tétramère correspond à un couplage de quatre complexes CMH-I-peptides permettant directement l'identification du TCR associé à ce complexe. Dans le cancer de l'ovaire, un marquage tétramère pour l'antigène tumoral connu NY-ESO-1 a permis de mettre en évidence la présence de LT CD8+ CD103+ spécifiques chez un patient (220). Dans le mélanome, le marquage tétramère a permis d'identifier des LT CD8+ CD103+ ayant des TCR spécifiques de melan-A (203). Le désavantage principal de cet outil est la nécessité de connaître en amont le peptide et le CMH. Des méthodes indirectes peuvent également permettre d'étudier la spécificité des LT. Dans les cancers de la tête et du cou et le mélanome, la coculture de cellules tumorales autologues avec des LT CD8+ CD103+ montrait une expansion plus importante *in vitro* comparée à celle avec LT CD8+ CD103^{neg} (201).

Néanmoins, il ne faudrait pas exclure l'impact des Trm présents dans le tissu en amont du développement de la tumeur solide et donc non spécifiques de celle-ci. Cette hypothèse a été récemment validée dans le cancer colorectal et pulmonaire où des Trm antiviraux « *bystander* » infiltraient et présentaient les mêmes caractéristiques phénotypiques que les véritables Trm antitumoraux à l'exception de l'ectonucléotidase CD39 (221). Cette étude suggère que les Trm TIL seraient plus hétérogènes que prévu et leur réactivité vaste.
Rôle de CD103 et de CD49a

Pour comprendre l'avantage qu'ont les Trm dans l'immunosurveillance des cancers, l'analyse du rôle des deux intégrines les plus fréquemment exprimées peut apporter des informations.

Plusieurs arguments sont en faveur d'un rôle crucial de CD103 dans la protection antitumorale. En plus de la localisation avantageuse au contact des cellules tumorales, CD103 serait impliqué directement dans la fonction effectrice des LT. Un taux d'expression élevé de cette intégrine sur les LT était associé avec une efficacité de destruction de la cellule tumorale Ecadhérine+ (222). CD103 participe également à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (223). La déficience ou la neutralisation de l'intégrine montrait une réduction de l'infiltration des LT et une abolition de la régression tumorale dans les modèles murins (194,218,219,224). Son inhibition *in vitro* chez l'Homme réduisait la lyse des cellules tumorales (192).

Au niveau mécanistique, en parallèle de l'engagement du TCR, CD103 est recruté dans la synapse immunologique formée entre le LT et sa cible pour la polarisation des granules cytotoxiques d'exocytose conduisant à la destruction de la cellule cible (**Figure 12**).

En effet, CD103 permet la phosphorylation de ERK1/2 et de la phospholipase C γ 1, promouvant la polarisation des vésicules lytiques (225,226). De plus, l'interaction entre CD103 et l'E-cadhérine déclenche la phosphorylation de la kinase Pyk2 et de l'adaptateur protéique paxilline.

Cette cascade conduit à la liaison entre le domaine cytoplasmique de CD103 et la paxilline phosphorylée favorisant la migration du LT et ses fonctions cytotoxiques (227).



Figure 12 : Rôle de CD103 dans la fonction cytotoxique antitumorale des lymphocytes T CD8+ Trm. Adaptée de Mami-Chouaib F et al (226).

En parallèle de la liaison entre le TCR et le complexe CMH-I-peptide, le TGF-β, produit par la tumeur, va induire la surexpression de CD103 et par conséquent renforcer la liaison avec son ligand l'E-cadhérine, présente à la surface de la cellule tumorale. L'intégrine CD103 va également provoquer la libération des granules lytiques par un mécanisme impliquant la paxilline et ERK1/2. Le TGF-β va également moduler l'expression de la molécule d'adhésion LFA-1, en parallèle d'une sous-expression par la tumeur du ligand ICAM-1, pour échapper à la réponse antitumorale. De plus, le Trm exprime peu la molécule activatrice CD28, limitant la liaison avec ses ligands B7.

La signalisation de CD49a ou VLA-1 est quant à elle moins connue. Toutefois, sa déplétion par un anticorps neutralisant *in vivo* impactait la survie et le contrôle de la croissance tumorale en lien avec une réduction du nombre de TIL, dans plusieurs modèles murins (194,217).

Elle pourrait être impliquée dans l'activation des voies de l'IFN. Les LT VLA-1+ coexprimant ou non CD103+ sécrètent d'ailleurs de fort taux d'IFN-γ après re-stimulation ; cette production cytokinique était par ailleurs restreinte par un anti-VLA-1 (194,210).

Mécanismes cytotoxiques

Les Trm sont capables, comme tous LT CD8+, de destruction directe et indirecte de la cellule tumorale par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ et le TNF- α . Plusieurs études ont cependant montré que les Trm présentaient davantage de molécules cytotoxiques, comme vu dans la partie 3.2.2. ; l'intégrine α_E par sa liaison avec l'E-cadhérine en contribuant à la cytotoxicité, leur confère un avantage important dans la destruction de la cellule transformée. Néanmoins, la signature Trm est associée à un phénotype « épuisé », pouvant moduler la fonctionnalité du LT, que l'on commentera dans la partie 3.4.2.

Recrutement de cellules immunitaires

Les Trm peuvent produire des chimiokines comme CCL3, CCL4, CCL5 et participent ainsi au recrutement local de cellules immunitaires.

Même si les LT CD4+ en sont d'importants producteurs, les LT CD8+ sécrètent également CXCL13 (197,204,206). Comme énoncé précédemment, CXCL13 permet un recrutement des cellules CXCR5+ comme les LB, constituants essentiels des TLS dans les tumeurs. La présence de cellules CD103+ est d'ailleurs associée dans le cancer ovarien à une plus forte infiltration en LB et à une proximité avec les agrégats lymphocytaires (206). Les données transcriptomiques de la base de données du TCGA montraient une corrélation entre les gènes associés aux TLS et les LT CD103+ CXCL13+ suggérant un rôle des Trm dans la formation de ces structures (206). Nous nous intéresserons dans le second travail de cette thèse à cette association.

3.3.2.3 Aspects physiologiques

Prolifération

Les Trm sont capables d'auto-renouvellement dans le tissu (95,228). Comme vu dans la partie sur le phénotype des TIL Trm, le marqueur de prolifération Ki67 est retrouvé sur les LT CD8+ CD103+ en plus fort pourcentage que sur les LT non CD103 (172). De façon intéressante, dans le cancer du sein, une étude en cellules uniques a permis d'identifier une sous-population de Trm CD103+ faiblement représentée (1% des TIL), dite mitotique, au vu de son expression de gènes caractéristiques de la phase G2/M du cycle cellulaire (204).

Métabolisme

Alors que la fonctionnalité des LT effecteurs et des Tem requiert un métabolisme glycosidique aérobie comme vu dans la partie 2.3.2., les Trm catabolisent préférentiellement les acides gras. Ce métabolisme particulier leur confère un avantage comparé aux autres TIL puisque les acides gras représentent les composés énergétiques les plus abondants dans les tissus et dans la tumeur. Ils possèdent de grandes capacités de capture des acides gras libres par leur forte expression des transporteurs FAB4 et FAB5 (229). Ce métabolisme est par ailleurs impliqué dans la biosynthèse de molécules comme l'acétyl-coenzyme A qui promeut la traduction des ARN codant l'IFN-γ (163).

Puisque les LT CD8+ Trm sont des acteurs majeurs de la réponse antitumorale, il est intéressant d'envisager ces cellules comme outil thérapeutique.

3.4 Trm et stratégies thérapeutiques

3.4.1 Induction et vaccination locale

La meilleure méthode jusqu'à présent pour induire une réponse immunitaire avec des LT mémoires reste la vaccination. Il a été montré que certaines stratégies vaccinales avaient un plus fort potentiel pour générer les Trm.

Des études précliniques ont en effet rapporté que les voies d'administration locales induisaient plus efficacement une réponse T locale au profil Trm qu'une vaccination systémique conventionnelle. A titre d'exemple, une vaccination « prime-boost » hétérogène avec le boost administré par voie cervico-vaginale induisait une plus forte infiltration en LT exprimant $\alpha_4\beta_7$ comparée à un boost intramusculaire (218). Notre équipe a également montré que seule la vaccination i.n. et pas la vaccination intramusculaire avec le vaccin STxB-E7 permettait un contrôle optimal des tumeurs orthotopiques ORL exprimant l'antigène E7 (217). L'efficacité vaccinale dépendait dans ce modèle de l'induction de LT anti-E7 au profil de Trm CD103+ CD49a+, favorisant le *homing* et la persistance dans le site tumoral muqueux (98,217).

Cette induction préférentielle par voie locale peut être expliquée par une DC tissulaire présente sur le site d'administration, responsable de l'induction d'une signature Trm. En effet, les DC pulmonaires et pas spléniques étaient capables *in vitro* de provoquer l'expression de CD49a sur des OT-I (217). Sun et *al* ont également mis en évidence que les CPA fournissaient des signaux cytokiniques promouvant l'expression des intégrines. Ainsi, les DC de la zone cervico-vaginale induisaient l'expression d' $\alpha_4\beta_7$ sur les LT CD8+ via leur sécrétion d'acide rétinoïque (218). De la même manière, les cDC1 du poumon promouvaient l'expression de CD103 de façon TGF- β dépendante (99).

La voie d'administration apparaît donc importante à prendre en compte pour l'induction des Trm antitumoraux locaux. Le ciblage pharmacologique des DC inductrices de Trm serait également une solution pour booster la différenciation en Trm.

3.4.2 Epuisement et IPC

L'une des caractéristiques des Trm dans les tumeurs est leur forte densité d'expression d'IC. Pour définir si cette forte expression correspond à un phénotype épuisé, il est nécessaire d'étudier les dysfonctions générées. Il semble que pour les Trm IC^{high}, les fonctions cytolytiques soient maintenues ou qu'elles puissent être restaurées après re-stimulation. Les LT CD8+ CD103+ montraient une production augmentée en IFN- γ et TNF- α après stimulation par PMA/ionomycine (205). La stimulation avec un cocktail d'IL-15 et anti-CD3/CD28 permettait également de restaurer la prolifération des Trm dans le cancer de la vessie (193). Dans ce même article, une analyse épigénétique de la méthylation de *PRF1* (perforine) a permis de montrer une déméthylation de ce gène pour les Trm contrairement aux LT sanguins, qui correspondait à une plus forte cytotoxicité malgré leur importante expression d'IC. Ces analyses suggèrent que les Trm n'ont pas atteint le stade d'épuisement terminal (205).

Comme énoncé dans la partie 1.5., les IPC par le blocage des interactions entre les IC et leurs récepteurs permettent de restaurer la fonctionnalité des LT. Il apparaît évident que par leur forte expression d'IC, les Trm seraient les cibles préférentielles de ces thérapies. Pourtant, une théorie propose que les LT CD28+ seraient les principales cellules touchées par ces traitements puisque PD-1 agirait directement sur la voie de signalisation de CD28 (46,230). Les Trm exprimant faiblement CD28, ces observations suggèrent que les Trm ne seraient pas impactés par les IPC. Pourtant, plusieurs arguments sont en faveur d'un rôle des Trm dans la réponse aux IPC. La déplétion de CD103 dans un modèle murin de tumeurs rénales avait toutefois montré que l'absence de Trm impactait la réponse aux IPC (216). L'administration d'un anti-PD-1 permettait de restaurer la fonction effectrice et la prolifération des Trm (192). Des études ont permis de caractériser les cellules cibles de ces thérapies comme exprimant les marqueurs CD69, LAG3, CD62L- et CD45RO, soit des marqueurs exprimés fortement par les Trm (231–233).

Après traitement par anti-PD-1, le nombre de Trm dans le cadre du mélanome était amplifié *in situ* suggérant un impact direct des inhibiteurs sur ces cellules (203) ; cette expansion était d'ailleurs corrélée avec une meilleure réponse clinique à ces thérapies. Les tumeurs répondaient d'ailleurs plus aux IPC que lorsqu'elles exprimaient le ligand de CD103, l'E-cadhérine, témoignant d'un rôle des cellules CD103 dans la réponse aux IPC (234).

Ces informations sont cruciales quand on sait que l'un des enjeux de l'immunothérapie, devant leur impact économique, est l'identification de biomarqueurs robustes pour une meilleure sélection des patients candidats à ces traitements. La préexistence de LT CD8+ intra-tumoraux avait déjà été décrite comme potentiel facteur prédictif de réponse sans caractérisation plus poussée (17). Le mécanisme d'action précis des IPC reste donc encore à définir.

3.4.3 Transfert cellulaire adoptif de Trm

L'une des stratégies pour le traitement des tumeurs solides pourrait être l'administration de CAR T cells au profil Trm pour améliorer l'infiltrat tumoral. Le transfert de LT CD8+ déficients en CD103 avait en effet permis de montrer l'importance des Trm dans la protection contre le cancer (219). Cependant, les TIL CD8+ CD103+ ne s'expandent pas facilement *in vitro* dans les conditions standards de culture (215). Une autre solution pourrait être d'administrer des précurseurs de Trm. De façon intéressante, il a été montré que le transfert de Tcm conduisait à la génération de Trm, proposant donc la possibilité d'administrer d'autres populations pour l'obtention de Trm (93). De plus, il pourrait être possible de jouer sur les FT spécifiques des Trm pour forcer leur phénotype. Dans un modèle préclinique de mélanome, le transfert adoptif de LT CD8+ Runx3^{neg} ne présentant pas le profil Trm induit ainsi une absence de régression tumorale et de protection tumorale (202). Au contraire, l'administration de LT CD8+ surexprimant Runx3 et donc avec un phénotype Trm amplifiait la densité de TIL, retardait la croissance tumorale et améliorait la survie des souris.

Nous avons dans cette partie décrit l'infiltrat des Trm dans les cancers. Leur phénotype leur confère des avantages pour leur survie et leurs activités cytotoxiques dans les tumeurs expliquant leur impact pronostique favorable. Des questions concernant leur hétérogénéité et leur différenciation restent toutefois en suspens.

77

Objectifs

Objectifs

Le système immunitaire, et plus particulièrement les LT CD8+ résidents mémoires (Trm), jouent un rôle crucial dans le contrôle de la croissance tumorale. L'induction d'une réponse antitumorale efficace requiert une présentation antigénique optimale conduisant à l'activation du LT CD8+ et à sa migration dans la tumeur via le réseau chimiokine/récepteur. CXCR6 fait partie des molécules de *homing* exprimées par les LT CD8+ Trm et dont la chimiokine CXCL16 peut être sécrétée par les cellules présentatrices d'antigènes, épithéliales ou tumorales, mais son rôle dans l'immunosurveillance des cancers n'est pas connu à ce jour.

Les Trm ont la particularité d'également exprimer des intégrines impliquées dans leur interaction avec le microenvironnement tumoral. Ils présentent un phénotype original, hétérogène et microenvironnement-dépendant qui leur confère des avantages en termes de survie et d'activités cytotoxiques dans les tumeurs, expliquant leur impact pronostique favorable. Une meilleure connaissance de leur phénotype et de leurs mécanismes d'induction permettrait d'optimiser la réponse antitumorale.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de mieux caractériser la réponse antitumorale:

- En analysant le rôle de l'axe CXCR6/CXCL16 dans l'immunosurveillance des tumeurs ORL, apportant ainsi de nouveaux arguments concernant les mécanismes impliqués dans le recrutement des LT CD8+ dans les cancers.
- 2) En mettant en évidence l'hétérogénéité du phénotype Trm infiltrant les tumeurs pulmonaires, expliquant leur localisation distincte au sein de la tumeur et en proposant l'hypothèse d'un *priming* pulmonaire pour expliquer leur phénotype.

Travail 1

Title: *Cxcr6*-deficiency impairs cancer vaccine efficacy and resident memory CD8⁺T cells recruitment in tumor

Abstract

Introduction: Immunization route is directly correlated with cancer vaccine efficacy in case of mucosal tumor (aerodigestive and urogenital tracts). Our team previously showed that mucosal (intranasal, i.n.) and systemic (intramuscular, i.m.) vaccinations were both able to induce systemic tumor-specific CD8+ T cells but only i.n. immunization allowed an efficient control of mucosal tumor growth. Indeed, the i.n. vaccination promoted tumor infiltration of specific CD8+ T cells and especially tissue-resident memory T cells (Trm) which are crucial for a potent antitumor activity. Based on a transcriptomic analysis, we have identified a chemokine receptor, CXCR6, highly expressed by these specific Trm CD8+ T cells, induced by the i.n. vaccination. The role of the CXCR6/CXCL16 axis in cancer immunosurveillance is not known yet.

Materials and methods: To confirm the expression and understand the role of CXCR6 in cancer context, we have set up a body of experiments using heterozygous *Cxcr6*^{Gfp/+} mice, where GFP reflects CXCR6 expression and homozygous *Cxcr6*-deficient mice *Cxcr6*^{Gfp/Gfp}.

Results: We have then confirmed CXCR6 protein expression on specific Trm CD8+ T cells induced by i.n. vaccination in lung mucosa. This infiltration was correlated with an upregulation of its chemokine CXCL16 in the lung after an i.n. vaccination compared to an i.m. vaccination. Using an orthotopic head and neck tumor model, CXCR6 expression on tumor-infiltrating Trm induced by i.n. immunization has also been reported. In addition, we showed that *Cxcr6*-deficiency impairs mice survival in a prophylactic and therapeutic i.n. vaccination settings in various mucosal tumor models. In this *Cxcr6*-deficient mouse model, the loss of vaccine protection against tumor graft correlates with a clear reduction of Trm infiltration in tumor. Finally, in a cohort of human lung cancer, we have observed endogenous CXCR6+ Trm infiltrating these tumors *in situ*.

Conclusion: These results demonstrate the role of the CXCR6/CXCL16 axis as a required parameter for an optimal Trm infiltration in mucosal tumor and its therapeutic potential.

Résumé

Introduction : Lorsque la tumeur est localisée dans les sites muqueux (voies aérodigestives supérieures et inférieures, urogénitales), l'efficacité des vaccins contre le cancer est directement corrélée avec la voie d'administration. Notre équipe a montré que les vaccinations antitumorales muqueuses (intranasale, i.n.) et systémiques (intramusculaire, i.m.) étaient capables d'induire des lymphocytes T (LT) CD8+ systémiques spécifiques de la tumeur, mais que seule la vaccination i.n. permettait un contrôle de la croissance des tumeurs muqueuses. En effet, l'immunisation i.n. favorisait l'infiltration dans la tumeur de LT CD8+ spécifiques, et plus particulièrement de LT résidents mémoires (Trm), cruciaux pour une réponse antitumorale efficace. Par une analyse transcriptomique, nous avons identifié un récepteur de chimiokine CXCR6, fortement exprimé par ces LT CD8+ Trm induits par la vaccination i.n. Jusqu'à présent, le rôle de CXCR6 dans l'immunosurveillance des cancers n'est pas connu.

Matériels et méthodes : Pour comprendre l'expression et le rôle de CXCR6, nous avons mis en place plusieurs expériences de vaccination i.n. chez des souris hétérozygotes pour le gène *Cxcr6, Cxcr6^{Gfp/+}* pour lesquelles la détection de la GFP reflète l'expression de CXCR6 et chez des souris homozygotes déficientes en *Cxcr6, Cxcr6^{Gfp/Gfp}*.

Résultats : Nous avons dans un premier temps confirmé l'expression protéique de CXCR6 sur les LT CD8+ Trm du poumon après vaccination i.n. Cette infiltration lymphocytaire CXCR6+ était corrélée avec une production pulmonaire locale plus importante en CXCL16, la chimiokine de CXCR6, après vaccination i.n. comparée à la vaccination i.m. En utilisant un modèle orthotopique de tumeur ORL, l'expression de CXCR6 a également été rapportée sur les LT CD8+ Trm intra-tumoraux. De plus, nous avons montré que la déficience en *Cxcr6* impactait négativement la survie des souris dans plusieurs modèles de tumeurs muqueuses et plusieurs protocoles de vaccinations i.n. Cette perte de protection était associée à une réduction de l'infiltration intra-tumorale des Trm pour les souris déficientes en *Cxcr6*. Enfin, dans une cohorte de cancer du poumon chez l'Homme, nous avons observé des LT CD8+ Trm CXCR6+ endogènes infiltrant ces tumeurs *in situ*.

Conclusion : Ces résultats ont permis de démontrer l'implication de l'axe CXCR6/CXCL16 dans l'établissement d'une infiltration en LT CD8+ Trm optimale dans les tumeurs des voies respiratoires et par conséquent son intérêt comme outil thérapeutique.

82

Cxcr6-deficiency impairs cancer vaccine efficacy and resident memory CD8⁺ T cells recruitment in tumor

Karaki S¹*, Blanc C¹*, Tran T¹, Galy-Fauroux I¹, Anson M¹, Dransart E², Mougel A¹, Tanchot C¹, Gibault L³, Lepimpec-Barthes F⁴, Fabre E⁵, Johannes L², Golub R⁶, Tartour E^{1,7}.

¹ INSERM UMR-970, Paris Cardiovascular Research Center, Paris Descartes University, France. 56 Rue Leblanc 75015 Paris, France.

² Cellular and Chemical Biology Unit , Institut Curie, PSL Research University , U1143 INSERM, UMR3666 CNRS, 26 rue d'Ulm , Paris 75248 Cedex 05 , France.

- ³ Hopital Européen Georges Pompidou. Department of Pathology. 20 Rue Leblanc 75015 Paris.
- ⁴ Hôpital Européen Georges Pompidou. Department of Thoracic Surgery

⁵ Hôpital Européen Georges Pompidou. Lung Oncology Unit. Paris. France.

⁶ Unit for Lymphopoiesis, Department of Immunology, Pasteur Institute; INSERM U1223; Université Paris Diderot. 28 Rue du Docteur Roux, 75015 Paris France.

⁷ Hôpital Européen Georges Pompidou. Service d'Immunologie Biologique.

* These authors equally contributed to this work

Correspondence : Eric Tartour : Hôpital Européen Georges Pompidou. Service d'Immunologie Biologique. 20 Rue Leblanc 75015 Paris. France. Tel 33156093942 ; Fax : 33156092080, email : <u>eric.tartour@aphp.fr</u>

Funding : This work has been funded by Fondation ARC, INCA PLBio, Labex Immuno-Oncology, Site intégré de recherche en cancérologie (SIRIC CARPEM).

Introduction

There are different subpopulations of memory CD8⁺T cells: i) Central memory CD8⁺T cells (T_{CM}), expressing the CCR7 and CD62L lymph-node homing receptors are mainly found in secondary lymphoid organs. Effector-memory CD8⁺T cells (T_{EM}), not expressing the receptors for migration to the lymphoid organs, circulate at the periphery and in the tissue and have an effector role (i.e release of cytotoxic granules and cytokine secretion type IFN) iii) CD8⁺ memory stem cells (T_{SCM}) are weakly differentiated with high capacity of selfrenewal and proliferation and able to reconstitute the whole spectrum of populations CD8⁺T cell memory (1) iv) Resident memory CD8⁺T cells (T_{RM}) expressing retention receptors such as CD103, CD49a and CD69 are found in non-lymphoid peripheral tissues and do not recirculate. These cells are among the first cells to be able to act in the tissues (healthy and tumoral), and thanks to their local motility, they play a major role in tissue immunosurveillance (2, 3). After their activation, they also allow the recruitment of circulating immune cells via the secretion of cytokines and chemokines in order to amplify the immune response (4). These T_{RM} would be more cytotoxic, than the other CD8⁺T effector cells, since the expression of CD103 is correlated with the expression of granzymes (5). This integrin would also favor the positioning of the cytotoxic granules at the interface between the CD8⁺T cells and the tumor cell, thus inducing exocytosis of the contents of the granules (6).

The role of T_{RM} in anti-tumor immunity has recently been highlighted. Thus, in mice, it has been shown that these lymphocytes delay tumor progression (7). Our team has shown that T_{RM} specifically induced by intranasal (i.n) vaccination play an essential role in controlling the growth of head and neck and pulmonary orthotopic murine tumors (8, 9). Other studies have identified T_{RM} as key mediators of cancer vaccine targeting mucosal tumors (10, 11). In humans, these T_{RM} have been found in different types of cancer, such as in melanoma (12), in urothelial carcinoma (13) in endometrial adenocarcinoma (14) and in particular in lung cancer (8, 15).

Our team and other groups showed that a larger CD103⁺CD8⁺T cell infiltrate was associated with better survival in lung cancer, even in multivariate analysis (5, 8, 15).

In the present study, we wanted to analyze the mechanism explaining why i.n vaccination promoted the preferential intratumoral infiltration of T_{RM} in head and neck cancer and lung tumors compared to a systemic vaccination. Preliminary results from our group and others have identified CXCR6 chemokine receptor as a core marker of T_{RM} expressed in lung and head and neck derived T_{RM} by phenotypic and transcriptomic analysis, but its function was not explored (5, 8, 16-18).

CXCR6 binds a unique ligand, CXCL16 which can exist in a transmembrane and soluble form (19-21), the latter requiring cleavage from the membrane by a disintegrin and metalloproteinase domain-10 or a disintegrin and metalloproteinase domain-17 (22, 23). CXCL16 is constitutively expressed by epithelial and immune cells and can serve as alarmin to recruit cells in the inflamed site (24, 25).

CXCR6 is detected at very low levels on naive CD8⁺T cells (19) and is upregulated by priming by dendritic cells (26) or after activation (27, 28).

CXCR6 promotes homing of pathogenic lymphocytes to extralymphoid tissue such as the skin (29), the liver during hepatitis C (30), the synovium during rheumatoid arthritis (31) and the brain during experimental autoimmune encephalomyelitis (32).

CXCR6 is one of 100 genes with the greatest difference in expression between T_{RM} in the lung and Teff in the blood (33). The fact that IL-15 is required for the differentiation of T_{RM} (34, 35) and upregulated the expression of CXCR6 (36) reinforced the link between CXCR6 and T_{RM} .

The direct role of CXCR6 in the migration of specific T_{RM} to mucosal cancers (head and neck and lung cancer) has not yet been addressed as well as the specificity of this receptor for T_{RM} versus effector T cells and will be analyzed in this work.

Materials and Methods

Gene expression analysis.

Data were normalized using RMA algorithm in Bioconductor with the custom CDF versus 18 (Nucleic Acid Research 33 (20), e175). Statistical analysis was carried out with the use of Partek GS. All the data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus44 and are accessible through GEO Series accession number GSE77366:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=ghsrcweibruzvsj&acc=GSE77366.

First, variations in gene expression were analyzed using unsupervised hierarchical clustering and PCA to assess data from technical bias and outlier samples. To find differentially expressed genes, we applied a one-way ANOVA for each gene and made pairwise Tukey's post hoc tests between groups. Then, we used P values and fold changes to filter and select differentially expressed genes. DEG enrichment analysis was carried out using Ingenuity (Ingenuity Systems, USA; <u>www.ingenuity.com</u>).

Data availability. All data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (31) and are accessible through GEO Series accession number GSE77366: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=ghsrcweibruzvsj&acc=GSE77366.

Mice

Female C57BL/6J wild-type mice were purchased from Janvier Labs. *Cxcr6* ^{gfp/gfp} mice, are homozygous CXCR6-deficient mice, in which the coding region of the chemokine receptor CXCR6 has been substituted with the coding region of the green fluorescent protein eGFP. These mice were obtained from Jackson Laboratory (cat# JAX: 005693), and bred in our animal facility. Male *Cxcr6* ^{gfp/gfp} mice were crossed with female C57BL/6J mice to generate *Cxcr6* ^{gfp/+} mice. Mice were used in experiments at 8–10 week of age. All mice were housed in INSERM U970-PARCC animal facility under specific pathogen-free conditions. Experimental protocols were approved by Paris Descartes University ethical committee (CEEA 34) in accordance with European guidelines (EC2010/63).

Tumor cells

TC-1 cells expressing the HPV16 E6-E7 proteins were obtained from the laboratory of T.C. Wu (Dept of Pathology, School of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, MD). Cells were cultured in RPMI 1640 (Life Technologies) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (GE Healthcare), 1mM sodium pyruvate (Life Technologies), 1mM non-essential amino acids (Life Technologies), 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin (Life Technologies), 0.5mM 2-b mercaptoethanol (Life Technologies), and incubated at 37°C in 5% CO₂.

Vaccine and adjuvant

The STxB-E7 vaccine was produced by the chemical coupling of the N-bromoacetylated E7 43–57 peptide to the sulfhydryl group of a recombinant nontoxic Shiga toxin B-subunit variant according to previously described procedures (37). After purification, endotoxin concentrations determined by the Limulus assay test (Lonza, Aubergenville, France) were <0.5 endotoxin unit/mg. Poly-ICLC were obtained from Oncovir (Washington, USA).

Tumor challenge and vaccination protocol

Anesthetized mice were injected with 5×10^4 TC-1 tumor cells in the submucosal area of the tongue with a Hamilton Gastight syringe of 10µl, or in the mucosal part of the cheek with a 26G insulin syringe. Mice were daily monitored for survival analysis and tumor size was measured every 2-3 days with a caliper (volume mm³= (length x width x width)/2). Anesthetized mice were immunized twice at day 0 and day 14 by i.n or intramuscular (i.m) routes with STxB-E7 (20 µg) associated with Poly-ICLC (10 µg) as adjuvant for the first immunization. Total volume injected was 25 µl for the i.n route and 50 µl for the i.m route. In the prophylactic setting, tumors were grafted 7 days after the second immunization, whereas for the therapeutic setting, mice were vaccinated at days 5 and 10 after tumor graft for tongue tumor and at days 7 and 14 for cheek tumor.

Isolation of lymphocytes from Bronchoalveolar lumen (BAL) fluid, lungs, spleen

Intravascular staining was performed to discriminate between tissue-localized and bloodborne cells as described by Anderson et al (38). Briefly, 5 μg of anti-CD8a APC-efluo780 (clone 53-6-7, ebioscience/Thermofisher) was injected intravenously 3 minutes prior BAL and tissues harvest.

Bronchoalveolar lumen fluid (BAL) was obtained by flushing the lungs with PBS-EDTA 0.5 mM via a cannula inserted in the trachea (5 washes x1ml).

Lungs were perfused with PBS-EDTA 0.5 mM, and digested in RPMI-1640 medium supplemented with 1mg/ml collagenase type IV (Life Technologies/ Thermoffisher) and 30 μ g/ml DNase I (Roche). Lung were dissociated using the GentleMACS (Miltenyi Biotec, France) lung programs 1 and 2, with gentle shaking at 37°C for 30 min in between both steps.

Then, the obtained single-cell suspensions were filtered through a 70-µm strainer washed with PBS-FBS 2%, and suspended in 40% Percoll solution and layered over 75% Percoll solution (Sigma-Aldrich) and centrifuged at 600g for 20min RT. Interface cells were collected and washed.

Spleens were dissected and pressed through a $40-\mu M$ cell strainer red blood cells were lysed with osmotic lysis buffer.

Flow cytometry

After FcR blocking with CD16/32 Ab (clone 93, ebioscience/Thermofisher), cells were first incubated for 45 min at 4°C with PE-conjugated D^b-E7 _{49–57} tetramer (Immudex, Copenhagen Denmark). Then, cells were washed and stained 20min at 4°C with the following Abs: anti-mouse CD8b AF700 (clone YTS156), CD3 PercpCy5.5 (clone 145 2C11) from ebioscience), CD103 Pacific Blue mAb (clone 2E7, Biolegend/Ozyme France), CD49a Alexa 647 mAb (clone Ha31/8, Becton Dickinson, Le Pont De claix BP4 38801. France). All the cells were labelled using the live/dead cell aqua blue viability (Life Technologies/Thermofisher). Non- circulating CD8⁺T cells were defined as CD3⁺CD8a^{neg}CD8b⁺. Acquisitions were performed on BD Fortessa X20 (Becton Dickinson), and data were analyzed using FlowJo (Tree Star).

CXCL16 ELISA

Supernatants from the first BAL's washes were collected. Serum samples were prepared from blood collected from retro-orbital sinus. Proteins were extracted from perfused lungs and from spleen by using Bioplex lysis buffer (Bio-Rad) and total proteins were determined by BCA assay (Pierce) according to manufacturer's protocol.

The CXCL16 protein was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (R&D Systems).

Patient cohort

Non-treated non-small-cell lung carcinoma patients who underwent a lobectomy at the thoracic surgery department of European Georges Pompidou Hospital for which we have a frozen sample were included in this exploratory study. Control experiments have been done on non-tumoral tonsil tissues. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee (CPP IIe de France no. 2012-05-04). Informed consent was obtained from all participants.

In situ immunofluorescence staining

Tissue samples obtained at the day of lobectomy or tonsillectomy were frozen and stored at -80 °C. Frozen specimens were sectioned at 4–6 μm with a cryostat, placed on slides, air dried and fixed for 5 minutes with 100% acetone. Before incubation with antibodies, endogenous biotins and Fc receptors were blocked with anti-mouse CD16/CD32 (eBioscience) for 15 minutes, followed by the use of avidin/biotin blocking kit (Vector). The quadruplex staining was performed using three labeled and an unlabeled primary antibody followed by biotin-labelled secondary antibody and a fluorophore-labelled streptavidin: CD8 (eBioscience), CXCR6 (R&D Systems), CD103 (eBioscience) and E-cadherin (Biolegend) as detailed in Table S1. Isotype-matched antibodies were used as negative controls. Nuclei were highlighted using DAPI mounting medium.

Slides of stained tonsils were read with the Axio imager Apotome and analysed with ImageJ software.

Slides of stained lung sections were read with a Vectra[®] automated microscope. An associated cell analysis software, inForm[®], integrates these various signals, allowing a multiplex staining protocol. As recommended for multiplex analysis, single-stained (FITC, Cyanine 3, Alexa Fluor 594 and APC) and on-stained slides were analyzed with InForm[®] to integrate the corresponding spectra into a fluorescence library.

Statistical analysis

Data are presented as means \pm sem. Statistical comparison were done with Prism 6 GraphPad Software (San Diego, CA). Analysis of difference between 2 groups was performed with Mann-Whitney t test, analysis of difference between more than 2 groups was performed with a one-way ANOVA and Bonferroni or Tukey post-hoc. Mice survival was estimated using the Kaplan-Meier method and the log-rank test. *P* values lower than 0.05 (*) were considered significant.

Results

CXCR6 expression is upregulated on CD8⁺T cells with a T_{RM} phenotype induced by i.n vaccination

Previous studies from our group showed that in contrast to the spleen derived $E7_{39-47}$ -specific CD8⁺T cells induced by i.m immunization, the BAL's $E7_{39-47}$ -specific CD8⁺T induced by i.n immunization express the core gene defining T_{RM} (Itgae (CD103), Itga1 (CD49a) and Itgb1 which associates with Itga1 to form the VLA-1 integrin) (8). We have completed this analysis and we have shown, by a transcriptomic analysis, (Figure 1 Right) that $E7_{39-47}$ -specific CD8⁺T with a T_{RM} phenotype induced by i.n immunization in the BAL preferentially express CXCR6 compared to those induced after i.m immunization in the spleen (fold change 6.2, p = 0.00035).





Mice were immunized via i.n. or i.m. routes (n = 4 mice per group) with STxB-E7 and the adjuvant α -GalCer (prime D0) and boosted at D14 with STxB-E7. At day 21, the BALs from the i.n. immunized mice and the spleens from i.m. immunized mice were collected. CD44^{hi}Tet⁺CD8⁺T cells were sorted and the RNA was extracted. Whole gene expression microarray analysis was performed according to the procedure described in the methods section. Left : total gene analysis already reported in ref 8 and not detailed here. Right : Focus on the expression of CXCR6 by T_{RM} cells. Top : BALs CD8⁺Tcells (Lane 1, 2, 3) showed a typical T_{RM} gene expression profile (CD103⁺, CD49a⁺), which was not observed in splenic CD8⁺T cells (lane 4, 5 and 6) (red square = overexpressed/green square = underexpressed).

Bottom : Table of the transcriptomic characteristics of the *Itga1, Itgb1, Itgae* and *Cxcr6* RNAs, with their p-value and the "fold change". The "fold change" represents the difference in quantity between the genes expressed by the CD8⁺ T cells from the BAL after i.n immunization or from the spleen after i.m immunization. These extractions were reproduced at least three times.

CXCR6 is expressed on specific CD8⁺T cells and resident memory T cells (T_{RM}) in the airway and in the tumor after IN vaccination

To investigate the potential role of CXCR6 in the establishment of lung-homing CD8⁺ T cells populations, we examined the expression of CXCR6 in lung-specific CD8⁺ T cells. For the determination of CXCR6 expression, we used heterozygous *Cxcr6 ^{gfp/+}* mice, in which one allele of the *Cxcr6* gene has been replaced by the coding region of *gfp* (39). In these experiments, *Cxcr6 ^{gfp/+}* mice were firstly i.n. immunized with STxB-E7 at D0 and D14 then BAL and spleen were harvested at D21 (fig 2A). We then analyzed by flow cytometry CXCR6 (GFP) expression on E7_{39–47}-specific CD8⁺T cells and on T_{RM} cells defined as CD8⁺ T cells expressing CD103 and/ or CD49a (8). We found 22% and 0.13% of E7_{39–47}-specific CD8⁺T cells in the BAL and spleen respectively.

Among those $E7_{39-47}$ -specific CD8⁺T cells, 77% expressed CXCR6 (GFP) in the BAL after i.n. immunization (Fig 2B). However, 59% of non-specific $E7_{39-47}$ -specific CD8⁺T cells also express CXCR6 (Fig 2B). However, no CXCR6 expression was detected in the spleen after i.n. immunization on the few spleen $E7_{39-47}$ -specific CD8⁺T cells.

Among $E7_{39-47}$ -specific CD8⁺T cells in the BAL, 90% were T_{RM} cells (defined as CD49a⁺CD103⁺, CD49a⁺CD103⁻ and CD49a-CD103⁺ cells). CXCR6 (GFP) was expressed in 78.7% of these TRM (Fig 2B Right). We also observed that 76.9% of effector memory CD8⁺T cells defined as CD103^{neg}CD49^{neg} expressed CXCR6 (GFP) in the BAL. No CXCR6 expression was detected in the spleen after i.n immunization on the few spleen $E7_{39-47}$ -specific CD8⁺T cells (Fig 2C Left). These cells did not present a T_{RM} phenotype (Fig 2C Right)

We also confirmed, at the protein levels, CXCR6 (GFP) expression on $E7_{39-47}$ -specific CD8⁺T cells and T_{RM} cells infiltrating tumor in an orthotopic tumor model (lingual tumor) after i.n vaccination (Fig 2D and E). Among the $E7_{39-47}$ -specific CD8⁺T cells, 86% of the TRM expressed CXCR6, while this chemokine receptor could be detected in 87% of the effector memory T cell population (fig 2E Right).

92



Figure 2 : CXCR6 is expressed on specific CD8⁺T cells and resident memory T cells (T_{RM}) in the airway and in the tumor after i.n vaccination

Cxcr6 ^{+/gfp} mice were vaccinated with STxB-E7 by i.n at day 0 and day 15 (A). At Day 21, the expression of CXCR6 was analyzed on non-specific and specific H-2D^b-E7₄₈₋₆₇⁺ CD8⁺T cells (Left), as well as on T_{RM} (Boolean gate H-2D^b-E7₄₈₋₆₇ ⁺ CD103⁺CD49a⁺; CD103⁺CD49a^{neg}; CD103^{neg}CD49a⁺) and on non- T_{RM} cells (CD103^{neg}CD49a^{neg}CD8⁺T cells) (Right) in the BAL (B), and in the spleen (C). *Cxcr6^{+/gfp}* were grafted with TC-1 cells (5x10⁴) in the sublingual mucosa (IL: intra-lingual), then vaccinated by i.n route at day 5 and 10 (D). At day 15, tumors were harvested, then CXCR6 was analyzed on on non-specific and specific H-2D^b-E7₄₈₋₆₇ CD8⁺T cells (Left), as well as on T_{RM} (Boolean gate H-2D^b-E7₄₈₋₆₇+CD103⁺CD49a⁺; CD103⁺CD49a^{neg}; CD103^{neg}CD49a⁺) and on non- T_{RM} cells (CD103^{neg}CD49a^{neg}CD8⁺T cells) (Right) All data are representative from 2 independent experiments, 5 mice per group were included.

Cxcr6 deficiency impairs induction of specific CD8⁺T cells in the airway after i.n vaccination

We investigated the role of CXCR6 in the induction of $E7_{39-47}$ -specific CD8⁺T cells and T_{RM} cells in the BAL and in the spleen using mice lacking this chemokine receptor (*Cxcr6^{afp/gfp}*). We observed a statistically reduction in the total number of CD8⁺ T cells $E7_{39-47}$ -specific CD8⁺T cells and T_{RM} cells in the BAL of *Cxcr6*-deficient mice compared to C57BL/6 wild-type mice (Fig3C). The ratio of $E7_{39-47}$ -specific CD8⁺T to total CD8⁺T cells also decreased in *Cxcr6*-deficient mice (Fig 3C Right). However, the percentage of T_{RM} among $E7_{39-47}$ -specific CD8⁺T cells did not differ between wild type mice and *Cxcr6*-deficient mice after i.n vaccination. In contrast, the total number of CD8⁺T cells, as well as the total number of $E7_{39-47}$ -specific CD8⁺T cells and the ratio of $E7_{39-47}$ -specific CD8⁺T cells on total CD8⁺T cells in the spleen was similar between the wild type and the *Cxcr6*-deficient mice (Fig 3B and D).





Figure 3 : Induction of specific CD8⁺T cells in the airway is impaired in Cxcr6 deficient mice after i.n vaccination

C57BL/6 or *Cxcr6^{afg/gfp}* mice were vaccinated with STxB-E7 by i.n route (prime day 0/ boost day 14). At day 21, BAL was harvested and spleen collected. Specific H-2D^b-E7₄₈₋₆₇⁺ CD8⁺T cells (gated on CD8⁺T cells were measured in BAL (A) and spleen (B) and the percentage of T_{RM} were measured in BAL (A). Percentage and absolute numbers (#) of specific H-2D^b-E7₄₈₋₆₇ CD8⁺T cells and total CD8⁺T cells were evaluated in BAL (C), and in the spleen (D). Percentage of T_{RM} on H2D^bE7₄₈₋₆₇ and total number of H-2 D^bE7₄₈₋₆₇ ⁺ T_{RM} was also measured in the BAL (C). Histograms are mean ± sem from 2 independent experiments (7-9 mice per group). Analysis of difference within groups were performed with Mann-Whitney t-test.**P < 0.01

Cxcr6 deficiency partially reversed cancer vaccine inhibition of tumor growth in orthotopic head and neck tumor models

To assess the consequence of CXCR6 deficiency in the recruitment of CD8+T cells in the tumor microenvironment and the control of tumor growth, we set up two orthotopic models using TC-1 tumor cell grafted in the cheek and in the tongue.

C57BL/6 wild type or *Cxcr6* ^{gfp/gfp} mice were challenged with TC-1 cells in the submucosal lining cheek (IC = intra-cheek), then vaccinated or not with STxB-E7 by i.n route at day 7 and 14, and tumor volume was monitored. C57BL/6 wild type vaccinated mice showed significant inhibition of tumor growth based on the measurement of tumor weight in comparison to non-vaccinated mice (Fig 4A-C). In contrast, we observed a partial reversion of the blockade of the tumor growth by the vaccine in *Cxcr6* ^{gfp/gfp} mice (Fig 4A-C).

To confirm these results in a second orthotopic tumor model, C57BL/6 wild type mice and *Cxcr6 gfp/gfp* mice were grafted in the sublingual mucosa with TC-1 cells and vaccinated prophylactically (before the graft)(Fig 4D) or therapeutically (after the graft)(Fig 4E) with STxB-E7 by i.n. route.

In both setting, all vaccinated C57BL/6 wild type were alive at day 60 for prophylactic model (Fig 4D) and at day 25 for therapeutic model (Fig 4E). In *Cxcr6^{gfp/gfp}*, only 60% of vaccinated *vaccinated mice* were alive in both models at the same time points. Survival curves indicate that vaccinated *Cxcr6^{gfp/gfp}* mice had a worse survival compared to vaccinated C57BL/6 wild type mice.

These results clearly indicate that impairment of CXCR6 expression has a negative impact on antitumor immunity.



Figure 4 : Cxcr6 deficiency impairs tumor control in orthotopic tumors

C57BL/6 or *Cxcr6*^{afg/dfp} mice were grafted in the submucosal lining cheek (IC: intra-cheek) with TC-1 tumor cells, then vaccinated or not with STxB-E7 by i.n at day 7 and 14. Tumor weight was weighed at day 20 (B, C). Analysis of difference within groups were performed with a two-way ANOVA and Tukey post-hoc (mean \pm sem). In a second orthotopic model, TC-1 were grafted in the sublingual mucosa (IL: intra-lingual), mice were then vaccinated by a therapeutic (D) or prophylactic protocol (E) and survival was monitored and compared between groups with Kaplan-Meier curve (log rank test). All data are representative from 2 independent experiments, 5-10 mice per group were included. *P < 0.05; **P < 0.01; **** P < 0.001; ****P < 0.001

Cxcr6 deficient mice exhibit a decrease of CD8⁺T cell infiltration in head and neck tumor after i.n vaccination

We then address whether this partial loss of tumor control after vaccination is associated with a reduction of intratumoral infiltration by CD8⁺T cells. C57BL/6 wild type or *Cxcr6* $^{gfp/gfp}$ mice were grafted in the submucosal lining cheek with TC-1 tumor cells, then intranasally vaccinated or not with STxB-E7 at D7 and D14. A statistically significant decrease of intratumoral absolute number of CD8⁺T cells, total H-2D^b-E7₄₈₋₆₇ CD8⁺T cells and H-2D^b-E7₄₈₋₆₇ T_{RM} cells was observed in *Cxcr6* $^{gfp/gfp}$ in comparison with C57BL/6 wild type mice (Fig 5A, B and C).





C57BL/6 or *Cxcr6^{gfg/gfp}* mice were grafted in the submucosal lining cheek (IC : intra-cheek) with TC-1 tumor cells, then vaccinated or not with STxB-E7 by i.n route at day 7 and 14. Total number (# abs number) of CD8⁺T cells, specific H-2D^b-E7₄₈₋₆₇ tetramer⁺ CD8⁺T cells and tetramer positive T_{RM} cells (CD103⁺CD49a⁺; CD103⁺CD49a^{neg}; CD103^{neg}CD49a⁺) were analyzed in the tumor (A,B,C). Analysis of difference within groups were performed with a two-way ANOVA and Tukey post-hoc (mean ± sem)

All data are representative from 2 independent experiments, 4-5 mice per group were included. * P < 0.05; **P < 0.01 ; **** P < 0.001; **** P < 0.0001

CXCL16 is induced in the airway only after i.n vaccination

The chemokine CXCL16 is the only known ligand for CXCR6 (19). To explain why the i.n route is more efficient to recruit CD8+T cells in the lung than the i.m route of administration, we determined whether CXCL16 was differentially induced in the lung after the mucosal or systemic route of vaccination. C57BL/6 wild type mice were immunized with one injection of STxB-E7 by i.n or i.m route and CXCL16 levels was measured at different time after immunization (24h, 48h and 72h) in the BAL, the lung and serum.

A statistically significant higher increase of CXCL16 was detected in the BAL (Fig 6A) and in the lung (Fig 6B) after i.n immunization compared to i.m immunized mice and naive mice. This increase in the BAL and the lung peaked at 48 hours and started to decrease at 72 hours (Fig 6A and B).

A slight increase of serum CXCL16 was observed in both immunized group but it was not statistically significant compared to naïve group (Fig 6 C).





C57BL/6 were immunized by i.n or IM route with STxB-E7 and poly-ICLC. CXCL16 level was measured by ELISA in the LBA, the serum and within protein lysate from lung at 24h, 48h and 72h post vaccination. The data shown (mean \pm sem) are from one representative experiment, 2 independent experiments were done with 4 mice per group. Analysis of difference within groups were performed with a one-way ANOVA and Tukey post-hoc. *P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; ****P < 0.0001

Endogenous CD103⁺ and CD103^{neg} CD8⁺ T cells infiltrating human lung carcinoma express CXCR6

To validate the expression of CXCR6 on tumor-infiltrating CD8⁺ T cells, we set up an *in situ* staining of CXCR6 in human tissues. We firstly validated this staining on human tonsil. We observed CD8⁺ T cells expressing CXCR6⁺ and/or CD103 (Fig 7A). We then reproduced the staining on human lung carcinoma and we observed *in situ* endogenous CD103⁺ CD8⁺ T cells infiltrating human lung carcinoma expressing CXCR6 (Fig 7B). We also observed CXCR6⁺ CD103^{neg} CD8^{neg} (Fig 7B). Interestingly as already reported some tumor cells expressed CXCR6 (40) (Data not shown). The expression of CXCR6 was rather rare and heterogeneous and therefore difficult to count accurately.





Frozen tissue sections derived from human tonsil (A) and lung carcinoma (B) patients were stained by immunofluorescence with antibodies directed against human CD8 (green), CXCR6 (white), CD103 (red) and E-cadherin (blue) for lung tissues only. The E-cadherin staining identifies the carcinomatous nests. The colocalization of CD8, CXCR6, CD103 and E-cadherin markers can be detected by merging the mono-staining pictures. The white arrows indicate CXCR6+ CD103+ CD8+ T cells, the green CXCR6+ CD103^{neg} CD8+ T cells and the blue CXCR6^{neg} CD103^{neg} CD8+ T cells. Staining with isotypes controls was included for each experiment (original magnification x200).

Discussion

During this study, we confirmed at the protein level that CXCR6 is mostly expressed on effector CD8⁺T cells and T_{RM} , whereas memory CD8⁺T cells of the spleen did not express this receptor after vaccination. Unexpectedly, T_{RM} do not express more CXCR6 than non-resident antigen-specific CD8⁺T cells in the lung after i.n vaccination.

The vaccination of Cxcr6 deficient mice causes a defect of recruitment of total CD8⁺T cells in the lung and also a decrease in antigen-specific CD8⁺T cells, whether they express resident markers or not. In contrast, this decrease in total or antigen-specific CD8⁺T cells was not observed in the CD8⁺T cells derived from the spleen of CXCR6 deficient mice.

Regarding the role of this CXCR6-CXCL16 axis in the homing of CD8⁺T cells in the lung, a decrease of CD8⁺T cells in the lung in CXCR6 deficient mice has also been reported in infectious models, while the proportion of these cells remained stable in spleen and bone marrow (27).

In order to evaluate the consequences of this CD8⁺T cell migration defect in a tumor context, we have shown that CXCR6 deficient mice bearing an orthotopic tumor in the head and neck are less well protected by an HPV vaccine both in prophylactic and therapeutic vaccination. It is the first report on the direct role of CXCR6 in anti-tumor immunity.

We have not formally demonstrated that the defect of CXCR6 in CD8⁺T cells explains directly the partial loss of vaccine efficacy. Nevertheless, we previously showed that this selected TC1 epithelial tumor model, expressing the E6-E7 protein from HPV depended on CD8⁺T cells, because in the absence of CD8⁺T cells and especially resident memory CD8⁺T cells, the effectiveness of the vaccine was abolished (8, 9). Furthermore, we have shown in the present study that the microenvironment of tumors derived from CXCR6-deficient mice and vaccinated with a therapeutic vaccine against HPV E7 protein is less infiltrated by total and antigen-specific CD8⁺T cells as well as resident memory CD8⁺T cells (Fig 5).

This role of CXCR6 associated with a protective phenotype has also been observed in an infectious model. Indeed, when CXCR6 ⁺ and CXCR6 negative CD8⁺T cells were isolated and sorted from the lung of mice previously immunized with an anti-mycobacterium vaccine and injected into naive mice, then challenged with mycobacterium tuberculosis, mice transferred with CXCR6 ⁺ CD8⁺ cells were better protected than mice receiving CXCR6 negative CD8⁺T cells (41).

CXCR6 does not appear to be involved in the functional activity of CD8⁺T cells, because CXCR6 expressing or non-expressing memory CD8⁺T cells produce similar concentrations of cytokines and exhibit equivalent levels of markers of cytotoxicity (42). However, other studies have reported different cytokine profiles between CD4⁺T cells expressing or not CXCR6 (43).

Previous study did not support a role of CXCR6 in T cells priming (27). However, in the present study, we reported a decrease in the ratio of E7_{39–47}-specific CD8⁺T to total CD8⁺T cells in *Cxcr6*-deficient mice (Fig 3C). CXCL16 is expressed at the membrane of dendritic cells (44), which may favor a prolonged interaction between antigen presenting cells and CXCR6⁺CD8⁺T cells resulting a better T cell activation and amplification (45).

Earlier work by the team had shown that i.n vaccination induced higher concentrations of antigen specific CD8⁺T cells in the lung or head and neck parenchyma than systemic vaccination (8, 9). The present work has found that these intrapulmonary CD8⁺T cells expressed CXCR6 as already observed in lung derived CD8⁺T cells from i.n immunized mice with recombinant virus (41, 46). The mechanisms explaining this preferential recruitment of CD8⁺T cells in the lung or the head and neck tumor microenvironment are poorly defined. We have shown that lung dendritic cells rather than spleen derived dendritic cells can induce an increase of CD49a on CD8⁺T cells which may explain the phenotype of T_{RM} induced cells, but not the step of migration. In this work, we report that i.n vaccination induces in the bronchoalveolar lavage fluid and lung parenchyma a much greater increase in the chemokine CXCL16 than the i.m vaccination. This increase of CXCL16 is not observed in the serum of the mice vaccinated, whatever the route of administration. This local increase in CXCL16 may explain the preferential recruitment of CXCR6-expressing CD8⁺T cells into the lung and the impact of loss of expression of this receptor on CD8⁺T cell migration into the lung. However, we could not also exclude a role of the CXCL16- CXCR6 axis in the persistence of CD8⁺T cells in the lung as already suggested in another study (24). CXCL16 can be produced by bronchial epithelial cells, dendritic cells, LTs (Kim CH JCI 2001), alveolar macrophages (47). The origin of pulmonary CXCL16 induction after i.n vaccination remains to be determined. The Demaria group reported that irradiation induced the production of CXCL16 by murine and human tumor lines. Interestingly, in mice deficient for CXCR6, irradiation no longer resulted in recruitment of CD8⁺T cells (48).

Nevertheless, the CXCL16-CXCR6 axis is not specific to the head and neck or pulmonary tissue, because the expression of CXCR6 was found on T cells in a context of inflammatory colitis (43) in psoriatic skin (49) and on iNKT cell in the liver (19, 50). CXCR6-deficient CD8⁺T cells have a reduced number of T_{RM} in the skin (29). There is a correlation between CXCL16 expression by colonic tumors and infiltration by T lymphocytes which is also associated with a good prognosis (51).

The absence of CXCR6 does not reverse totally the role of cancer vaccine on the inhibition of tumor growth. Other chemokine receptors such as CXCR3 may also be involved in CD8⁺T cell migration into the lung (36). It has been shown that CXCR3 and CCR5 are also important for promoting CD8⁺T cell homing into the lung (52-54). T cells present in the BAL of sarcoidosis patients co-expressed CXCR6 and CXCR3 (36). Transcriptomic analyzes showed that T_{RM} expressed CXCR6, CCR5, and CXCR3 (33).

In terms of extrapolation of this work in humans, we have shown that CXCR6-expressing CD8⁺T cells can be detected in lung tumors. These CD8⁺T cells could be of T_{RM} phenotype or not confirming our results in mice. More generally, CXCR6 ⁺ T cells in particular CD8⁺T cells were found in tumor sites, where it could play a role in immunosurveillance (48, 55). Initially, CXCR6 was used to identify effector CD8⁺T cell populations (26). Single cell analysis of sorted CD8⁺T cells from lung tumors in humans clearly confirm that CXCR6 can be expressed on resident CD8⁺T cells , but also on CD8⁺T cells that do not express the Hobbit transcription factor associated with T_{RM} nor CD103 (56).

CXCR6 therefore appears much more like a marker of CD8⁺T cells present in the lung, than a specific marker of resident CD8⁺T cells. These results are consistent with previous results showing the expression of CXCR6 on T cells derived from bronchoalveolar lavage fluid from asthmatic patients (47), while the expression of CXCR6 on CD8⁺T cells present in the blood or the lymphoid organs (lymph node, spleen) was very weak. Nevertheless, we can not rule out the fact that CXCR6-expressing of CD8⁺T cells is a precursor population of T_{RM} such as effector memory T cells (57).

Overall, we show in this work that the presence of CXCR6 on CD8⁺T cells is an important factor for the migration of these cells in the lung, not specific for T_{RM} , but rather for CD8⁺T cells present in lung.

103

The transduction of CXCR6 in CAR T cells could improve their migration in solid tumors such as lung cancers and other tumors (pancreas, head and neck, stomach, ovarian, renal ...) producing CXCL16.

The absence of CXCR6 reduces the effectiveness of anti-cancer vaccine administered nasally. Local induction in the lung parenchyma of high concentrations of CXCL16 during nasal administration compared to a systemic route of administration may contribute to the preferential recruitment of CD8⁺T cells in the pulmonary mucosa after vaccination. Development of strategies to amplify this natural phenomenon such as the use of CXCL16 as an adjuvant should be tested in the use of future vaccine targeting pulmonary virus or lung or head and neck cancer.

Ackowledgments :

We thank the staff of the tumor banks of European Georges Pompidou Hospitals (D Geromin and M Largeau) for providing the sample materials and the Histology platform of PARCC European Georges Pompidou Hospital (C Lesaffre).

References

1. Gattinoni L, Speiser DE, Lichterfeld M, Bonini C. T memory stem cells in health and disease. Nat Med. 2017;23(1):18-27.

2. Beura LK, Mitchell JS, Thompson EA, Schenkel JM, Mohammed J, Wijeyesinghe S, et al. Intravital mucosal imaging of CD8(+) resident memory T cells shows tissue-autonomous recall responses that amplify secondary memory. Nature immunology. 2018;19(2):173-82.

3. Granier C, Blanc C, Karaki S, Tran T, Roussel H, Tartour E. Tissue-resident memory T cells play a key role in the efficacy of cancer vaccines. Oncoimmunology. 2017;6(11):e1358841.

4. Schenkel JM, Masopust D. Tissue-resident memory T cells. Immunity. 2014;41(6):886-97.

5. Ganesan AP, Clarke J, Wood O, Garrido-Martin EM, Chee SJ, Mellows T, et al. Tissueresident memory features are linked to the magnitude of cytotoxic T cell responses in human lung cancer. Nature immunology. 2017.

6. Le Floc'h A, Jalil A, Vergnon I, Le Maux Chansac B, Lazar V, Bismuth G, et al. Alpha E beta 7 integrin interaction with E-cadherin promotes antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis. J Exp Med. 2007;204(3):559-70.

7. Dadi S, Chhangawala S, Whitlock BM, Franklin RA, Luo CT, Oh SA, et al. Cancer Immunosurveillance by Tissue-Resident Innate Lymphoid Cells and Innate-like T Cells. Cell. 2016;164(3):365-77.

8. Nizard M, Roussel H, Diniz MO, Karaki S, Tran T, Voron T, et al. Induction of resident memory T cells enhances the efficacy of cancer vaccine. Nature communications. 2017;8:15221.

9. Sandoval F, Terme M, Nizard M, Badoual C, Bureau MF, Freyburger L, et al. Mucosal Imprinting of Vaccine-Induced CD8+ T Cells Is Crucial to Inhibit the Growth of Mucosal Tumors. Sci Transl Med. 2013;5(172):172ra20.

10. Cuburu N, Graham BS, Buck CB, Kines RC, Pang YY, Day PM, et al. Intravaginal immunization with HPV vectors induces tissue-resident CD8+ T cell responses. The Journal of clinical investigation. 2012;122(12):4606-20.

11. Sun YY, Peng S, Han L, Qiu J, Song L, Tsai Y, et al. Local HPV Recombinant Vaccinia Boost Following Priming with an HPV DNA Vaccine Enhances Local HPV-Specific CD8+ T-cell-Mediated Tumor Control in the Genital Tract. Clin Cancer Res. 2016;22(3):657-69.

12. Malik BT, Byrne KT, Vella JL, Zhang P, Shabaneh TB, Steinberg SM, et al. Resident memory T cells in the skin mediate durable immunity to melanoma. Sci Immunol. 2017;2(10).

Wang B, Wu S, Zeng H, Liu Z, Dong W, He W, et al. CD103+ Tumor Infiltrating Lymphocytes
Predict a Favorable Prognosis in Urothelial Cell Carcinoma of the Bladder. The Journal of urology.
2015;194(2):556-62.

14. Workel HH, Komdeur FL, Wouters MC, Plat A, Klip HG, Eggink FA, et al. CD103 defines intraepithelial CD8+ PD1+ tumour-infiltrating lymphocytes of prognostic significance in endometrial adenocarcinoma. Eur J Cancer. 2016;60:1-11.

15. Djenidi F, Adam J, Goubar A, Durgeau A, Meurice G, de Montpreville V, et al. CD8+CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival in lung cancer patients. J Immunol. 2015;194(7):3475-86.

16. Morgan AJ, Guillen C, Symon FA, Birring SS, Campbell JJ, Wardlaw AJ. CXCR6 identifies a putative population of retained human lung T cells characterised by co-expression of activation markers. Immunobiology. 2008;213(7):599-608.

17. Kumar BV, Ma W, Miron M, Granot T, Guyer RS, Carpenter DJ, et al. Human Tissue-Resident Memory T Cells Are Defined by Core Transcriptional and Functional Signatures in Lymphoid and Mucosal Sites. Cell reports. 2017;20(12):2921-34.

 Mackay LK, Minnich M, Kragten NA, Liao Y, Nota B, Seillet C, et al. Hobit and Blimp1 instruct a universal transcriptional program of tissue residency in lymphocytes. Science.
2016;352(6284):459-63.

105

19. Matloubian M, David A, Engel S, Ryan JE, Cyster JG. A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. Nature immunology. 2000;1(4):298-304.

20. Shimaoka T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Kataoka H, Kita T, et al. Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages. The Journal of biological chemistry. 2000;275(52):40663-6.

21. Wilbanks A, Zondlo SC, Murphy K, Mak S, Soler D, Langdon P, et al. Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTRligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines. J Immunol. 2001;166(8):5145-54.

22. Ludwig A, Schulte A, Schnack C, Hundhausen C, Reiss K, Brodway N, et al. Enhanced expression and shedding of the transmembrane chemokine CXCL16 by reactive astrocytes and glioma cells. J Neurochem. 2005;93(5):1293-303.

23. Abel S, Hundhausen C, Mentlein R, Schulte A, Berkhout TA, Broadway N, et al. The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. J Immunol. 2004;172(10):6362-72.

24. Day C, Patel R, Guillen C, Wardlaw AJ. The chemokine CXCL16 is highly and constitutively expressed by human bronchial epithelial cells. Exp Lung Res. 2009;35(4):272-83.

25. Tabata S, Kadowaki N, Kitawaki T, Shimaoka T, Yonehara S, Yoshie O, et al. Distribution and kinetics of SR-PSOX/CXCL16 and CXCR6 expression on human dendritic cell subsets and CD4+ T cells. J Leukoc Biol. 2005;77(5):777-86.

26. Kim CH, Kunkel EJ, Boisvert J, Johnston B, Campbell JJ, Genovese MC, et al. Bonzo/CXCR6 expression defines type 1-polarized T-cell subsets with extralymphoid tissue homing potential. The Journal of clinical investigation. 2001;107(5):595-601.

27. Heesch K, Raczkowski F, Schumacher V, Hunemorder S, Panzer U, Mittrucker HW. The function of the chemokine receptor CXCR6 in the T cell response of mice against Listeria monocytogenes. PLoS One. 2014;9(5):e97701.

28. Latta M, Mohan K, Issekutz TB. CXCR6 is expressed on T cells in both T helper type 1 (Th1) inflammation and allergen-induced Th2 lung inflammation but is only a weak mediator of chemotaxis. Immunology. 2007;121(4):555-64.

29. Zaid A, Hor JL, Christo SN, Groom JR, Heath WR, Mackay LK, et al. Chemokine Receptor-Dependent Control of Skin Tissue-Resident Memory T Cell Formation. J Immunol. 2017;199(7):2451-9.

30. Billerbeck E, Kang YH, Walker L, Lockstone H, Grafmueller S, Fleming V, et al. Analysis of CD161 expression on human CD8+ T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(7):3006-11.

31. Nanki T, Shimaoka T, Hayashida K, Taniguchi K, Yonehara S, Miyasaka N. Pathogenic role of the CXCL16-CXCR6 pathway in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2005;52(10):3004-14.

32. Fukumoto N, Shimaoka T, Fujimura H, Sakoda S, Tanaka M, Kita T, et al. Critical roles of CXC chemokine ligand 16/scavenger receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipoprotein in the pathogenesis of both acute and adoptive transfer experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol. 2004;173(3):1620-7.

33. Hombrink P, Helbig C, Backer RA, Piet B, Oja AE, Stark R, et al. Programs for the persistence, vigilance and control of human CD8+ lung-resident memory T cells. Nature immunology. 2016;17(12):1467-78.

34. Mackay LK, Rahimpour A, Ma JZ, Collins N, Stock AT, Hafon ML, et al. The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. Nature immunology. 2013;14(12):1294-301.

35. Sowell RT, Goldufsky JW, Rogozinska M, Quiles Z, Cao Y, Castillo EF, et al. IL-15 Complexes Induce Migration of Resting Memory CD8 T Cells into Mucosal Tissues. J Immunol. 2017;199(7):2536-46.

36. Agostini C, Cabrelle A, Calabrese F, Bortoli M, Scquizzato E, Carraro S, et al. Role for CXCR6 and its ligand CXCL16 in the pathogenesis of T-cell alveolitis in sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med. 2005;172(10):1290-8.

37. Pere H, Montier Y, Bayry J, Quintin-Colonna F, Merillon N, Dransart E, et al. A CCR4 antagonist combined with vaccines induces antigen-specific CD8+ T cells and tumor immunity against self antigens. Blood. 2011;118(18):4853-62.

38. Anderson KG, Mayer-Barber K, Sung H, Beura L, James BR, Taylor JJ, et al. Intravascular staining for discrimination of vascular and tissue leukocytes. Nature protocols. 2014;9(1):209-22.

39. Unutmaz D, Xiang W, Sunshine MJ, Campbell J, Butcher E, Littman DR. The primate lentiviral receptor Bonzo/STRL33 is coordinately regulated with CCR5 and its expression pattern is conserved between human and mouse. J Immunol. 2000;165(6):3284-92.

40. Hu W, Liu Y, Zhou W, Si L, Ren L. CXCL16 and CXCR6 are coexpressed in human lung cancer in vivo and mediate the invasion of lung cancer cell lines in vitro. PLoS One. 2014;9(6):e99056.

41. Lee LN, Ronan EO, de Lara C, Franken KL, Ottenhoff TH, Tchilian EZ, et al. CXCR6 is a marker for protective antigen-specific cells in the lungs after intranasal immunization against Mycobacterium tuberculosis. Infection and immunity. 2011;79(8):3328-37.

42. Tse SW, Radtke AJ, Espinosa DA, Cockburn IA, Zavala F. The chemokine receptor CXCR6 is required for the maintenance of liver memory CD8(+) T cells specific for infectious pathogens. J Infect Dis. 2014;210(9):1508-16.

107
43. Mandai Y, Takahashi D, Hase K, Obata Y, Furusawa Y, Ebisawa M, et al. Distinct Roles for CXCR6(+) and CXCR6(-) CD4(+) T Cells in the Pathogenesis of Chronic Colitis. PLoS One. 2013;8(6):e65488.

44. Shimaoka T, Nakayama T, Kume N, Takahashi S, Yamaguchi J, Minami M, et al. Cutting edge: SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates bacterial phagocytosis by APCs through its chemokine domain. J Immunol. 2003;171(4):1647-51.

45. Shimaoka T, Nakayama T, Fukumoto N, Kume N, Takahashi S, Yamaguchi J, et al. Cell surface-anchored SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells. J Leukoc Biol. 2004;75(2):267-74.

46. Jiang JQ, He XS, Feng N, Greenberg HB. Qualitative and quantitative characteristics of rotavirus-specific CD8 T cells vary depending on the route of infection. Journal of virology. 2008;82(14):6812-9.

47. Morgan AJ, Guillen C, Symon FA, Huynh TT, Berry MA, Entwisle JJ, et al. Expression of CXCR6 and its ligand CXCL16 in the lung in health and disease. Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology. 2005;35(12):1572-80.

48. Matsumura S, Wang B, Kawashima N, Braunstein S, Badura M, Cameron TO, et al. Radiationinduced CXCL16 release by breast cancer cells attracts effector T cells. J Immunol. 2008;181(5):3099-107.

49. Gunther C, Carballido-Perrig N, Kaesler S, Carballido JM, Biedermann T. CXCL16 and CXCR6 are upregulated in psoriasis and mediate cutaneous recruitment of human CD8+ T cells. The Journal of investigative dermatology. 2012;132(3 Pt 1):626-34.

50. Geissmann F, Cameron TO, Sidobre S, Manlongat N, Kronenberg M, Briskin MJ, et al. Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids. PLoS Biol. 2005;3(4):e113.

51. Hojo S, Koizumi K, Tsuneyama K, Arita Y, Cui Z, Shinohara K, et al. High-level expression of chemokine CXCL16 by tumor cells correlates with a good prognosis and increased tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer. Cancer Res. 2007;67(10):4725-31.

52. Jeyanathan M, Afkhami S, Khera A, Mandur T, Damjanovic D, Yao Y, et al. CXCR3 Signaling Is Required for Restricted Homing of Parenteral Tuberculosis Vaccine-Induced T Cells to Both the Lung Parenchyma and Airway. J Immunol. 2017;199(7):2555-69.

53. Kohlmeier JE, Reiley WW, Perona-Wright G, Freeman ML, Yager EJ, Connor LM, et al. Inflammatory chemokine receptors regulate CD8(+) T cell contraction and memory generation following infection. J Exp Med. 2011;208(8):1621-34. 54. Kohlmeier JE, Miller SC, Smith J, Lu B, Gerard C, Cookenham T, et al. The chemokine receptor CCR5 plays a key role in the early memory CD8+ T cell response to respiratory virus infections. Immunity. 2008;29(1):101-13.

55. Cullen R, Germanov E, Shimaoka T, Johnston B. Enhanced tumor metastasis in response to blockade of the chemokine receptor CXCR6 is overcome by NKT cell activation. J Immunol. 2009;183(9):5807-15.

56. Guo X, Zhang Y, Zheng L, Zheng C, Song J, Zhang Q, et al. Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing. Nat Med. 2018;24(7):978-85.

57. Topham DJ, Reilly EC. Tissue-Resident Memory CD8(+) T Cells: From Phenotype to Function. Frontiers in immunology. 2018;9:515.

Table S1 : Antibodies used and	protocole of immunostaining	for CXCR6 detection in tissue.
--------------------------------	-----------------------------	--------------------------------

Conjugated antibodies	Concentrations
FITC conjugated mouse IgG1 к anti-human CD8a, clone HIT8a, 11-0089 (e-	10µg/mL
Bioscience)	
PE conjugated mouse IgG1 κ anti-human CD103, clone B-Ly7, 12-1038 (e-	5μg/mL
Bioscience)	
Mouse IgG2b anti-human CXCR6, clone 56811, cat number MAB699 (R&D Systems)	10µg/mL
Secondary biotinylated antibody goat anti-mouse IgG2b, ab97248 (Abcam)	2µg/mL
AF594 streptavidin, 016-580-084 (Jackson ImmunoResearch)	1μg/mL
AF647 conjugated mouse IgG1 κ anti-human E-Cadherin, clone 67A4, 324112	5μg/mL
(Biolegend)	

Travail 2

Titre : Phénotype et localisation des sous-populations de LT résidents mémoires dans les tumeurs pulmonaires.

C. Blanc et al.

Résumé

Introduction : Les LT CD8+ résidents mémoires (Trm) représentent une nouvelle population de LT mémoires infiltrant les tumeurs, notamment du poumon, et jouent un rôle crucial dans l'immunosurveillance des tumeurs. Ces cellules présentent un phénotype original, hétérogène et microenvironnement-dépendant. En effet, elles expriment différentes intégrines (CD103, CD49a) en fonction de leur tissu de résidence mais aucun marqueur spécifique n'a été identifié à ce jour. Leur phénotype leur confère des avantages en termes d'activités cytotoxiques dans les tumeurs, expliquant leur impact pronostique non négligeable et leur fort potentiel comme cible thérapeutique. Une meilleure connaissance de leur phénotype et de leurs mécanismes d'induction permettrait d'optimiser la réponse antitumorale.

Matériels et Méthodes : Dans le but de caractériser phénotypiquement et topographiquement les LT CD8+ infiltrant les tumeurs pulmonaires, nous avons développé une technique innovante d'immunofluorescence multiparamétrique *in situ* et de *machine-learning*. Avec une cohorte de 48 patients atteints de cancer pulmonaire, nous avons pu obtenir un compte des populations lymphocytaires en fonction des zones tissulaires. Plusieurs modèles murins de vaccination et un modèle en absence de recrutement tissulaire de LT issus des organes lymphoïdes secondaires (SLO) par injection de FTY720 ont été développés pour étudier les mécanismes d'induction pulmonaire locale des Trm.

Résultats : Nous avons identifié quatre populations de LT CD8+ en fonction de leur expression des intégrines CD103 et CD49a, avec des localisations tumorales et des phénotypes distincts. L'expression de CD103 détermine notamment la localisation intra-épithéliale des LT CD8+ et une forte expression en molécules de costimulation inhibitrices. Des LT CD8+ au profil Trm infiltrent également des structures lymphoïdes tertiaires (TLS) au sein des tumeurs et l'induction de Trm pourrait dépendre de la présence de TLS. De plus, nos données préliminaires montrent que les LT CD8+ Trm pourraient être générés directement dans le poumon en absence de recrutement de LT depuis les SLO.

Conclusion : Nos travaux ont permis de mettre en évidence l'hétérogénéité du phénotype Trm infiltrant les tumeurs pulmonaires. Leur expression d'intégrines explique leur localisation au sein de la tumeur. Ces résultats suggèrent que l'induction de ce phénotype pourrait avoir pour origine un *priming* muqueux pulmonaire.

Title : Phenotype and location of resident memory T cells subpopulation in lung cancer.

C. Blanc et al.

Abstract

Introduction: Resident memory CD8+ T cells (Trm) represent a new subset of memory T cells which infiltrate the tumor including lung tumors. They play a crucial role in cancer immunosurveillance and exhibit an original and an heterogenous phenotype, microenvironment-dependent. Indeed, they express distinct integrins (CD103, CD49a) based on their residency tissue and no specific marker has been identified yet. Their phenotype is involved in their cytotoxic activities, highlighting their high prognostic impact and their potential to be a suitable therapeutic target. Better understanding Trm phenotype complexity and their induction mechanisms are crucial to further optimize antitumor response.

Materials and methods: In order to phenotypically and topographically characterize and measure CD8+ T cells subpopulations, we have set up an innovative *in situ* multiparametric immunofluorescence technique coupled with a machine learning technology using a cohort of 48 human lung cancer patients. Several murine model of vaccination or in absence of T cells recruitment from the secondary lymphoid organs (SLO) by FTY720 injections have been developed to study the pulmonary induction mechanisms of Trm.

Results: We have identified four CD8+ T cells populations with distinct tumor locations, based on their expression of CD103 and CD49a integrins. CD103 integrin determines CD8+ T cells location in close contact with tumor cells expressing the CD103 ligand E-cadherin and their high expression of immune checkpoint inhibitors. Trm also infiltrate tertiary lymphoid structures (TLS) in tumor but their induction does not seem to depend on TLS infiltration. However, our preliminary data show that Trm could be induced directly in the lung mucosa in absence of T cell recruitment from SLO.

Conclusion: Our work highlights the heterogenous phenotype of Trm in lung cancer. Their integrin expression explains their location in tumor. These results suggest the local priming of T cell to induce Trm phenotype.

Introduction

Les lymphocytes T (LT) CD8+ résidents mémoires (Trm) représentent une nouvelle population de LT mémoires résidentes des tissus et infiltrant les tumeurs. Elles sont fortement impliquées dans le contrôle de la croissance tumorale et sont de bon pronostic dans plusieurs cancers dont le cancer du poumon (98). Ces cellules présentent un phénotype hétérogène en fonction de leur tissu de résidence. Leur principal marqueur d'identification est CD103, la chaîne α_E de l'intégrine $\alpha_E\beta_7$, qui leur permet une meilleure adhésion à la tumeur exprimant leur ligand E-cadhérine, en plus de leur conférer une cytotoxicité accrue. Les Trm expriment d'autres marqueurs, dont la chaîne α_1 (CD49a) de l'intégrine $\alpha_1\beta_1$ retrouvée dans le cancer du poumon par notre équipe et par d'autres, et ligand des constituants du stroma tumoral (collagène I, IV et laminine) (98,172,217).

Toutefois, tous les Trm n'expriment pas CD103 et/ou CD49a (208) et il n'existe pas à ce jour de marqueur spécifique de Trm. Par ailleurs, leur répartition sur les LT infiltrant les tumeurs n'a pas été étudiée et la notion de sous-populations de Trm n'a été abordée que dans le mélanome (194,210).

Une meilleure compréhension du phénotype et de la fonction du LT dans le cancer du poumon permettrait en aval d'optimiser la réponse antitumorale. Dans cet objectif, nous nous sommes intéressés à caractériser les populations de Trm dans les tumeurs pulmonaires, à étudier leur localisation spatiale et leur rôle pronostique.

Une récente publication suggère que les Trm pourraient avoir d'autres rôles qu'une cytotoxicité directe et indirecte. Par leur sécrétion de chimiokines, les Trm pourraient en effet participer à la formation de structures lymphoïdes tertiaires (TLS) au sein des cancers (206). Nous nous sommes intéressés au rôle des Trm dans la formation des TLS, dans le cadre de vaccination intranasale (i.n.), en plus de nos analyses *in situ* chez l'Homme.

Les TLS sont de potentiels lieux de *priming* pour l'induction d'une immunité antitumorale locale et donc de Trm (84). En plus de sa capacité à développer des TLS (autrement appelés BALT pour *Bronchus-Associated Lymphoid Tissue*) dans le cadre d'une stimulation antigénique chronique, le poumon présente un microenvironnement favorisant le phénotype Trm comme des cellules dendritiques inductrices de CD49a ou du TGF-β, cytokine régulant l'expression de CD103 (83,217,235). D'ailleurs, contrairement à la vaccination systémique, la vaccination locale (i.n.) est la seule capable de générer des Trm dans la muqueuse pulmonaire, suggérant l'hypothèse d'un *priming* pulmonaire pour l'induction de Trm (98,217). Les Trm représentant une cible thérapeutique intéressante à générer ou amplifier, nous avons donc étudié la possibilité d'un *priming* muqueux pulmonaire en analysant les mécanismes d'induction de la réponse Trm spécifique et locale, en absence de LT provenant des organes lymphoïdes secondaires, après vaccination i.n.

Matériels et méthodes des études chez l'Homme

Patients

Une cohorte rétrospective de 48 coupes de tumeurs pulmonaires congelées de patients ayant subi une lobectomie entre 2009 et 2010 dans le service de chirurgie thoracique de l'HEGP et de 6 tissus tumoraux frais en 2018 ont été collectées. Les caractéristiques des patients sont répertoriées dans le **tableau 1**. Cette étude a été menée en accord avec la déclaration d'Helsinki et après approbation par le comité d'éthique (Comité de Protection des Personnes n°2015-08-07). Le consentement éclairé a été recueilli pour tous les patients.

Caractéristiques (n= 48)	Nombre de patients (%)
Age médian (n=48)	63,5 ± 23,5
Sexe (n=48)	
Femme	9 (18,75%)
Homme	39 (81,25)
Histologie (n=48)	
Adénocarcinome	23 (48%)
Carcinome épidermoïde	25 (52%)
Stade (n=48)	
1-2	27 (56,25%)
3-4	21 (43,75%)
pTNM (n=47-48)	
pT1-2	30 (62,5%)
рТ3-4	18 (37,5%)
pN-	24 (50%)
pN+	23 (48%)
Fumeur (n=43)	
Oui	41 (85,4%)
Non	2 (4.4%)
Traitement (n=48)	
Chimiothérapie adjuvante	43 (90%)
Survie	
PFS moyenne (mois) n=39	35,87 [29,29 ; 41,54]
OS moyenne (mois) n=48	37,51 [32,27 ; 42,17]

Tableau 1 : Caractéristiques des patients atteints du cancer du poumon issus de la cohorte in situ.

PFS= survie sans progression, OS= survie globale

Données du TCGA

Les données transcriptomiques normalisées (RNA Seq V2 RSEM) ont été obtenues à partir des données du « *The Cancer Genome Atlas* » (TCGA). Elles ont été recueillies sur le site cbioportal.org à partir de l'étude « *TCGA provisional* » de séquençage ARN de 586 adénocarcinomes.

Immunofluorescence in situ

Après exérèse, les tissus humains ont été immédiatement congelés, stockés à -80°C puis coupés de 4 à 6 μm au cryostat.

Les lames de tissus humains ont été décongelées et fixées 5 minutes à l'acétone 100%. Les lames sont lavées dans du PBS 1X pendant 8 minutes. Lors d'une utilisation d'un anticorps biotinylé, les lames sont incubées 10 minutes avec une solution saturante en avidine puis en biotine pour bloquer les biotines endogènes et sont lavées en PBS 1X. Les lames ont été incubées 15 minutes dans une solution de Fc Blocking 10% (anti-CD16/32, eBioscience, France) pour limiter les marquages non spécifiques. Par la suite, les lames ont été incubées 1h30 à température ambiante et à l'abri de la lumière avec les anticorps directement couplés ou l'anticorps non couplé anti-collagène IV (**Tableau 2**). Pour le panel marquant le collagène IV, après un lavage, les lames sont incubées avec l'anticorps secondaire biotinylé 30 minutes puis lavées et incubées 30 minutes avec une streptavidine couplée à un fluorochrome. Les contrôles isotypiques correspondant ont été utilisés dans chaque expérience. Enfin, les lames sont lavées et incubées avec une solution marquant les noyaux (NucBlue Fixed ReadyProbes Reagent, Thermofisher Scientific, Waltham, USA). Pour finir, les coupes sont mises entre lames et lamelles et conservées à 4°C à l'abri de la lumière.

Marqueur	lsotype	Fournisseur	Clone	Référence	Concentration
CD8 FITC	Mouse IgG1k	Ebioscience	HIT8	11-0089	10µg/mL
CD103 APC	Mouse IgG1k	Ebioscience	B-Ly7	12-1038	5μg/mL
CD49a PE	Mouse IgG1k	Biolegend	TS2/7	328304	20µg/mL
E-cadhérine AF594	Mouse IgG1k	Biolegend	67A4	BLE324118	5μg/mL
Collagène IV	Mouse IgG2b	Ebioscience	1042	14-9871	2.5µg/mL
anti-mouse IgG2b biotine	Goat	Abcam		Ab97248	2μg/mL
AF594 streptavidine		Jackson ImmunoResearch		016-580-084	1µg/mL
CD20 ef615	Mouse IgG2ak	Ebioscience	L26	42-0202	15μg/mL

Tableau 2 : Panel d'anticorps utilisés en immunofluorescence in situ chez l'Homme.

Analyse de la fluorescence et comptage automatique

Les images des coupes de tissus marqués ont été réalisées par le microscope multispectral Vectra (PerkinElmer, Etats-Unis) après sélection de 2 à 20 champs à l'objectif x200 via le logiciel Phenochart (Figures 1A et B). Cette technologie permet de mesurer les caractéristiques morphologiques et de fluorescence des différents compartiments cellulaires (membrane, cytoplasme, noyau) via le logiciel d'analyse associé, Inform. Ce logiciel permet l'analyse d'un marquage multiparamétrique par l'intégration des spectres de fluorescence de chaque fluorochrome dans une librairie, extraits d'après des lames mono-marquées ainsi que par l'intégration de l'auto-fluorescence naturelle du tissu obtenue d'après une lame non marquée (Figure 1C). Le logiciel permet, via un apprentissage supervisé, une segmentation tissulaire grâce aux marquages E-cadhérine (épithélium versus stroma), collagène IV (région collagène IV versus région non collagène IV) ou CD20 et DAPI (TLS CD20+ versus pourtour du TLS) et une segmentation cellulaire par le marquage des noyaux DAPI (Figures 1D et E). Par la suite, une étape de phénotypage permet l'identification des populations cellulaires pour finalement obtenir le compte cellulaire automatisé en fonction de leur compartiment tissulaire (Figure 1F). Les données de comptage et d'aire tissulaire sont extraites de fichiers sources .csv à partir d'un algorithme R. Seules les cellules dont le phénotype est assuré à plus de 55% par le logiciel sont prises en compte.

Le comptage cellulaire en mm² est obtenu par le calcul :

В

А

Nombre $X/mm^2 = \frac{Nombre \ de \ X \ dans \ Z}{Aire \ de \ Z \ (\%) \times Aire \ d'un \ champs \ (mm^2)}$, où X est une population cellulaire et Z une zone compartimentalisée.



Figure 1 : Etapes d'analyse de la fluorescence et de comptage automatique sur le logiciel Inform.

A. Scan de tumeur marquée, obtenu par le microscope spectral Vectra, visualisable sur le logiciel Phenochart. B. Sélection des champs d'intérêt. C. Image d'un champ obtenu sur le logiciel Inform après intégration des spectres spécifiques de chaque fluorochrome et de l'auto-fluorescence. D. Segmentation tissulaire avec en rouge l'épithélium tumoral et en vert le stroma, réalisée à partir du marquage épithélial E-cadhérine. E. Segmentation cellulaire réalisée à partir du marquage des noyaux. F. Etape de phénotypage cellulaire pour lequel chaque point correspond à un phénotype donné.

Cytométrie en flux

Après dissociation mécanique des pièces tumorales, une digestion enzymatique avec de la DNAse I (30 IU/mL, Roche, Suisse) et de la collagénase D (1mg/mL, Roche, Suisse) est effectuée pendant une heure. Les cellules sont recueillies après filtration sur tamis et centrifugation. Après numération, les cellules sont incubées avec les anticorps de surface (**Tableau 3**) à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 20 minutes. Les cellules sont lavées dans du PBS 1X. Le marquage intracellulaire de Ki67 nécessite, après un marquage de surface, un lavage puis une incubation de 20 minutes à 4°C dans le fixateur (IC fixation buffer, Invitrogen, France). Après centrifugation, les cellules sont incubées dans une solution contenant l'anticorps intracellulaire anti-Ki67 et le diluant du kit de perméabilisation pendant 45 minutes. Les cellules sont lavées et resuspendues dans du PBS 1X.

Les contrôles isotypiques ont été inclus pour chaque expérience. Les données sont obtenues par le cytomètre en flux Fortessa X20 (BD Biosciences, Etats-Unis) et analysées sur le logiciel FlowJo.

Marqueur	Fournisseur	Clone	Référence	Concentration
Live dead	Invitrogen		L34966	1/100
CD3 APC-Cy7	Biolegend	HIT3a	BLE300317	5μ/100μL
CD8 BUV395	Biolegend	RPA-T8	563796	5μ/100μL
CD103 PerCP-Cy5.5	Biolegend	Ber-ACT8	BLE350225	5μ/100μL
CD49a PE	Biolegend	TS2/7	328304	5μ/100μL
PD-1 BV650	Biolegend	EH12.2H7	BLE329949	5µ/100µL
Tim-3 BV785	Biolegend	F38-2E2	BLE345031	5μ/100μL
Ki67 FITC	BD biosciences	B56	561165	5µ/100µL
CD28 PE-Cy7	Biolegend	CD28.2	BLE302925	5µ/100µL

Tableau 3 : Panel d'anticorps utilisés en cytométrie en flux chez l'Homme.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel Prism 6.07 (GraphPad Software, Inc) et ont essentiellement été obtenues par un test de comparaisons de moyennes appariées de Wilcoxon ou de Mann-Whitney. Les comparaisons de pourcentages ont été effectuées par un test du Chi-2 ou par un test du Chi-2 corrigé de Yates, lorsque les effectifs calculés étaient supérieurs à 3 et inférieurs à 5.

Les corrélations des données d'expression génétique ont été réalisées par un test de corrélation de Pearson, après avoir vérifié la linéarité de la relation. Pour la comparaison de plusieurs moyennes appariées, le test utilisé est une analyse de variance de Friedman. Le test du Log rank est utilisé pour comparer la survie de différents groupes de patients. Les résultats sont représentés sous la forme de moyenne ± SEM et sous forme de courbe de Kaplan-Meier.

Le seul de significativité a été défini à 5% pour des tests bilatéraux.

* : p≤0,05 , ** : p≤0,001 , *** : p≤0,0001 , **** : p≤0,00001

Matériels et méthodes des études chez la souris

Animaux

Des souris C57BL/6 (H-2^b) ont été achetées chez Charles River. Toutes les souris ont été hébergées dans des conditions stériles dans l'animalerie de l'unité INSERM 970. En accord avec les directives européennes (EC2010/63), les expériences ont été réalisées après soumission et validation des protocoles par le comité d'éthique de l'Université Paris Descartes (CEEA 34).

Vaccins et adjuvants

Les vaccins STxB-E7 ou STxB-OVA ont été obtenus après couplage de la sous-unité B de la toxine de *Shigella dysenteriae* modifiée par ajout d'une cystéine, au polypeptide E7₄₃₋₅₇ (GQAEPDRAHYNIVTF) ou OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) après addition d'un bromacétate sur son extrémité terminale NH₂. La réaction chimique est la suivante : STxB-Cys-SH + Br-CH2-CO-NH-peptide \rightarrow STxB-Cys-S-CH2-CO-NH-peptide + HBr

Après purification, les concentrations en endotoxines déterminées par un test de Limulus (Lonza Verviers, Belgique) étaient inférieures à 0,5 EU/mg.

Le peptide E7₄₉₋₅₇ (RAHYNIVTF), appelé G15F et utilisé pour le protocole d'hyper-immunisation, est dérivé de la protéine E7 du sous-type 16 du virus du papillome humain.

L'adjuvant alpha-galactosylcéramide ou α -GalCer (KRN7000), ligand des NKT a été acheté chez Funakoshi. Dans le cadre de l'hyper-immunisation, la solution d'aluminium est utilisée comme adjuvant (Imject Alum,ThermoFischer, Etats-Unis).

Immunisation

Les souris sont vaccinées par voie intranasale (i.n.). Les souris sont préalablement anesthésiées par injection intrapéritonéale d'une solution de 2 mg/kg de kétamine (Virbac, France) et de 1 mg/kg de xylazine (Bayer, France) diluées dans du PBS 1X. 25 µL total de vaccin avec ou sans adjuvant sont administrés dans chaque cavité nasale à l'aide d'une pipette.

Pour le protocole d'immunisation classique, les souris ont été immunisées avec 20 μ g du vaccin par voie i.n. à J0 et à J14. Lors de la première immunisation du protocole classique, 2 μ g de l'adjuvant α -GalCer sont ajoutés à la préparation.

Pour le protocole d'hyper-immunisation, les souris ont été immunisées par voie i.n. avec 50 μg du vaccin à J7, J9, J11, J18, J21 et J23. Les souris reçoivent par voie i.n. une solution de 200μg d'aluminium (Imject Alum,ThermoFischer, Etats-Unis) à J0, selon le protocole décrit dans Silina et *al* (85).

Injection de FTY720

Les souris reçoivent quotidiennement une injection intrapéritonéale de 0,5 mg/kg de FTY720 (Cayman Chemical, Interchim, France) à partir de 2 jours avant la première vaccination, puis pendant 30 jours. La lymphopénie induite a été évaluée par une hématologiste.

Préparation d'une suspension cellulaire à partir des lavages broncho-alvéolaires, de la rate et des ganglions médiastinaux

Le lavage broncho-alvéolaire (LBA) est prélevé par cinq lavages de PBS EDTA 2 mM (Ethylène diamine tétra-acétique), depuis la trachée. Les cellules sont ensuite centrifugées à 1800 rpm pendant 5 minutes.

Les rates et les ganglions ont été prélevés et broyés sur un tamis cellulaire de 70 µm (cells strainer BD Biosciences Discovery Labware, San Jose, USA). Les suspensions sont lavées et centrifugées à 1800 rpm pendant 5 minutes. Les hématies de la rate sont lysées avec 2 mL de tampon de lyse ACK (NH4Cl 8,32 g/L, KHCO3 0,84 g/L, EDTA 2 mg/mL) ; la réaction est arrêtée en ajoutant du PBS 1X. Les cellules sont ensuite centrifugées à 1800 rpm pendant 5 minutes. Les cellules centrifugées à 1800 rpm pendant 5 minutes. Les cellules ont été resuspendues et comptées grâce à une coloration au bleu de trypan.

Cytométrie en flux

Un million de cellules ont été utilisées par marquage. La liaison non spécifique des anticorps sur les cellules par leurs récepteurs Fc a été bloquée, après incubation avec du Fc Blocking 1% (anti-CD16/32, eBioscience, France) pendant 15 minutes. Les cellules sont ensuite incubées avec le tétramère (Immudex, Copenhagen, Danemark) pendant 45 minutes à 4°C. Après un lavage avec du PBS 1X et une centrifugation de 5 minutes à 1800 rpm, les cellules sont incubées 30 minutes, à 4°C, à l'abri de la lumière, avec un marqueur de viabilité (Live-Dead, ThermoFischer Scientific, Waltham, USA) et des anticorps dirigés contre des molécules murines, dilués dans du PBS 1X (**Tableau 4**). Les cellules sont par la suite, lavées et centrifugées à 1800 rpm pendant 5 minutes. Après centrifugation, le surnageant est éliminé, les cellules sont resuspendues dans 100µL de PBS 1X et conservées à 4°C, à l'abri de la lumière. Les contrôles isotypiques ont été inclus pour chaque expérience. Les données sont obtenues par le cytomètre en flux Fortessa X20 (BD Biosciences, Etats-Unis) et analysées sur le logiciel FlowJo.

Marqueur	Fournisseur	Clone	Référence	Concentration
Live dead	Invitrogen		L34966	1/100
CD3 FITC	ebioscience	145-2C11	11-0031	1/150
CD8 AF700	Biolegend	YTS156.7.7	126618	1/100
CD103 PB	Biolegend	2E7	121418	1/100
CD49a AF647	BD bioscience	Ha31/8	562113	1/100
Tétramère D ^d -E7 ₄₃₋₅₇ PE	Immudex		JA 2195-PE	3/50
Tétramère H-2Kb OVA PE	Immudex		JD 2163-PE	3/50

Tableau 4 : Panel d'anticorps utilisés en cytométrie en flux chez la souris.

Préparation des coupes congelées de poumons de souris

Avant prélèvement, les poumons ont été perfusés avec du PBS 1X par voie intracardiaque pour éliminer les cellules circulantes et ont été remplis avec une solution de PBS-OCT 1 :1 (TFM, Microm microtect, France) pour faciliter la coupe. Les tissus sont ensuite congelés progressivement au-dessus des vapeurs d'azote et placés à -80°C. Les poumons sont coupés au cryostat de 7 à 10 μm.

Immunofluorescence in situ

Les lames de tissus murins ont été décongelées et fixées 5 minutes à l'acétone 100%. Les lames sont lavées dans du PBS 1X pendant 8 minutes. Les lames ont été incubées 15 minutes dans une solution de Fc Blocking 10% (anti-CD16/32, eBioscience, France) pour limiter les marquages non spécifiques. Par la suite, les lames ont été incubées 1h30 à température ambiante et à l'abri de la lumière avec les anticorps directement couplés (**Tableau 5**). Les contrôles isotypiques correspondant ont été utilisés dans chaque expérience. Enfin, les lames sont lavées et incubées avec une solution marquant les noyaux (NucBlue Fixed ReadyProbes Reagent, Thermofisher Scientific, Waltham, USA). Pour finir, les coupes sont mises entre lames et lamelles et conservées à 4°C à l'abri de la lumière.

Tableau 5 : Panel d'anticorps utilisés en immunofluorescence in situ chez la souris.

Marqueur	lsotype	Fournisseur	Clone	Référence	Concentration
CD8 APC	Rat IgG2a	Ebioscience	53.6.7	17-0081	5µg/mL
CD103 PE	Hamster igG	Ebioscience	2E7	12-1031	10µg/mL
B220 ef615	Rat IgG2a	Ebioscience	RA4-6B2	42-0452	10µg/mL

Résultats

Identification de sous-populations de lymphocytes T infiltrant les tumeurs pulmonaires chez l'Homme

Pour évaluer l'hétérogénéité phénotypique des LT CD8+ et plus particulièrement des Trm infiltrant les tumeurs pulmonaires, un quadri-marquage CD8, CD103 et CD49a associé au marqueur épithélial E-cadhérine a été réalisé par immunofluorescence *in situ* sur des coupes de cancers du poumon. Le marquage de l'E-cadhérine, ligand de CD103, permet une identification des cellules épithéliales tumorales. Cette expérience a permis l'identification au contact des cellules tumorales de quatre populations de cellules CD8+ en fonction de leur expression des deux intégrines. Les cellules CD8+ CD103^{neg} CD49a^{neg} et les cellules au profil Trm (les CD8+ CD103+ CD49a+, les CD8+ CD103^{neg}) sont retrouvées dans la tumeur (**Figure 2**).



Figure 2 : Infiltration de quatre populations de LT CD8+ dans les cancers pulmonaires.

Les coupes congelées de cancers pulmonaires ont été marquées par immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre CD8 (vert), CD103 (bleu), CD49a (rouge) et l'E-cadhérine (gris). Le marquage E-cadhérine permet l'indentification des îlots carcinomateux. Les colorations du CD8, CD103, CD49a et E-cadhérine peuvent être détectées en fusionnant les images monochromes. Le carré vert montre une cellule CD8+ CD103^{neg} CD49a^{neg}, le blanc une CD8+ CD103+ CD49a+, le rouge une CD8+ CD103^{neg} CD49a+ et le bleu une CD8+ CD103+ CD49a^{neg}. Un marquage comprenant les isotypes de chaque anticorps a été inclus dans l'expérience (zoom x200).

L'expression de CD103 est associée à une localisation intra-épithéliale des lymphocytes T CD8+

Pour aller plus loin dans la compréhension de ces quatre populations lymphocytaires, leur comptage en fonction de leur localisation spatiale au sein de la tumeur a été réalisé sur une cohorte de 48 patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC). Le marquage E-cadhérine permet une segmentation tissulaire entre la zone tumorale que l'on appellera intra-épithéliale et le stroma tumoral. Un nouvel algorithme a été développé pour extraire le nombre de cellules par mm², différent de celui utilisé précédemment dans l'équipe qui extrayait le nombre de cellules par champs ; ce nouvel outil permet donc de standardiser les données de façon plus précise.

En termes de répartition, toutes les populations cellulaires CD8+ sont retrouvées en plus fort nombre dans le stroma à l'exception des cellules CD103+ CD49a^{neg} (**Figure 3A**). Les populations majoritaires dans le stroma sont les cellules CD8+ CD103^{neg} CD49a^{neg} et les CD8+ CD103+ CD49a+ (**Figure 3B- droite**), alors que dans le compartiment épithélial, il n'existe pas de différence de densité statistiquement significative, même si les LT doubles positifs apparaissent plus nombreux (**Figure 3Bgauche**).





Les coupes congelées de cancers pulmonaires ont été marquées par immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre le CD8, CD103, CD49a et l'E-cadhérine pour obtenir un comptage automatisé de chaque population cellulaire en fonction de leur localisation. Le marquage E-cadhérine permet l'identification des îlots carcinomateux et la distinction entre l'épithélium et le stroma tumoral.

Le graphique représente la comparaison entre le compartiment épithélial et stromal, des quantifications cellulaires par mm² pour chaque population de LT CD8+ dans les CBNPC (A).

Les graphiques représentent la comparaison des quantifications par mm² des populations de LT CD8+ dans le stroma (graphique de gauche) et dans l'épithélium tumoral (graphique de droite) (B).

Résultats représentés sous la forme : moyenne±SEM. Test de comparaison de moyennes appariées de Wilcoxon, n=48.

L'étude de la quantification en nombre/mm² limite la compréhension de la localisation préférentielle des cellules. Le calcul des pourcentages permet une vision plus globale de la répartition des LT intra-tumoraux ; chacune des quantifications des populations a donc été rapportée par nombre de cellules CD8+ totales.

Ainsi, les cellules CD103^{neg} CD49a+ et CD103^{neg} CD49a^{neg} sont principalement retrouvées dans le stroma alors que les cellules CD103+ CD49a+ et CD103+ CD49a^{neg} sont localisées de façon plus importante dans le compartiment épithélial (**Figure 4A**). Cette observation est confirmée par l'étude de la localisation des cellules exprimant CD103 (**Figure 4B**). Les cellules CD49a+ CD103^{+/-} sont également plus en contact des cellules tumorales, résultats expliqués par la plus forte proportion de CD103+ CD49a+, préférentiellement situées dans l'épithélium tumoral (**Figures 4C** et **3A**).





Le graphique de gauche représente la répartition des quatre populations de LT CD8+ en fonction de leur expression de CD103 et de CD49a dans le compartiment épithélial et stromal des CBNPC (A). Les graphiques de droite représentent la répartition des CD8+ CD103+ exprimant ou non CD49a (B) et des CD8+ CD49a+ exprimant ou non CD103 (C) dans l'épithélium et le stroma. Résultats représentés sous la forme : moyenne±SEM. Test de comparaison de moyennes appariées de Wilcoxon, n=48.

De la même façon, un quadri-marquage *in situ* avec CD8, CD103, CD49a associé au marquage du collagène IV, ligand de CD49a et constituant majeur du stroma, a été réalisé pour comprendre la localisation stromale des cellules CD8+ CD49a+ non CD103.

Les quatre sous-populations lymphocytaires ont également été retrouvées dans les CBNPC. Les tumeurs ont été segmentées en régions riches en collagène IV ou sans collagène IV pour obtenir un comptage cellulaire sur ces deux zones tumorales (**Figure 5A**). Comme attendu, les cellules CD8+ non CD103 exprimant CD49a sont préférentiellement localisées au contact du ligand de CD49a (**Figures 5B et 5D**). *A contrario*, les cellules CD8+ CD103+ CD49a^{+/-} sont retrouvées majoritairement dans les zones sans collagène, ce qui confirme nos précédents résultats (**Figures 5B et 5C**).



Figure 5 : L'expression de CD49a en absence de CD103 est corrélée avec une localisation dans les régions riches en collagène IV dans les CBNPC.

Les coupes congelées de cancers pulmonaires ont été marquées par immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre le CD8 (vert), CD103 (bleu), CD49a (rouge) et le collagène IV (blanc) pour obtenir un comptage automatisé de chaque population cellulaire en fonction de leur localisation. Le marquage collagène IV permet de segmenter la tumeur en région collagène IV ou non. Les colorations du CD8, CD103, CD49a et collagène IV peuvent être détectées en fusionnant les images monochromes. Les carrés montrent une cellule CD8+ CD103+ CD49a+ au contact (en rouge) ou non (en jaune) avec le collagène. Un marquage comprenant les isotypes de chaque anticorps a été inclus dans l'expérience (zoom x200) (A).

Répartition des quatre populations de LT CD8+ en fonction de leur expression de CD103 et de CD49a dans le compartiment collagène IV ou non au sein des CBNPC (B). Répartition des CD8+ CD103+ exprimant ou non CD49a (C) ou des CD8+ CD49a+ exprimant ou non CD103 (D) dans les deux compartiments.

Résultats représentés sous la forme : moyenne±SEM, lorsque le SEM est non négligeable. Test de comparaison de moyennes appariées de Wilcoxon, n=13. CollV : collagène IV.

L'expression de CD103 semble donc influencer le contact avec la cellule tumorale. Pour comprendre les facteurs influençant l'expression intrinsèque de CD103, plusieurs méthodes ont été utilisées. Il est notamment connu que le TGF- β , cytokine inductrice de CD103, peut être produit par la cellule tumorale. La proximité entre le LT CD8+ et la tumeur pourrait être une conséquence de l'expression de CD103.

Dans ce cadre, l'intensité de fluorescence des fluorochromes ou MFI (*Mean Fluorescence Intensity*) peut apporter une information et sa quantification est permise par la technologie vectra. Alors que la MFI du CD49a ne diffère pas entre la zone épithéliale et le stroma (**Figure supplémentaire 1**), la MFI de CD103 des LT CD8+ dans le stroma est réduite comparée à celle des LT CD8+ infiltrant l'épithélium tumoral (**Figures 6A-B**), suggérant un impact de la tumeur sur l'induction de CD103, qui pourrait être causé par le TGF-β tumoral.

Par ailleurs, pour compléter ces informations, une analyse de la base de données publique du TCGA, qui renseigne sur l'expression génique globale dans les tumeurs, a été réalisée. Il est connu que dans la tumeur, l'intégrine CD103 est majoritairement exprimée par les LT CD8+ (192,196,212,213) ; il est donc possible de considérer l'expression génique de son transcrit comme étant corrélée aux LT CD8+.

Ainsi, contrairement à nos données de MFI, l'expression des transcrits de CD103 est plus importante dans les tumeurs exprimant faiblement l'E-cadhérine (**Figure 6C**), ce qui pourrait être expliqué par une pression de sélection ou une régulation négative du marqueur épithéliale pour échapper au contrôle immunitaire. Cette expression n'est pas corrélée avec l'expression du collagène IV (**Figure 6D**).

Quant à CD49a, son expression est plus diverse et est forte sur les zones vasculaires comparée à sa faible expression par les cellules immunitaires (**Figure supplémentaire 2**), ce qui limite considérablement la pertinence de son étude transcriptomique globale au sein de la tumeur.



Figure 6 : Corrélation entre l'expression de CD103 et celle des marqueurs tumoraux dans les CBNPC.

Les coupes congelées de cancers pulmonaires ont été marquées par immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre le CD8, CD103, CD49a et l'E-cadhérine pour obtenir un comptage automatisé de chaque population cellulaire en fonction de leur localisation mais également pour obtenir l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) de chaque marquage. Le marquage E-cadhérine permet l'identification des îlots carcinomateux et la distinction entre l'épithélium et le stroma tumoral. Les graphiques représentent la MFI de CD103 pour les cellules CD8+ CD103+ CD49a+ (A) ou CD8+ CD103+ non CD49a (B). Résultats représentés sous la forme : moyenne±SEM. Test de comparaison de moyennes appariées de Wilcoxon, n=48. Les graphiques représentent respectivement la corrélation entre l'expression génique de CD103 (*ITGAE*) et E-cadhérine (*CDH1*) (C) ou du collagène IV (*COL4A1*) (D), d'après la base de données du TCGA, pour les adénocarcinomes pulmonaires. Test de corrélation de Pearson.

Phénotype et valeur pronostique des sous-populations de lymphocytes T CD8+

Plusieurs populations de LT CD8+ infiltrent donc les tumeurs pulmonaires avec des localisations distinctes. Dans le cancer du poumon, il est connu que les LT CD8+ exprimant CD103 expriment particulièrement les molécules de costimulation inhibitrices (IC), reflet d'un état épuisé dysfonctionnel (172,192). Néanmoins, les études ne présentent pas d'information concernant les différentes sous-populations.

Dans cet objectif, l'analyse des données du TCGA a permis de mettre en évidence, dans les adénocarcinomes pulmonaires, une corrélation entre l'expression transcriptomique de CD103 et celles des IC : CTLA-4, PD-1 et Tim-3 (**Figure 7A**).

Par la suite, une analyse de l'expression protéique des IC par les sous-populations de LT CD8+ infiltrant les tumeurs a été réalisée par cytométrie en flux sur des pièces opératoires fraîches de tumeurs pulmonaires (**Figure 7B**). Pour des raisons techniques, l'étude s'est limitée à l'expression de PD-1 et de Tim-3.

Il est toutefois important de noter la différence de répartition des populations entre la technique d'immunofluorescence *in situ* et la cytométrie en flux pour laquelle les LT CD8+ CD103+ CD49a^{neg} sont sous-représentés. Cette différence peut être expliquée par une moindre résolution de la technique *in situ* causée par une différence d'intensité de marquage entre les LT et les autres cellules (**Figure supplémentaire 2**) : l'expression de CD49a est sous-estimée dans l'analyse *in situ* et par conséquent la population CD8+ CD103+ CD49a^{neg} est surestimée.

L'expression de PD-1 et de Tim-3 en cytométrie en flux s'est donc limitée aux populations LT CD8+ CD103+ CD49a+, CD103^{neg} CD49a+ et CD103^{neg} CD49a^{neg}. Cette étude a permis de mettre en évidence que les LT CD8+ CD103+ CD49a+ exprimaient plus PD-1 et Tim-3 en termes d'intensité de marquage et en pourcentage que la population double négative, les LT non Trm (**Figure 7C**).

De façon générale, l'expression d'IC signe un épuisement des LT, caractérisé par une dysfonction voire une perte de cytotoxicité. Cependant, des données préliminaires montrent que le marqueur de prolifération Ki67 pourrait être exprimé par ces cellules au profil épuisé, en l'absence de re-stimulation (**Figure supplémentaire 3**).

Par ailleurs, l'intensité de marquage *in situ* de CD8 était réduite chez cette population comparée aux autres LT CD8+, suggérant un phénotype activé (**Figure supplémentaire 3**) (236).

Les LT au profil Trm présenteraient un profil ambivalent : activé tout en exprimant des marqueurs d'épuisement.



Figure 7 : Expression de molécules de costimulation inhibitrices par les LT CD8+ tumoraux des CBNPC.

Les graphiques représentent la corrélation entre l'expression génique de CD103 (*ITGAE*) et CTLA-4, de PD-1 (*PDCD1*) ou de Tim-3 (*HAVCR2*) d'après la base de données du TCGA, pour les adénocarcinomes pulmonaires. Test de corrélation de Pearson (A). Les tumeurs fraîches de poumon ont été dissociées pour en extraire les composants cellulaires et ont été marquées avec un marqueur de viabilité (Live-dead), un anti-CD3, -CD8, -CD49a, -CD103, -PD-1 et -Tim-3. Les isotypes ont été inclus pour chaque patient. Les graphiques représentent la stratégie d'étude de l'expression de PD-1 et Tim-3 sur les populations de CD3+ CD8+ CD103+ vivantes en cytométrie en flux (B).

Intensité de fluorescence (MFI) et fréquence d'expression de PD-1 et de Tim-3 des différentes populations de CD3+ CD8+ vivantes, d'après les données de cytométrie en flux (C). Résultats représentés sous la forme : moyenne±SEM. Test d'analyse de variances appariées de Friedman, n=6.

Pour aller plus loin dans l'analyse de ces cellules, il s'agissait d'étudier leur impact pronostique. Une étude précédente de l'équipe avait mis en évidence sur une cohorte de 96 patients atteints de CBNPC que la densité par champs de l'infiltrat en LT CD8+ CD103+ était associée à la survie des malades (98). Cette analyse n'avait pas pris en compte les différentes populations de LT CD8+ identifiées dans la présente étude.

Dans une cohorte plus restreinte et avec un comptage plus précis par mm² de tissu plutôt que par champs, il apparaît que seule la combinaison des cellules au profil Trm exprimant au moins une des deux intégrines (CD103+ CD49a+, CD103+ CD49a^{neg} et CD103^{neg} CD49a+) infiltrant le compartiment épithélial (IE) et pas le stroma (ST), serait corrélée à la survie avec un hazard ratio de 2,229 (IC_{95%} : [1,23 ; 4,96]) (**Figure 8**). Cette observation n'est vraie que pour la survie sans progression, et pas la survie globale (**Figure supplémentaire 4**). La distinction entre des cellules intra-épithéliales au profil Trm n'a pas permis d'identifier une population particulièrement corrélée avec la survie des malades, même si graphiquement l'infiltration des LT CD8+ CD103+ CD49a+ semble conférer un avantage avant 60 mois (**Figure supplémentaire 5**).



Figure 8 : Impact pronostique des LT CD8+ Trm ou non Trm dans l'épithélium tumoral et le stroma dans les CBNPC.

Courbes de Kaplan-Mayer de la survie sans progression des patients atteints de cancer du poumon (n=40).

Les tumeurs ont été segmentées en épithélium et stroma par le marquage de l'E-cadhérine, et ont été marquées avec un anti-CD8, -CD103 et -CD49a pour obtenir la numération/mm² de chaque sous-populations de cellules CD8+.

Le terme « Trm » regroupe les cellules CD8+ CD103+ CD49a+, CD8+ CD103+ CD49a^{neg} et CD8+ CD103^{neg} CD49a+, et le terme « non-Trm » désigne les cellules CD8+ CD103^{neg} CD49a^{neg}.

Les patients ont été classés sur la base de leur densité d'infiltrat avec un seuil à la médiane : soit 33 Trm intra-épithéliaux/mm² (A), 67 Trm/mm² de stroma (B), 7 non-Trm/mm² d'épithélium (C) et 71 non-Trm/mm² de stroma (D). Test statistique du Log rank. IE : intra-épithélium, ST : stroma.

Lymphocytes T CD8+ résidents mémoires et structures lymphoïdes tertiaires

La présente étude a mis en évidence des localisations différentes pour les populations lymphocytaires, entre le compartiment tumoral et le stroma. Dans les tumeurs pulmonaires, se trouvent également des structures lymphoïdes tertiaires (TLS), caractérisées par l'infiltration de lymphocytes B. Jusqu'à présent, l'infiltration de Trm dans ces structures n'a pas été mise en évidence. Concernant la relation entre les Trm et les TLS, une étude récente suggère que les Trm des tumeurs génitales participeraient au recrutement cellulaire et à la formation des TLS via la sécrétion de la chimiokine CXCL13 (206).

Pour comprendre si une telle relation est possible dans le CBNPC, les données transcriptomiques du TCGA ont été analysées et vont dans ce sens en montrant une corrélation dans les adénocarcinomes pulmonaires entre l'expression génique de CD103 et celles des marqueurs de TLS : CXCL13, le marqueur de veinules à endothélium épais, PNAd et le marqueur de LB, CD20, mais pas avec le marqueur de DC activées DC-LAMP (**Figure 9**).



Figure 9 : Corrélation entre l'expression transcriptomique de CD103 et des marqueurs des TLS dans les CBNPC. Corrélation entre l'expression génique de CD103 (*ITGAE*) et DC-LAMP (*LAMP3*), CD20 (*MTAM1*), PNAd (*MSYA1*) et CXCL13 d'après la base de données du TCGA, pour les adénocarcinomes pulmonaires. Test de corrélation de Pearson.

Pour comprendre ces résultats, une étude *in situ* de la relation entre les TLS et les Trm a été réalisée avec un marquage CD20, CD8, CD103 et CD49a. Des agrégats cellulaires CD20+ dans le stroma tumoral ont été identifiés pour 13 patients de la cohorte de 48 cancers pulmonaires.

De façon intéressante, dans ces structures, on retrouve les trois populations lymphocytaires Trm identifiées : CD8+ CD103+ CD49a+, CD8+ CD103^{neg} CD49a+ et CD8+ CD103+ CD49a^{neg} (**Figure 10**).





Les coupes congelées de cancers pulmonaires ont été marquées par immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre le CD8 (vert), CD103 (bleu), CD49a (rouge), CD20 (magenta), associés à un marquage des noyaux (gris). Les colorations du CD8, CD103, CD49a et CD20 peuvent être détectées en fusionnant les images monochromes. Le carré blanc montre une cellule CD8+ CD103+ CD49a+, le rouge une CD8+ CD103^{neg} CD49a+ et le bleu une CD8+ CD103+ CD49a^{neg} (zoom x200).

Une segmentation tissulaire a été effectuée et a permis de définir une zone CD20+ et une zone péri-CD20+, pour étudier la répartition des LT au sein de ces structures (**Figure 11A**). Même s'ils sont présents dans les TLS, les proportions de Trm et spécialement de la population double positive CD103+ CD49a+ dans les TLS sont relativement plus faibles que dans le compartiment de référence qui est la tumeur (environ 20% des cellules CD8+ dans les TLS, comparés à plus de 70% dans l'épithélium tumoral) (**Figure 11B**). Leur distribution est différente suivant leur localisation dans le TLS : alors que dans la tumeur ce sont les cellules doubles positives CD103+ CD49+ qui sont les Trm majoritaires et qui sont essentiellement retrouvées dans cette zone, au contact des cellules CD20, les différences sont moins nettes même si l'expression de CD49a semble plus importante au sein du TLS (**Figures 11C-E**).



Figure 11 : Distribution des LT CD8 au profil Trm dans les TLS de CBNPC.

Les coupes congelées de cancers pulmonaires ont été marquées par immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre le CD8, CD103, CD49a et CD20. Trois zones ont été définies pour réaliser la segmentation tissulaire avec en rouge la zone « TLS CD20+ » définie par le marquage CD20, en vert la zone péri-CD20+ définie par le marquage DAPI et en bleu la zone hors TLS (A). Le graphique représente la répartition des Trm (CD8+ CD103+ CD49a+, CD8+ CD103+ CD49a^{neg} et CD8+ CD103^{neg} CD49a+) en fonction de leur localisation dans le TLS au contact ou non des agrégats CD20+, n=13. Les données de la zone tumeur servent de référence et ont été collectées à partir de la cohorte marquée avec les anticorps anti-CD8, -CD103, -CD49a et -E-cadhérine (B). Les camemberts (C) et les histogrammes (D) représentent la répartition des trois populations de Trm dans les trois zones, n=10. Le graphique représente la comparaison de la répartition de chaque sous-populations dans les trois zones (E). Résultats représentés sous la forme : moyenne±SEM. Test d'analyse de variances de Friedman.

Deux équipes ont mis en évidence que la présence de TLS avait un impact positif sur l'infiltrat intra-tumoral des LT CD8+ (73,85). Pour savoir si la présence de TLS impactait plus particulièrement l'infiltration des Trm, deux groupes de patients ont été formés en fonction de la visualisation ou non de TLS sur les coupes tumorales. Les données de comptage pour chaque sous-population ont été récoltées à partir de celles de la cohorte de 48 patients. Pour éviter tous biais, les champs avec TLS ont été exclus du comptage. La comparaison des densités de LT entre les patients présentant des TLS visibles ou non a permis de montrer que les patients TLS+ présentaient un infiltrat en LT CD8+ CD103^{neg} CD49a^{neg} et CD103+ CD49a^{+/-} plus important dans le compartiment épithélial (**Figure 12**). Les autres populations n'étaient pas impactées (**Figure supplémentaire 6**).





Quantification par mm² des CD8+ CD103^{neg} CD49^{neg}, appelés non-Trm et des CD8+ CD103+ CD49a^{+/-} dans l'épithélium tumoral, à partir des données de la cohorte marquée avec les anticorps anti-CD8, -CD103, -CD49a et -E-cadhérine, après classification des patients avec TLS (n=10) ou sans TLS (n=13).

Résultats représentés sous la forme : moyenne±SEM. Test de comparaison de moyennes de Mann-Whitney.

Ces résultats posent la question de la nature de l'interaction entre le TLS et les Trm.

Une des hypothèses pourrait être que les TLS seraient un lieu de *priming* ou de différentiation des Trm. Cependant, les Trm sont peu représentés dans les TLS (20% des cellules CD8+) et ont une distribution dispersée dans les TLS, et non pas en *cluster* comme lors d'une prolifération. Dans notre étude, il est également intéressant de noter que dans les TLS, les ligands E-cadhérine et collagène IV des intégrines CD103 et CD49a respectivement ne sont pas exprimés ; on peut se demander le rôle de ces intégrines dans ce contexte.

Une autre hypothèse pourrait être que les Trm soient à l'origine de la formation de TLS. Une étude récente suggère notamment que les Trm pourraient participer à leur formation par la sécrétion de la chimiokines CXCL13 chimio-attractantes des LB et des LT folliculaires CXCR5+ (206). Pour tester cette hypothèse, les données de la **figure 12** ont été réanalysées pour évaluer si la densité de Trm était associée à une présence de TLS.

Ainsi, seule la densité de l'infiltrat intra-épithélial de la population double négative est corrélée avec la présence de TLS (**Figure 13**). Néanmoins, la valeur-p de la comparaison des distributions des populations exprimant CD103 en fonction de l'infiltration de TLS ou non est proche du seuil de significativité de 5% défini arbitrairement (valeur-p=0,072).

Pour aller plus loin dans l'étude de ces deux hypothèses et donc de la relation entre TLS et Trm, des modèles murins ont été mis au point.

Dans un premier temps, la problématique était de savoir si l'induction de Trm nécessitait la présence de TLS. Pour répondre à cette question, l'équipe possède un protocole classique d'induction des Trm qui consiste en deux administrations à 14 jours d'intervalle du vaccin STxB-E7 associé à l'adjuvant α -GalCer par voie i.n. Cette vaccination permet le développement de LT CD8+ anti-E7 au profil Trm dans les voies respiratoires (98,217). Cependant, avec ce protocole de vaccination, aucun agrégat de lymphocytes B n'a été identifié (n= 7 – données non montrées). Dans ce modèle, l'induction de Trm n'était donc pas dépendante de la présence de TLS.

Il est néanmoins connu que la formation de TLS est favorisée par un contact chronique avec l'antigène ; or, ce protocole ne présente que deux injections.

Pour pallier à ce problème d'induction de TLS, dans un second temps, un protocole d'hyperimmunisation de six injections associées à une première injection d'aluminium, connu pour activer l'inflammasome et contribuer à l'induction de TLS, a été mis au point sur la base de la publication de Silina et *al* (**Figure 14A**) (85). Ce protocole permet l'induction de TLS (**Figures 14B-D**) avec la présence de cellules CD8+ CD103+ au contact de ces zones, confirmant les données chez l'Homme. Il s'agira par la suite de comparer leur cinétique d'apparition.

	_		
	High number	Low number	Total
TLS+	8 (67%)	2 (15%)	10
TLS-	4 (33%)	11 (85%)	15
Total	12	13	25
		P-value	0.0089

	_		
	High number	Low number	Total
TLS+	7 (58%)	3 (23%)	10
TLS-	5 (42%)	10 (77%)	15
Total	12	13	25
		P-value	0.072

	Number of T cell subsets				
	High number	Low number	- Total		
TLS+	6 (50%)	4 (31%)	10		
TLS-	6 (50%)	9 (69%)	15		
Total	12	13	25		
		P-value	0.57		

T cell subsets:

- total CD8+ cells (IE and ST)
- CD103+ CD49a+/- (IE and ST)
- CD103+ CD49a+ (ST)
- CD103+ CD49a^{neg} (IE)

T cell subsets:	sets:		cel	т
-----------------	-------	--	-----	---

- total Trm cells (IE and ST)
- CD103+/- CD49a+ (IE and ST)
- CD103+ CD49a+ (IE)
- CD103^{neg} CD49a+ (IE and ST)
- CD103^{neg} CD49a^{neg} (ST)

Figure 13 : Impact de l'infiltration lymphocytaire sur la présence de TLS dans les CBNPC.

Tableaux de contingence de la présence ou non de TLS en fonction de la densité de l'infiltrat pour les populations cellulaires nommées à droite de chaque tableau. Les données de comptage des différentes populations cellulaires ont été obtenues à partir du marquage en immunofluorescence *in situ* : CD8, CD103, CD49a et E-cadhérine. Les tumeurs ont été segmentées en intra-épithélium et stroma par le marquage de l'E-cadhérine. La présence de TLS est confirmée par un marquage CD20 regroupé en agrégats. Les seuils entre « high » et « low » ont été définis à partir des médianes. Tests de comparaison de pourcentages du X² ou du X² corrigé de Yates, n=25. IE : intra-épithélium/ST : stroma.



E7 vaccine



Only Al administration



С

В



D



Figure 14 : Présence de Trm dans les TLS pulmonaires dans un modèle d'hyper-immunisation par voie i.n.

Le protocole consiste à administrer par voie i.n. 200µg d'aluminium à J0 puis 50µg de G15F, le long peptide (LP) dérivé de la protéine E7 à J7, J9, J11, J18, J21, J23 et consiste à recueillir les poumons à J24 (A). Les tissus pulmonaires ont été marqués avec un anti-B220 (rouge), marqueur de lymphocytes B et un anti-CD8 (jaune).

Scan global des coupes congelées de poumon de souris vaccinées ou ayant uniquement reçu d'aluminium à JO (B) et scan zoomé sur deux TLS (C). Images pour 1 souris représentative, n=5, expérience reproduite deux fois.

Les tissus pulmonaires ont également été marqués avec un anti-B220 (blanc), un anti-CD8 (jaune) et un anti-CD103 (rouge). Dans un TLS, les carrés blancs indiquent les cellules CD8+ CD103+ au contact des cellules B220+ (D) (zoom x200).

Induction muqueuse des Trm

Les Trm sont des cellules cytotoxiques de bon pronostic dans les cancers. Leur induction dans le cadre d'un traitement antitumoral est donc un enjeu thérapeutique. Il existe pourtant peu de données concernant leur induction. Dans le cadre du poumon, il est connu que le tissu peut développer des structures lymphoïdes ou BALT (*bronchus-associated lymphoid tissue*) qui pourraient être à l'origine d'une activation lymphocytaire. Par ailleurs, le poumon est riche en cytokines inductrices du phénotype Trm (235). Notre équipe a également montré que les DC pulmonaires étaient capables d'induire l'expression de CD49a sur les LT (217), suggérant le fait qu'un *priming* muqueux pourrait être à l'origine de la formation de Trm. Pour étudier la question d'un *priming* pulmonaire, deux expériences ont été réalisées.

Dans un premier temps, l'induction de Trm a été étudiée en absence d'organe lymphoïde secondaire (SLO) chez des souris déficientes en lymphotoxine- α (Lta^{-/-}). Ces souris sont viables, ne présentent pas de ganglion mais possèdent une rate ; pour un groupe, la rate a donc été enlevée, pour l'autre groupe, les souris ont seulement subi une laparotomie pour éviter tout biais causé par la chirurgie. Après vaccination i.n., les LBA des souris Lta^{-/-} et des souris sauvages splénectomisées comportent des LT CD8+ mais très peu (<5%) sont spécifiques comparés aux taux obtenus classiquement de 10 à 20% (217) (**Figure supplémentaire 7**). Très peu de LT CD8+ spécifiques sont également détectés dans la rate des souris ayant subi une laparotomie. Pour éliminer l'hypothèse d'un problème technique, d'un lot de vaccin peu efficace ou d'un impact de la chirurgie, cette expérience devra être reproduite avec un groupe contrôle non laparotomisé.

Dans un second temps, la formation de Trm a été analysée après vaccination i.n., en l'absence de recrutement de LT issus des SLO par blocage pharmacologique avec le FTY720 (**Figure 15A**). Ce composé chimique permet une modulation du récepteur S1PR1, bloquant ainsi la sortie des LT depuis les SLO. Il induit donc une lymphopénie qui a été contrôlée dans cette expérience (**Figure 15B**). Des données préliminaires montrent une induction de LT spécifiques au profil Trm dans le groupe ayant reçu le FTY720 (**Figure 15C**). Cette induction est retardée par rapport au groupe vacciné contrôle. Comme contrôle de l'induction d'une réponse immunitaire, la présence d'une réponse spécifique a été vérifiée dans les ganglions afférents. Les deux groupes de souris présentent effectivement des LT CD8+ spécifiques à J21 (**Figure 15D**).

Cependant, à J28, seules les souris ayant reçu le FTY720 présentent un pool maintenu de LT CD8+ spécifiques, suggérant leur rétention, plutôt que leur migration périphérique. Ces premières données valideraient donc l'hypothèse d'un *priming* pulmonaire.



Figure 15 : Induction d'une réponse T spécifique dans le LBA et les ganglions médiastinaux après vaccination i.n. en l'absence de recrutement de LT circulants.

Les souris reçoivent le FTY720 quotidiennement à partir de 2 jours avant la première vaccination jusqu'au 28^{eme} jour. Le composé chimique présente une demi-vie de 24h, une numération formule sanguine (CBC) a donc été réalisée à J-1. Les souris sont vaccinées à J0 et J14 avec 20µg de vaccin STxB-OVA et 2µg d'adjuvant α -GalCer à J0. Les organes sont récupérés à J21 et J28 (A).

Moyenne des résultats de la CBC pour deux souris confirmant la lymphopénie induite par le FTY720 (B).

Les cellules issues des prélèvements ont été marquées avec un marqueur de viabilité (Live-dead), un anti-CD3, -CD8, -CD49a, -CD103 et le tétramère. Les graphiques représentent, pour une souris/groupe représentative, l'expression des marqueurs de Trm CD103 et CD49a à partir des cellules CD3+ CD8+ tétramères+ vivantes, obtenue à partir des LBA (C) et des ganglions médiastinaux (D) des souris ayant reçu le FTY720 ou non, à J21 et J28. Les isotypes ont été inclus dans l'expérience. Expérience réalisée une fois, n=4/groupe.

Conclusion

Les LT CD8+ résidents mémoires représentent une nouvelle population de LT mémoires au phénotype hétérogène, impliquée dans le contrôle de la croissance tumorale infiltrant les tumeurs, notamment les cancers du poumon. L'hétérogénéité du phénotype des Trm en lien avec leur situation topographique dans les tumeurs n'est pas connue à ce jour.

Grâce à une technique innovante d'immunofluorescence multiparamétrique *in situ* et de *machine-learning*, nous avons pu identifier trois populations de Trm sur la base de leur expression des intégrines CD103 et CD49a, dans une cohorte de 48 patients atteints de tumeur pulmonaire. Nos travaux ont permis de mettre en évidence que l'expression de ces deux intégrines expliquait la localisation des Trm au sein de la tumeur. L'expression de CD103 déterminait, en effet, le contact des LT CD8+ avec la cellule tumorale épithéliale, associée à une forte expression en molécules de costimulation inhibitrices en cytométrie en flux. Nos données préliminaires suggèrent que ces cellules CD103+ auraient, paradoxalement à leur phénotype épuisé, un plus fort potentiel prolifératif. Les LT CD8+ non CD103 exprimant CD49a étaient, quant à eux, préférentiellement localisés dans le stroma tumoral riche en collagène IV, le ligand de CD49a, et donc à distance des cellules tumorales.

Notre étude constitue également la première preuve de la présence de Trm au sein des TLS des tumeurs pulmonaires, mais également au sein des TLS pulmonaires dans un modèle murin d'hyperimmunisation par voie intranasale. De plus, par des études *in situ* et par une analyse transcriptomique de la base de données publique TCGA, nous avons mis en évidence une relation entre la densité de l'infiltrat des Trm et la présence de TLS intra-tumoraux.

Finalement, dans le cadre d'une étude de l'induction des Trm localement après vaccination par voie intranasale et blocage par le FTY720 du recrutement tissulaire de lymphocytes provenant des organes lymphoïdes, nos résultats préliminaires suggèrent que la possibilité d'un *priming* muqueux pulmonaire.


Synthèse du second travail : Localisation intra-tumorale des LT CD8+ et lien avec les TLS dans les CBNPC.

A. Les LT CD8+ CD103+ sont préférentiellement localisés au contact de l'épithélium tumoral exprimant le ligand de CD103 : l'E-cadhérine, ce qui peut expliquer la forte expression en IC. La cellule CD103+ non CD49a identifiée dans les expériences *in situ* pourrait correspondre à une population CD49a^{low}. Les LT CD49a+ non CD103, comme les LT non Trm, sont plutôt localisés dans le stroma tumoral au contact du ligand de CD49a, le collagène. Finalement les Trm intra-épithéliaux correspondent à un facteur de bon pronostic dans le CBNPC. B. Les populations de Trm sont différentes au sein des TLS et moins homogènes. Les LT CD49a+ semblent majoritaire dans la zone péri-TLS, alors que dans la zone B CD20+, les trois populations sont retrouvées. La présence de TLS est corrélée à un infiltrat plus dense en LT CD8+ doubles négatifs et en LT CD8+ CD103+ dans l'épithélium tumoral. De même, de forts infiltrats en LT CD8+ doubles négatifs intra-épithéliaux et en LT CD8+ CD103+ au sein de la tumeur (épithélium et stroma) semblent associés à la présence de TLS dans les CBNPC.

TLS : Tertiary Lymphoid Structure. IC: immune checkpoint. CBNPC: Cancer du poumon non à petites cellules.

Figures supplémentaires



Figure supplémentaire 1 : Intensité de fluorescence de CD49a exprimée par les populations de LT infiltrant les CBNPC en fonction de leur localisation tumorale.

Les coupes congelées de cancers pulmonaires ont été marquées par immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre le CD8, CD103, CD49a et l'E-cadhérine pour obtenir un comptage automatisé de chaque population cellulaire en fonction de leur localisation mais également pour obtenir l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) de chaque marquage. Le marquage E-cadhérine permet l'identification des îlots carcinomateux et la distinction entre l'épithélium et le stroma tumoral.

Les graphiques représentent la MFI de CD49a sur les cellules CD8+ CD103+ CD49a+ (A) ou CD8+ CD49a+ non CD103 (B). Résultats représentés sous la forme : moyenne±SEM. Test de comparaison de moyennes appariées de Wilcoxon, n=48.



Figure supplémentaire 2 : Visualisation de la différence d'intensité de marquage CD49a entre deux structures dans le CBNPC.

Les coupes congelées de cancers pulmonaires ont été marquées par immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre le CD8, CD103, CD49a (rouge) et le collagène IV (blanc). Le carré blanc indique une cellule CD49a et le rectangle jaune indique une structure exprimant fortement le CD49a et le collagène IV (zoom x200).



Figure supplémentaire 3 : Intensité de fluorescence de CD8 et de Ki67 sur les populations de LT CD8+ dans les CBNPC. Les coupes congelées de cancers pulmonaires ont été marquées par immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre le CD8, CD103, CD49a et l'E-cadhérine pour obtenir l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) de chaque marquage. Le marquage E-cadhérine permet l'identification des îlots carcinomateux et la distinction entre l'épithélium et le stroma tumoral. Le graphique représente la MFI *in situ* de CD8 sur chacune des populations CD8+. Résultats représentés sous la forme : moyenne±SEM, lorsque le SEM est non négligeable. Test de comparaison de moyennes appariées de Wilcoxon, n=48 (A).

Les tumeurs fraîches de poumon ont été dissociées pour en extraire les composants cellulaires. Les tumeurs ont été marquées avec un marqueur de viabilité (Live-dead), un anti-CD3, -CD8, -CD49a, -CD103 et -Ki67 en intracellulaire. Les isotypes ont été inclus pour chaque patient. MFI de Ki67 sur les cellules de CD3+ CD8+ vivantes obtenue en cytométrie en flux sur les cancers du poumon. Résultat montré pour un patient, n=2 (B).



Figure supplémentaire 4 : Impact des LT CD8+ Trm ou non-Trm sur la survie globale dans les CBNPC.

Courbes de Kaplan-Mayer de la survie globale des patients atteints de cancer du poumon (n=40).

Les tumeurs ont été segmentées en épithélium et stroma par le marquage de l'E-cadhérine, et ont marquées avec un anti-CD8, -CD103 et -CD49a pour obtenir la numération/mm² de chaque sous-population de cellules CD8+.

Le terme « Trm » regroupe les cellules CD8+ CD103+ CD49a+, CD8+ CD103+ CD49a^{neg} et CD8+ CD103^{neg} CD49a+, et le terme « non-Trm » désigne les cellules CD8+ CD103^{neg} CD49a^{neg}.

Les patients ont été classés sur la base de leur densité d'infiltrat avec un seuil à la médiane : soit 33 Trm intraépithéliaux/mm² (A), 67 Trm/mm² de stroma (B), 7 non-Trm/mm² d'épithélium (C) et 71 non-Trm/mm² de stroma (D). Test statistique du Log rank. IE : intra-épithélium, ST : stroma.



Figure supplémentaire 5 : Impact des trois populations de Trm intra-épithéliales sur la survie globale et sur la survie sans progression dans les CBNPC.

Courbes de Kaplan-Mayer de la survie globale (A, C et E) ou sans progression (B, D et F) des patients atteints de cancer du poumon (n=40). Les tumeurs ont été segmentées en tumeur et stroma par le marquage de l'E-cadhérine, et ont marquées également avec un anti-CD8, -CD103 et -CD49a pour obtenir la numération/mm² de chaque sous-population de cellules CD8+. Les patients ont été classés sur la base de leur densité d'infiltrat avec un seuil à la médiane. Test statistique du Log rank. IT : intra-tumoraux, ST : stroma.



Figure supplémentaire 6 : Impact de la présence de TLS sur la densité de l'infiltrat lymphocytaire T CD8+ dans les CBNPC.

Les coupes congelées de cancers pulmonaires ont été marquées par immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre le CD8, CD103, CD49a et l'E-cadhérine, pour quantifier les différentes populations lymphocytaires en fonction de leur localisation. Le marquage E-cadhérine permet l'indentification des îlots carcinomateux. Le terme « Trm » regroupe les cellules CD8+ CD103+ CD49a+, CD8+ CD103+ CD49a^{neg} et CD8+ CD103^{neg} CD49a+.

Quantification par mm² des populations de LT CD8+ dans l'épithélium tumoral et le stroma après classification des patients avec TLS (n=10) ou sans TLS (n=13), à partir des données de la cohorte marquée avec les anticorps anti-CD8, - CD103, -CD49a et -E-cadhérine.

Résultats représentés sous la forme : moyenne±SEM. Test de comparaison de moyennes appariées de Mann-Whitney. IE : intra-épithélium, ST : stroma.





Figure supplémentaire 7 : Induction pulmonaire de LT CD8+ spécifiques après vaccination i.n. chez les souris Lta^{-/-} et sauvages.

Les souris Lta^{-/-} et sauvages (WT) sont splénectomisées (SP) ou laparotomisées 12 jours avant la première vaccination par voie i.n. Les souris sont vaccinées à J0 et J14 avec le vaccin STxB-E7 associé ou non avec 2µg d'adjuvant α -GalCer puis les lavages bronchoalvéolaires et la rate sont recueillis à J28.

Les cellules issues des prélèvements ont été marquées avec un marqueur de viabilité (Live-dead), un anti-CD3, -CD8, -CD49a, -CD103 et le tétramère. Les graphiques représentent pour une souris/groupe représentative l'expression du tétramère sur les cellules CD3+ CD8+ vivantes du LBA ou de la rate. Les isotypes contrôles ont été inclus dans l'analyse. n=3- 5/groupe.

Matériels et méthode supplémentaires

Animaux

Des souris C57BL/6 (H-2^b) ont été achetées chez Charles River et les souris Lta^{tm1Dch} ont été fournies par le laboratoire Jackson (Boston, USA). Toutes les souris ont été hébergées dans des conditions stériles dans l'animalerie de l'unité INSERM 970. En accord avec les directives européennes (EC2010/63), les expériences ont été réalisées après soumission et validation des protocoles par le comité d'éthique de l'Université Paris Descartes (CEEA 34).

Splénectomie

Les souris ont été anesthésiées par voie intrapéritonéale (4 mg/kg de kétamine et 2 mg/kg de xylazine), pesées, rasées et déposées sur un tapis chauffant pour maintenir la température corporelle. Elles ont reçu 0,5mg/kg de buprénorphine par voie sous-cutanée 20 minutes avant la chirurgie. La peau a été désinfectée avec de la bétadine et les yeux humidifiés. Une incision de la peau et de la paroi du péritoine a été réalisée dans le flanc gauche pour clamper les vaisseaux de la rate et ensuite retirer l'organe. Les souris contrôles ont seulement subi une laparotomie. La paroi du péritoine est ensuite recousue et la peau refermée. Les souris sont suivies jusqu'à leur réveil puis quotidiennement.

Discussion

1 Identification des lymphocytes T résidents mémoires au sein des tumeurs

Les deux travaux de cette thèse se sont centrés sur l'étude des populations lymphocytaires CD8+ infiltrant les tumeurs, associées au phénotype Trm. Les Trm sont impliqués dans la physiopathologie des cancers, où ils détiennent un rôle important dans l'immunosurveillance et dans le contrôle de la croissance tumorale par leur cytotoxicité accrue et leur localisation préférentielle au sein des tissus tumoraux. Cette population est historiquement définie dans des contextes infectieux par l'expression de l'intégrine CD103 à sa surface, complétée par CD49a et CD69. Toutefois, le phénotype Trm reste complexe et varie en fonction du microenvironnement du LT (200,208,209). La question de l'hétérogénéité de ces LT n'a pas été approfondie jusqu'à présent dans le cancer.

1.1 Choix des marqueurs pour l'étude des Trm

CD103 et CD49a

Un des enjeux de l'étude des Trm est tout d'abord le choix de la méthode et des marqueurs à utiliser. Nous nous sommes basés sur des données précédentes de l'équipe qui ont définies, par des analyses transcriptomique et phénotypique, CD103 et CD49a comme marqueurs principaux des LT CD8+ infiltrant le LBA des souris après vaccination i.n., en comparaison avec les LT CD8+ spléniques (98,217). Ces cellules CD103+ CD49a+ présentaient en effet un profil Trm, dont les propriétés mémoire et résidente ont été confirmées par des expériences chez la souris. Ces deux intégrines étaient également retrouvées sur les LT CD8+ humains *in situ* dans le CBNPC et l'infiltrat en CD8+ CD103+ était d'ailleurs corrélé avec un bon pronostic (98).

Grâce à une analyse multiparamétrique *in situ*, couplée à une technologie de microscopie spectrale et à une analyse en cytométrie en flux, nous avons pu compléter cette précédente étude et mettre en évidence une co-expression de CD49a et de CD103 dans le CBNPC mais également des cellules exprimant une des deux intégrines. De façon intéressante, nos expériences de cytométrie en flux montrent que l'ensemble des LT CD103+ expriment CD49a alors qu'il existe des LT CD49a+ non CD103 ; par conséquent, si les cellules CD103+ CD49a+ et CD103^{neg} CD49a+ sont des Trm, l'intégrine CD49a pourrait être considérée comme un marqueur pan-Trm. Toutefois, nos expériences d'immunofluorescence *in situ* montrent l'infiltration de cellules CD103+ CD49a^{neg}, absentes des analyses de cytométrie en flux. Cette différence pourrait être expliquée par les résolutions des deux technologies avec un marquage CD49a sous-estimé *in situ*: les cellules CD49a^{low} retrouvées en cytométrie en flux pourraient être considérées *in situ* comme CD49a^{neg}. Dans d'autres études, les LT CD8+ CD103+ CD49a^{neg} n'étaient pas retrouvés dans le CBNPC et le mélanome (172,194), même s'ils étaient présents dans la peau de sujets sains ou atteints de vitiligo ou de psoriasis (237). Il s'agira par la suite de déterminer l'existence ou non de cette population dans le CBNPC.

En absence à ce jour de marqueur spécifique des Trm, nous avons choisi dans nos deux travaux de définir les Trm comme les cellules positives pour au moins une des deux intégrines mais cette décision reste arbitraire.

CXCR6

L'analyse transcriptomique a également révélé une surexpression du récepteur de chimiokine CXCR6 par les LT CD8+ spécifiques au profil Trm du LBA après vaccination i.n. comparée aux LT spléniques.

Nous avons tout d'abord cherché à confirmer l'expression protéique de CXCR6. En absence d'anticorps détectant de façon reproductible CXCR6 chez la souris, un modèle murin CXCR6^{Gfp/+} hétérozygote pour le gène *Cxcr6* pour lequel un des deux allèles a été remplacé par le gène de la GFP, a permis, via la détection de la GFP, de confirmer la forte expression de CXCR6 sur plus de 70% des LT CD8+ au profil Trm du LBA et des tumeurs orthotopiques ORL, après vaccination i.n. Son expression sur les LT spléniques n'était que négligeable, ce qui fait de CXCR6 un marqueur pulmonaire local dans le cadre de l'immunisation i.n.

Chez l'Homme, CXCR6 a pu également être observé sur des cellules CD8+ CD103+ dans le CBNPC. Une surexpression transcriptomique de *CXCR6* avait été décrite dans les LT des poumons et dans les tumeurs pulmonaires fortement infiltrées en TIL (172,199). Dans le CBNPC, CXCR6 était d'ailleurs plus exprimé par les LT CD8+ exprimant CD103 que sur les cellules non CD103 (172,197).

Le premier travail avait pour ambition d'identifier un marqueur spécifique des Trm ; il s'avère cependant que CXCR6 est retrouvé dans notre étude sur plus de 70% des LT non-Trm et chez l'Homme sur des cellules tumorales, montrant ainsi la limite des études transcriptomiques.

Marqueurs spécifiques ou signature Trm

Finalement, nos études ont décrit l'expression de CD103, de CD49a et de CXCR6 sur des LT infiltrant les tissus respiratoires et les tumeurs associées. Nous ne nous sommes pas intéressés au marqueur d'activation CD69, pas spécifique des Trm mais souvent étudié dans la littérature. D'autres marqueurs de Trm ont également été décrits comme par exemple $\alpha_2\beta_1$, CCR5, CXCR3 ou Runx3 (226,238).

La question du marqueur spécifique de Trm reste donc toujours d'actualité. Les intégrines et les récepteurs de chimiokines étant exprimés par d'autres composants cellulaires, il s'agirait de trouver d'autres protéines plus spécifiques. Dans la littérature récente, des FT sont décrits pour être spécifiques des Trm comme Hobit, Blimp-1 et Runx3, et pourraient faire l'objet de marqueurs de Trm, intracellulaires toutefois. Néanmoins, une analyse transcriptomique sur cellules uniques a rapporté qu'Hobit n'était pas exprimé par tous les LT CD8+ exprimant CD103 et que Blimp1 et Runx3 pouvaient être exprimés par d'autres cellules que les Trm (200).

On voit récemment apparaître dans les études transcriptomiques le terme de « signature Trm » qui regroupe un ensemble de marqueurs dont CD103 et CD69 (203,204). Pour les Trm qui présentent un phénotype hétérogène, l'analyse d'un cluster de marqueurs apparaît plus pertinente, notamment pour les études d'expression génique.

1.2 Présence de sous-populations de Trm au sein des tumeurs

Aucune étude n'a jusqu'à présent analysé l'impact de l'expression simultanée des deux intégrines CD103 et CD49a sur la cellule CD8+ et sur le pronostic du patient.

Pour répondre à cette question, nous avons mis au point deux marquages multiparamétriques chez l'Homme en immunofluorescence *in situ* sur coupes congelées et en cytométrie en flux sur prélèvements frais. Ces techniques ont permis l'identification de plusieurs populations de LT CD8+ chez l'Homme sur la base de leur expression de CD103 et CD49a : les LT doubles négatifs et les LT que nous avons regroupés sous le terme de « Trm ». Ces derniers sont composés *in situ* de la population majoritaire CD103+ CD49a+, de la population CD103- CD49a+ et de la population minoritaire CD103+ CD49a- et sont associés à la survie des malades atteints de CBNPC dans notre cohorte rétrospective. Notre étude décrit ainsi des sous-populations dans le CBNPC pour la première fois. Les données murines du premier travail viennent confirmer cette observation. Ces trois phénotypes étaient également retrouvés dans une autre étude dans le cancer du poumon et dans le mélanome (172,194,238).

Pour aller plus loin, nous avons étudié la localisation au sein des tumeurs des LT CD8+ identifiés et de leur phénotype.

Plusieurs études ont révélé que l'expression de CD103 était associée à une proximité avec les cellules tumorales (98,152,195,196). Dans notre travail, quelle que soit l'expression de CD49a, l'expression de CD103 semble en effet déterminer la localisation intra-épithéliale des LT CD8+. Parmi les LT CD8+ CD103+, les LT doubles positifs CD103+ CD49a+ sont principalement retrouvés au contact des cellules tumorales E-cadhérine+, ligand de CD103, dans la zone intra-épithéliale et présentent une forte expression en pourcentage et en MFI des molécules de costimulation inhibitrices PD-1 et Tim-3. L'expression de ces IC est connue pour faire suite à une stimulation antigénique chronique et pourrait être expliquée par leur proximité avec les cellules tumorales. *A contrario*, les LT CD8+ doubles négatifs sont majoritairement retrouvés dans le compartiment stromal et expriment significativement moins les IC.

L'expression des IC par les Trm infiltrant les tumeurs pulmonaires est largement décrite et est majoritaire sur les Trm comparés aux non Trm (172,192,197). Elle pourrait refléter un état dysfonctionnel ou épuisé du LT. Nous avons débuté une caractérisation plus complète avec l'étude de l'expression du marqueur de prolifération Ki67 montrant pour deux patients que cette population double positive semblait plus activée que les autres populations, soulignant le caractère ambivalent de ces LT. Dans un modèle orthotopique de mélanome, les LT CD8+ CD103+ CD49a+ exprimaient plus fortement PD-1 que les autres populations, avec paradoxalement plus de granzymes B et d'IFN-γ (194). Par la suite, il faudra réaliser une étude fonctionnelle pour déterminer l'état d'activation ou de dysfonctionnement de cette population particulière.

La présence de plusieurs profils de LT CD8+ au sein de la tumeur pose la question de leur différenciation et de la plasticité de leur phénotype. Les sous-populations de Trm pourraient provenir d'un précurseur commun et se différencier localement au contact de la tumeur connue pour être source de TGF- β , inducteur de CD103. Cette hypothèse pourrait faire l'objet d'étude cinétique de l'apparition de chacune de ces populations dans des modèles murins ou d'étude de la spécificité des TCR de chacune des sous-populations. L'étude de ces phénotypes dans d'autres microenvironnements tumoraux pourrait apporter également une information sur les différences de phénotype. Une autre hypothèse pourrait être une pression de sélection au contact de la tumeur E-cadhérine+, expliquant la localisation préférentielle de CD103 dans la zone intra-épithéliale. Ces questions restent ouvertes.

1.3 Correspondance entre le phénotype et l'identification des Trm

Les Trm ont initialement été décrits sur la base de leur expression d'intégrines et principalement de CD103. Dans le cancer, leur identification a été calquée sur celle définie dans les contextes infectieux. La pertinence de l'étude de l'expression des intégrines par les LT pour identifier les Trm peut être sujet à discussion aujourd'hui ; les récentes publications chez l'Homme préfèrent le terme « Trm-like » pour désigner les LT CD8+ CD103+ intra-tumoraux.

En effet, il n'existe pas à l'heure actuelle de donnée attestant de la nature Trm des TIL CD8+ humains. De plus, les analyses basées sur la cytométrie en flux ne permettent pas comme dans les études *in situ* d'exclure les LT sanguins. Sachant que CD49a pourrait être retrouvé sur les LT dans le sang, ce biais est à prendre en compte (194). Se pose également la question des TIL dits « *bystanders* » ou non spécifiques des antigènes tumoraux, présents sur le site tumoral et qui ne sont pas évitables dans les analyses.

Quant aux études murines, elles ont montré l'infiltration tumorale de Trm par des modèles de parabiose ou d'administration du composé chimique FTY720 (93,98). Dans ces analyses, il est possible de s'affranchir des LT circulants par un marquage lymphocytaire par voie intraveineuse et par une perfusion des tissus. Il n'est cependant pas assuré qu'à temps précoce, à 7 jours post-boost dans nos études, que l'ensemble des cellules CD103+ CD49a+ soient réellement des Trm. L'emploi du terme « Trm » est donc à nuancer.

2 Impact du phénotype Trm sur la réponse antitumorale

L'infiltrat des Trm CD103+ dans les tumeurs est de bon pronostic pour les malades et semble même de meilleur pronostic que les autres populations de LT CD8+ dans certains cancers (98,203). Notre étude montre dans une cohorte de 40 patients que la présence intra-épithéliale dans le CBNPC de la combinaison des trois populations exprimant au moins une des deux intégrines CD103 et CD49a est associée à une meilleure survie des malades alors que la population CD103^{neg} CD49a^{neg} n'est pas considérée comme un facteur pronostique. Malgré que les Trm présentent un phénotype plus épuisé avec l'expression d'IC, ils possèdent donc objectivement un avantage comparé aux autres LT. Pour comprendre les mécanismes derrière ce bénéfice pronostique, le phénotype original des Trm pourrait apporter des réponses. Nous ne discuterons que les marqueurs étudiés dans cette thèse mais d'autres molécules exprimées par ces cellules ont été décrites pour avoir un impact sur leur activité antitumorale comme CXCR3, les intégrines $\alpha4\beta7$ et $\alpha2\beta1$ ou le FT Runx3 (112,202,218,238,239).

2.1 CXCR6 et recrutement des lymphocytes T dans la tumeur

CXCR6 est un récepteur de chimiokine, connu pour contribuer à la migration des cellules via le gradient de son unique chimiokine CXCL16 dans des modèles infectieux *Mycobacterium* (240). CXCL16 est produit de façon constitutive par les cellules épithéliales pulmonaires et les CPA (241,242). CXCR6 est exprimé par les LT CD8+ antitumoraux mais son impact sur l'immunosurveillance des cancers n'a pas été décrit.

Pour répondre à cette question, plusieurs modèles ont été mis au point pour comparer la survie et l'infiltrat T des souris CXCR6^{Gpf/Gfp}, déficientes en CXCR6, aux souris sauvages. Les souris ont été vaccinées par voie i.n. selon différents protocoles d'immunisation et ont été greffées avec des cellules pulmonaires tumorales TC-1 dans la joue ou dans la langue. La déficience en CXCR6 réduisait la survie des souris dans le modèle lingual ainsi que la protection vaccinale en termes de contrôle de la croissance tumorale pour le modèle de greffe jugale. Ces observations étaient associées à temps précoce, à 7 jours post-boost, à un défaut d'infiltration des LT CD8+ totaux et des LT spécifiques de l'antigène vaccinal chez les souris CXCR6^{Gpf/Gfp} comparé aux souris sauvages. Au contraire, ces populations lymphocytaires ne sont pas modifiées dans le compartiment systémique, soulignant l'impact pulmonaire local de CXCR6.

Dans un modèle de tumeurs mammaires, le même impact sur la survie après radiothérapie était observé chez les souris CXCR6^{*Gfp/Gfp*} comparé aux souris sauvages (117).

De façon intéressante, le pourcentage de Trm parmi les LT CD8+ spécifiques n'est pas modifié dans les tumeurs des souris vaccinées CXCR6^{*Gfp/Gfp*}, ce qui suggère que CXCR6 n'est pas impliqué dans leur différenciation, mais plutôt dans la survie ou migration des LT CD8+ vers les voies respiratoires.

Dans un contexte tumoral, l'axe CXCR6/CXCL16 pourrait en effet être impliqué dans le recrutement sur le site de la tumeur des LT CD8+ antitumoraux exprimant CXCR6. Les cellules tumorales produisent du CXCL16 (117,118,137) et l'expression de cette chimiokine était d'ailleurs corrélée avec un infiltrat lymphocytaire plus dense et, par conséquent, à une survie plus importante chez les patients atteints de cancer colorectal (118). Dans des lignées cellulaires murines et humaines, la sécrétion de CXCL16 est augmentée après irradiation et favorise *in vitro* la migration des LT (117,243).

Notre étude s'est seulement concentrée sur les LT CD8+ mais CXCR6 est exprimé par d'autres populations cellulaires impliqués dans la physiopathologie du cancer comme les LT CD4+, les NK, les cellules lymphoïdes innées (244–247).

La déficience en CXCR6 n'abroge toutefois pas totalement l'effet bénéfique de la vaccination avec tout de même 60% de survie chez les souris CXCR6^{*Gfp/Gfp*}. Ce pourcentage relativement élevé peut être expliqué par la propriété de redondance du réseau chimiokinique où d'autres récepteurs de chimiokines pourraient être impliqués dans le *homing* des LT CD8+ dans le poumon. Il a été montré en effet que CXCR3 et CCR5 y favorisaient la migration des LT (248–251) et étaient co-exprimés avec CXCR6 par les LT CD103+ dans une analyse transcriptomique (252). Cette propriété particulière reste à être explorée.

2.2 <u>CD103 et interaction avec la cellule tumorale</u>

L'intégrine CD103 est impliquée dans l'immunosurveillance des tumeurs. Exprimée par les LT CD8+, elle participe à leur cytotoxicité et à l'adhésion avec la cellule tumorale épithéliale Ecadhérine+, ce qui peut expliquer leur localisation préférentielle au sein de la tumeur. Nos données *in situ*, décrites précédemment, vont d'ailleurs dans ce sens. A un stade avancé, la tumeur acquière des propriétés migratoires via la transition épithéliomésenchymateuse qui conduit à une régulation négative des marqueurs épithéliaux comme l'Ecadhérine (253,254). Notre analyse des données issues de la base TCGA montre que l'expression transcriptomique de l'E-cadhérine est inversement proportionnelle à celle de CD103 que l'on peut extrapoler aux LT dans la tumeur (192,196,212,213). Shields et *al*, ont montré que l'expression par les tumeurs de l'E-cadhérine contribuait à un retard de croissance tumorale, à une réduction du potentiel d'invasion et à une meilleure survie des souris via l'action des LT CD103+, contrairement aux tumeurs sans E-cadhérine (234).

Ces informations suggèrent qu'une forte infiltration en LT CD8+ CD103+ pourrait être à l'origine d'une pression de sélection ou immunoédition de variants tumoraux exprimant peu la glycoprotéine E-cadhérine. Cette perte d'expression conduirait donc à une moindre efficacité des LT. La même question se pose dans le contexte de tumeurs non épithéliales n'exprimant pas l'Ecadhérine comme les sarcomes. Néanmoins, pour les cancers ovariens et urothéliaux, il n'a pas été montré de corrélation entre l'expression de l'E-cadhérine et l'infiltration des LT CD103+ (154,190).

2.3 CD49a et immunosurveillance

L'intégrine CD49a exprimée par les LT mais également par les cellules endothéliales, les monocytes et les NK, se lie aux constituants du stroma tumoral notamment le collagène I et IV. On retrouve cette intégrine sur les TIL dans plusieurs cancers dont le mélanome et le CBNPC (98,172,194,238,239).

Nos travaux ont montré que lorsque le LT n'exprime pas CD103, les LT CD49a+ sont essentiellement localisés dans le compartiment stromal riche en collagène IV. En plus de son rôle dans la rétention tissulaire, CD49a est impliqué dans la survie cellulaire et également dans la cytotoxicité des LT CD8+ (194,217). Dans le mélanome chez l'Homme, les LT CD49a+ sont enrichis en cellules spécifiques de la tumeur (194). Dans l'épiderme d'individus sains, les LT CD8+ CD103+ CD49a+ présentent un profil transcriptomique distinct des cellules CD103+ CD49a^{neg} : les doubles positifs expriment et sécrètent *in vitro* plus de médiateurs cytotoxiques et d'IFN-γ, alors que les LT CD49^{neg} sont de plus grands producteurs d'IL-17 (237). Même si les mécanismes sous-jacents ne sont pas connus, l'expression de CD49a serait donc associée à la fonctionnalité des LT antitumoraux, en plus d'avoir un rôle d'adhésion ; son expression est donc à prendre en compte dans les analyses.

2.4 <u>Rôle des Trm dans la formation de structures lymphoïdes tertiaires</u> <u>intra-tumoraux</u>

Les résultats du second travail a mis en évidence, pour la première fois dans le CBNPC et dans des modèles murins de vaccinations i.n., la présence de Trm au sein des structures lymphoïdes tertiaires (TLS). Les Trm y représentent moins de 20% des LT CD8+ totaux chez l'Homme et sont dispersés dans ces agrégats lymphoïdes. Leur phénotype est hétérogène au sein des TLS alors qu'au contact de la tumeur les Trm coexpriment plus particulièrement les deux intégrines. Cet infiltrat dans les TLS ne peut pas être expliqué, dans ce cas, par la présence des ligands de CD49a et de CD103, contrairement à leur localisation dans la tumeur et le stroma.

Même si les mécanismes ne sont pas connus, nos résultats tendent à montrer une relation entre la densité de l'infiltrat en Trm et la présence de TLS.

En effet, bien que la densité de Trm n'ait pas d'impact statistiquement significatif sur la présence de TLS pour un risque de première espèce à 5%, un infiltrat fort en cellules CD103+ pourrait toutefois y être associée (valeur-p= 0,072). Une extension de la cohorte est à envisager pour mieux caractériser cet impact.

Par ailleurs, les Trm ont été montrés comme producteurs de la chimiokine CXCL13 (197,204,206). Cette cytokine est impliquée dans le recrutement des LB et des LT folliculaires CXCR5+, constituants essentiels des TLS. Les Trm, premières barrières de défense dans les tissus, pourraient promouvoir dans ce sens la formation et le maintien des TLS en cas de stimulation antigénique chronique comme dans le contexte d'un cancer.

3 Intérêt de l'étude de la réponse immunitaire dans l'évaluation de l'efficacité thérapeutique

Les traitements anticancéreux ont pour objectif la destruction tumorale. L'immunothérapie apporte à ces stratégies une induction ou une amplification de la réponse antitumorale, manquante ou défaillante chez le malade. Ces traitements ont par conséquent des effets sur le microenvironnement tumoral que, pour certains, nos deux travaux ont mis en lumière. Nous nous concentrerons ici sur la réponse des Trm, sans oublier que celle-ci dépend également d'autres cellules (DC, LT CD4+, LT CD8+ circulants) et sans oublier la nécessité de prendre en compte le système immunitaire dans son ensemble pour étudier les mécanismes d'action des thérapies.

3.1 Vaccination antitumorale locale et réponse Trm

Intérêt de la vaccination locale pour induire les Trm

L'efficacité de la vaccination anticancéreuse repose sur l'induction de LT CD8+ spécifiques d'un ou plusieurs antigènes tumoraux, capables de détruire la tumeur sur le site tumoral. La vaccination locale est connue pour induire localement la réponse de LT au phénotype Trm avec l'expression d'intégrines comme CD103, CD49a ou encore $\alpha_4\beta_7$ (217,218).

Notre étude a mis en évidence, en parallèle de l'expression de CD103 et de CD49a, la nécessité de l'expression d'un autre marqueur, CXCR6 pour l'induction d'une réponse antitumorale optimale dans la sphère ORL. La déficience en CXCR6 dans un modèle de souris CXCR6^{Gfp/Gfp} entrainait en effet une perte de protection vaccinale.

A l'infiltration de Trm CXCR6+ après vaccination i.n. était associée une augmentation de la concentration locale en CXCL16 dans le LBA et le parenchyme pulmonaire, qui n'était pas observée après vaccination i.m. Cette sécrétion était également retrouvée par une autre équipe après une immunisation i.n. anti-tuberculinique (240) et pourrait contribuer à un recrutement des cellules CXCR6+ dans la muqueuse pulmonaire.

L'axe CXCR6/CXCL16 pourrait être dans ce sens utilisé pour amplifier l'infiltrat en LT CD8+ au sein des tumeurs. Dans une vaccination contre *Mycobacterium*, l'administration de CXCL16 comme adjuvant permettait un recrutement plus important de LT CD8+ CXCR6+ dans les poumons et un contrôle de l'infection (240).

Toutefois, dans un contexte tumoral, les cellules tumorales exprimant elles-aussi CXCR6, l'administration de CXCL16 pourrait contribuer à renforcer la survie de la tumeur et sa diffusion dans l'organisme ; cette expression est donc importante à prendre en compte.

Mécanismes d'induction des Trm

Les mécanismes d'induction des Trm ne sont pas connus et semblent être en lien avec le microenvironnement de résidence du LT. En effet, dans le poumon, il a été montré que les DC contribuaient à l'expression de CD103 et de CD49a (217,255). Le phénotype Trm était également corrélé aux cytokines locales comme le TGF- β ou l'IL-15 (235). Par exemple, l'IL-15 intra-tumorale est associée à un infiltrat plus dense en CD8+ CD103+ dans le mélanome (203), en plus de renforcer *in vitro* la fonction cytotoxique des LT CD103+ CD49a+ (237). Après l'activation lymphocytaire, il est également connu que CXCR6 peut être induit par l'IL-15 (248,256). Ces informations suggèrent l'hypothèse d'un *priming* tissulaire.

Avec l'expérience du FTY720, bloquant la sortie des LT depuis les organes lymphoïdes secondaires (SLO), la vaccination i.n. des souris a permis de montrer que des LT CD8+ spécifiques au profil Trm pouvaient être induits localement. Cette induction était retardée, comparée aux souris n'ayant pas reçu le produit et suggère donc une validation de l'hypothèse du *priming* local des Trm. Toutefois, il faut prendre en compte que la lymphopénie provoquée par le FTY720 n'est pas totale et qu'un recrutement de LT depuis les SLO vers les poumons reste possible.

Pour comprendre où aurait lieu le *priming* en cas d'activation locale, il est important de savoir que le poumon est un organe avec la particularité de pouvoir développer des tissus lymphoïdes, appelés initialement BALT. Des chercheurs proposent que ces structures soient un lieu d'activation lymphocytaire, pouvant dans le cadre du cancer être à l'origine d'une réponse antitumorale (84). Pour étudier la possibilité d'un *priming* des Trm dans les TLS, plusieurs expériences ont été mises au point. Nos données *in situ* chez l'Homme montrent que la présence de TLS est corrélée avec une infiltration plus importante dans la tumeur en LT CD8+ CD103+. Pour aller plus loin, dans le modèle classique d'induction des Trm de l'équipe qui consiste à vacciner les souris à J0 et J14 puis à étudier la réponse Trm à J21, aucun TLS n'a été observé suggérant que l'induction de Trm ne nécessite pas la présence de TLS. Des expériences complémentaires dans des modèles inductions conjointes de Trm et de TLS avec inhibition de la formation TLS ou des Trm pourraient compléter ces observations.

3.2 Sous-populations de Trm et réponse aux IPC

Les IPC sont des thérapies coûteuses et ne sont efficaces que pour 30% des patients. L'identification de biomarqueurs prédictifs de la réponse aux IPC devient nécessaire pour une meilleure sélection des patients-candidats aux IPC.

Si jusqu'à présent, seule l'expression de PD-L1 pour les thérapies anti-PD-1 était recherchée en clinique, le monde scientifique s'est rapidement tourné vers l'étude des LT CD8+, cellules exprimant les IC et principaux acteurs de la destruction spécifique de la cellule tumorale (17,231).

Parmi les LT CD8+, les Trm expriment, de manière générale, plus fortement les IC que les non Trm (172,192,200) et leur infiltration préexistante au sein de la tumeur pourrait être associée à une réponse aux IPC. Plusieurs études suggèrent en effet qu'ils pourraient être considérés comme facteur prédictif de la réponse aux IPC (192,203,216). En lien avec l'étude de Murray et *al*. dans le mélanome, notre étude montre plus particulièrement que la population double positive CD103+ CD49a+ exprime de façon plus importante les IC et pourraient donc être les cibles particulières des IPC. Il s'agira par la suite d'évaluer leur rôle prédictif dans la réponse aux IPC.

3.3 Optimisation du transfert adoptif pour les tumeurs solides

Nos expériences concernant l'impact de la déplétion de CXCR6 sur l'infiltrat tumoral suggèrent que l'expression de CXCR6 par les LT pourrait favoriser un recrutement sur le site tumoral. Notre étude s'est concentrée sur les voies respiratoires mais CXCR6 serait impliqué dans d'autres localisations comme le foie et la peau (257–259). A titre d'exemple, les souris déficientes en CXCR6 présentaient un nombre réduit de Trm dans la peau (259).

Cette propriété de CXCR6 et du réseau de chimiokines en général pourrait être utilisée pour optimiser l'infiltrat dans les tumeurs solides des LT modifiés pour les thérapies de CAR T cells, en y forçant l'expression de récepteurs de chimiokines (121,260). Il faudra cependant vérifier la production de la part de la tumeur des chimiokines correspondantes pour assurer la migration spécifique des CAR T cells vers le site tumoral. Le fait que le même axe chimiokine/récepteur agisse dans plusieurs localisations permet d'envisager une diffusion des LT modifiés sur les sites métastatiques à distance de la tumeur primaire.

Si une étude proposait de transférer des LT Runx3+ pour induire le profil Trm (202), on pourrait également envisager d'induire l'expression d'intégrines comme CD103 dans le cadre d'une tumeur E-cadhérine pour renforcer l'interaction entre le LT infusé et la cellule cancéreuse. Conclusion

Conclusion

Nos travaux ont montré l'importance de l'étude de l'immunité antitumorale locale et notamment des LT CD8+ Trm dans la compréhension de cette réponse protectrice et dans un but d'optimisation thérapeutique. Mieux comprendre le phénotype Trm a permis de mettre en lumière le rôle crucial de cette population lymphocytaire et son potentiel comme cible thérapeutique.

Dans un premier travail, l'identification d'un récepteur de chimiokine CXCR6 fortement exprimé par les Trm a permis de mettre en évidence son impact dans l'établissement d'une infiltration optimale en LT CD8+ Trm au sein de la muqueuse pulmonaire et des tumeurs des voies aérodigestives supérieures. L'axe CXCR6/CXCL16 pourrait représenter un outil thérapeutique intéressant notamment pour les vaccins anticancéreux ou encore pour les thérapies cellulaires dites de « CAR T cells » dont l'infiltration tumorale reste à améliorer.

Malgré la complexité du phénotype des Trm de part son hétérogénéité, le second travail s'est concentré sur l'étude de deux intégrines CD103 et CD49a. Il a ainsi été montré que leur expression expliquait l'infiltration des Trm au sein des cancers pulmonaires et leur contact avec la cellule tumorale, en lien avec leur potentiel cytotoxique et leur forte implication dans la survie des malades. Par une analyse du lien TLS-Trm et des modèles de vaccination locale, nos données suggèrent également l'hypothèse d'un *priming* local pulmonaire nécessaire à l'induction du phénotype Trm.

Une meilleure connaissance des mécanismes sous-jacents à l'induction de ce phénotype Trm permettra de mieux comprendre la formation de ces cellules et à terme, de les cibler ensuite pharmacologiquement pour optimiser les stratégies thérapeutiques et donc la survie des malades. Références

Références

- OMS. Organisation Mondiale de la santé Cancer [Internet]. [cité 22 févr 2019]. Disponible sur: https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer
- esp2017_5_principales_causes_de_deces_et_de_morbidite.pdf [Internet]. [cité 22 févr
 2019]. Disponible sur: https://drees.solidaritessante.gouv.fr/IMG/pdf/esp2017_5_principales_causes_de_deces_et_de_morbidite.pdf
- 3. Defossez G, Le Guyader-Peyrou S, Uhry Z, Grosclaude P, Remontet L, Colonna M, et al. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Résultats préliminaires. [Internet]. Santé publique France; 2019. Disponible sur: http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladieschroniques-et-traumatismes/2019/Estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-lamortalite-par-cancer-en-France-metropolitaine-entre-1990-et-2018
- 4. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 7 janv 2000;100(1):57-70.
- 5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 4 mars 2011;144(5):646-74.
- 6. Burnet M. Cancer—A Biological Approach. Br Med J. 13 avr 1957;1(5023):841-7.
- Burnet M. IMMUNOLOGICAL FACTORS IN THE PROCESS OF CARCINOGENESIS. Br Med Bull. mai 1964;20:154-8.
- 8. Thomas L. On immunosurveillance in human cancer. Yale J Biol Med. 1982;55(3-4):329-33.
- Sun T, Zhou Y, Li H, Han X, Shi Y, Wang L, et al. FASL -844C polymorphism is associated with increased activation-induced T cell death and risk of cervical cancer. J Exp Med. 3 oct 2005;202(7):967-74.
- Shapiro RS. Malignancies in the setting of primary immunodeficiency: Implications for hematologists/oncologists. Am J Hematol. janv 2011;86(1):48-55.
- 11. Salavoura K, Kolialexi A, Tsangaris G, Mavrou A. Development of cancer in patients with primary immunodeficiencies. Anticancer Res. avr 2008;28(2B):1263-9.

- 12. Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P, Boon T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. févr 2014;14(2):135-46.
- 13. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. Nat Rev Cancer. 15 2012;12(4):298-306.
- 14. Yu P, Fu Y-X. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? Lab Investig J Tech Methods Pathol. mars 2006;86(3):231-45.
- 15. Fridman WH, Zitvogel L, Sautès-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. Nat Rev Clin Oncol. déc 2017;14(12):717-34.
- Barnes TA, Amir E. HYPE or HOPE: the prognostic value of infiltrating immune cells in cancer.
 Br J Cancer. 8 août 2017;117(4):451-60.
- Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. Nature. 27 nov 2014;515(7528):568-71.
- 18. Kim H-J, Cantor H. CD4 T-cell subsets and tumor immunity: the helpful and the not-sohelpful. Cancer Immunol Res. févr 2014;2(2):91-8.
- 19. Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, Galinha A, Gey A, Claret E, et al. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. Cancer Res. 1 août 1999;59(15):3698-704.
- 20. Benchetrit F, Ciree A, Vives V, Warnier G, Gey A, Sautès-Fridman C, et al. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. Blood. 15 mars 2002;99(6):2114-21.
- 21. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A, et al. CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. J Clin Invest. juill 2013;123(7):2873-92.
- Végran F, Berger H, Boidot R, Mignot G, Bruchard M, Dosset M, et al. The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells. Nat Immunol. août 2014;15(8):758-66.
- 23. Végran F, Apetoh L, Ghiringhelli F. Th9 cells: a novel CD4 T-cell subset in the immune war against cancer. Cancer Res. 1 févr 2015;75(3):475-9.

- Zhao Y, Niu C, Cui J. Gamma-delta (γδ) T cells: friend or foe in cancer development? J Transl
 Med [Internet]. 10 janv 2018 [cité 26 avr 2019];16. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5761189/
- Terabe M, Berzofsky JA. Tissue-Specific Roles of NKT Cells in Tumor Immunity. Front Immunol [Internet]. 2018 [cité 26 avr 2019];9. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01838/full
- 26. Terabe M, Berzofsky JA. The Role of NKT Cells in Tumor Immunity. Adv Cancer Res. 2008;101:277-348.
- 27. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. Immunity. août 2004;21(2):137-48.
- 28. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. Immunity. 25 juill 2013;39(1):1-10.
- Beatty GL, Gladney WL. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy.
 Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 15 févr 2015;21(4):687-92.
- Ling A, Löfgren-Burström A, Larsson P, Li X, Wikberg ML, Öberg Å, et al. TAP1 down-regulation elicits immune escape and poor prognosis in colorectal cancer. Oncolmmunology. 2 nov 2017;6(11):e1356143.
- Chen Z, Chen L, Baker K, Olszak T, Zeissig S, Huang Y-H, et al. CEACAM1 dampens antitumor immunity by down-regulating NKG2D ligand expression on tumor cells. J Exp Med. 19 déc 2011;208(13):2633-40.
- Akl H, Vervloessem T, Kiviluoto S, Bittremieux M, Parys JB, De Smedt H, et al. A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: mitochondria versus endoplasmic reticulum. Biochim Biophys Acta. oct 2014;1843(10):2240-52.
- 33. Safa AR. c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator. Exp Oncol. oct 2012;34(3):176-84.
- Peter ME, Hadji A, Murmann AE, Brockway S, Putzbach W, Pattanayak A, et al. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. Cell Death Differ. avr 2015;22(4):549-59.

- 35. Vacchelli E, Aranda F, Eggermont A, Sautès-Fridman C, Tartour E, Kennedy EP, et al. Trial watch: IDO inhibitors in cancer therapy. Oncoimmunology [Internet]. 15 déc 2014 [cité 26 févr 2019];3(10). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4292223/
- 36. Konkel JE, Zhang D, Zanvit P, Chia C, Zangarle-Murray T, Jin W, et al. Transforming Growth Factor-β Signaling in Regulatory T Cells Controls T Helper-17 Cells and Tissue-Specific Immune Responses. Immunity. 18 2017;46(4):660-74.
- Pickup M, Novitskiy S, Moses HL. The roles of TGFβ in the tumour microenvironment. Nat Rev Cancer. nov 2013;13(11):788-99.
- Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Pernot S, Nizard M, Pointet A-L, et al. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. J Exp Med. 9 févr 2015;212(2):139-48.
- 39. Shang B, Liu Y, Jiang S, Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3⁺ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. Sci Rep. 14 oct 2015;5:15179.
- Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, Agueznay NEH, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 15 janv 2006;12(2):465-72.
- 41. Walker LSK, Sansom DM. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. Nat Rev Immunol. 25 2011;11(12):852-63.
- 42. Togashi Y, Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression implications for anticancer therapy. Nat Rev Clin Oncol. 31 janv 2019;1.
- 43. Jeannin P, Paolini L, Adam C, Delneste Y. The roles of CSFs on the functional polarization of tumor-associated macrophages. FEBS J. 2018;285(4):680-99.
- 44. Duluc D, Corvaisier M, Blanchard S, Catala L, Descamps P, Gamelin E, et al. Interferon-gamma reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. Int J Cancer. 15 juill 2009;125(2):367-73.
- 45. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 22 mars 2012;12(4):252-64.

- 46. Hui E, Cheung J, Zhu J, Su X, Taylor MJ, Wallweber HA, et al. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. Science. 31 2017;355(6332):1428-33.
- 47. Granier C, Gey A, Dariane C, Mejean A, Timsit M-O, Blanc C, et al. [Tim-3: a novel biomarker and therapeutic target in oncology]. Med Sci MS. mars 2018;34(3):231-7.
- 48. Galluzzi L, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. Nat Rev Drug Discov. 3 févr 2012;11(3):215-33.
- 49. Schubert M-L, Hoffmann J-M, Dreger P, Müller-Tidow C, Schmitt M. Chimeric antigen receptor transduced T cells: Tuning up for the next generation. Int J Cancer. 2018;142(9):1738-47.
- Sharma A, Campbell M, Yee C, Goswami S, Sharma P. 77 Immunotherapy of Cancer. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, Frew AJ, Weyand CM, éditeurs. Clinical Immunology (Fifth Edition) [Internet]. London: Content Repository Only!; 2019 [cité 20 avr 2019]. p. 1033-1048.e1. Disponible sur: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702068966000776
- 51. Maude SL, Teachey DT, Rheingold SR, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, et al. Sustained remissions with CD19-specific chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells in children with relapsed/refractory ALL. J Clin Oncol. 20 mai 2016;34(15_suppl):3011-3011.
- 52. Locke FL, Neelapu SS, Bartlett NL, Siddiqi T, Chavez JC, Hosing CM, et al. Phase 1 Results of ZUMA-1: A Multicenter Study of KTE-C19 Anti-CD19 CAR T Cell Therapy in Refractory Aggressive Lymphoma. Mol Ther. 4 janv 2017;25(1):285-95.
- 53. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N Engl J Med. 19 août 2010;363(8):711-23.
- 54. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. N Engl J Med. 30 juin 2011;364(26):2517-26.
- 55. Granier C, Karaki S, Roussel H, Badoual C, Tran T, Anson M, et al. Immunothérapie des cancers : rationnel et avancées récentes.

/data/revues/02488663/v37i10/S0248866316304131/ [Internet]. 30 sept 2016 [cité 20 avr 2019]; Disponible sur: https://www.em-consulte.com/en/article/1083367

- 56. Johnson DB, Bordeaux J, Kim JY, Vaupel C, Rimm DL, Ho TH, et al. Quantitative Spatial Profiling of PD-1/PD-L1 Interaction and HLA-DR/IDO-1 Predicts Improved Outcomes of Anti-PD-1 Therapies in Metastatic Melanoma. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 1 nov 2018;24(21):5250-60.
- 57. Khagi Y, Kurzrock R, Patel SP. Next generation predictive biomarkers for immune checkpoint inhibition. Cancer Metastasis Rev. 1 mars 2017;36(1):179-90.
- 58. McDermott DF, Huseni MA, Atkins MB, Motzer RJ, Rini BI, Escudier B, et al. Clinical activity and molecular correlates of response to atezolizumab alone or in combination with bevacizumab versus sunitinib in renal cell carcinoma. Nat Med. juin 2018;24(6):749-57.
- 59. Lujambio A. The more (mutations), the better. Sci Transl Med. 30 janv 2019;11(477):eaaw5320.
- 60. Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, Finn OJ, Hastings BM, Hecht TT, et al. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 1 sept 2009;15(17):5323-37.
- 61. Butterfield LH. Cancer vaccines. BMJ. 22 avr 2015;350:h988.
- Blanc C, Granier C, Tartour É. Vaccination antitumorale. Innov Thérapeutiques En Oncol. 1 mai 2017;3(3):149-57.
- Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. N Engl J Med. 29 juill 2010;363(5):411-22.
- 64. Tran T, Blanc C, Granier C, Saldmann A, Tanchot C, Tartour E. Therapeutic cancer vaccine: building the future from lessons of the past. Semin Immunopathol. 2019;41(1):69-85.
- 65. Karaki S, Anson M, Tran T, Giusti D, Blanc C, Oudard S, et al. Is There Still Room for Cancer Vaccines at the Era of Checkpoint Inhibitors. Vaccines. 3 nov 2016;4(4).

- 66. Badoual C, Hans S, Merillon N, Van Ryswick C, Ravel P, Benhamouda N, et al. PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. Cancer Res. 1 janv 2013;73(1):128-38.
- 67. Schlecht G, Garcia S, Escriou N, Freitas AA, Leclerc C, Dadaglio G. Murine plasmacytoid dendritic cells induce effector/memory CD8+ T-cell responses in vivo after viral stimulation. Blood. 15 sept 2004;104(6):1808-15.
- 68. Theisen D, Murphy K. The role of cDC1s in vivo: CD8 T cell priming through crosspresentation. F1000Research [Internet]. 1 févr 2017 [cité 26 avr 2019];6. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5288679/
- Roberts EW, Broz ML, Binnewies M, Headley MB, Nelson AE, Wolf DM, et al. Critical Role for CD103+/CD141+ Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma. Cancer Cell. 8 août 2016;30(2):324-36.
- Broz M, Binnewies M, Boldajipour B, Nelson A, Pollock J, Erle D, et al. Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen Presenting Cells, Critical for T cell Immunity. Cancer Cell. 10 nov 2014;26(5):638-52.
- Spranger S, Dai D, Horton B, Gajewski T. Tumor-residing Batf3 dendritic cells are required for effector T cell trafficking and adoptive T cell therapy. Cancer Cell. 8 mai 2017;31(5):711-723.e4.
- 72. Karthaus N, Torensma R, Tel J. Deciphering the Message Broadcast by Tumor-Infiltrating Dendritic Cells. Am J Pathol. 1 sept 2012;181(3):733-42.
- 73. Goc J, Germain C, Vo-Bourgais TKD, Lupo A, Klein C, Knockaert S, et al. Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. Cancer Res. 1 févr 2014;74(3):705-15.
- 74. Pitt JM, Kroemer G, Zitvogel L. Immunogenic and Non-immunogenic Cell Death in the Tumor Microenvironment. Adv Exp Med Biol. 2017;1036:65-79.
- 75. Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. Nat Rev Immunol. 2017;17(2):97-111.

- 76. Janco JMT, Lamichhane P, Karyampudi L, Knutson KL. TUMOR-INFILTRATING DENDRITIC CELLS IN CANCER PATHOGENESIS1. J Immunol Baltim Md 1950. 1 avr 2015;194(7):2985-91.
- 77. Veglia F, Gabrilovich DI. Dendritic cells in cancer: the role revisited. Curr Opin Immunol. avr 2017;45:43-51.
- Ruffell B, Chang-Strachan D, Chan V, Rosenbusch A, Ho CMT, Pryer N, et al. Macrophage IL 10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12
 expression in intratumoral dendritic cells. Cancer Cell. 10 nov 2014;26(5):623-37.
- 79. Patente TA, Pinho MP, Oliveira AA, Evangelista GCM, Bergami-Santos PC, Barbuto JAM. Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. Front Immunol [Internet]. 21 janv 2019 [cité 6 mars 2019];9. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6348254/
- 80. Hiraoka N, Ino Y, Yamazaki-Itoh R. Tertiary Lymphoid Organs in Cancer Tissues. Front Immunol. 2016;7:244.
- Sautès-Fridman C, Lawand M, Giraldo NA, Kaplon H, Germain C, Fridman WH, et al. Tertiary Lymphoid Structures in Cancers: Prognostic Value, Regulation, and Manipulation for Therapeutic Intervention. Front Immunol. 2016;7:407.
- Dieu-Nosjean M-C, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, 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. 20 sept 2008;26(27):4410-7.
- Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Kusser K, Hartson L, Sprague F, Goodrich S, et al. Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. Nat Med. sept 2004;10(9):927-34.
- Dieu-Nosjean M-C, Giraldo NA, Kaplon H, Germain C, Fridman WH, Sautès-Fridman C. Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers. Immunol Rev. mai 2016;271(1):260-75.
- 85. Siliņa K, Soltermann A, Attar FM, Casanova R, Uckeley ZM, Thut H, et al. Germinal Centers Determine the Prognostic Relevance of Tertiary Lymphoid Structures and Are Impaired by Corticosteroids in Lung Squamous Cell Carcinoma. Cancer Res. 01 2018;78(5):1308-20.

- Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation.
 Nat Rev Immunol. nov 2012;12(11):749-61.
- Jandus C, Usatorre AM, Viganò S, Zhang L, Romero P. The Vast Universe of T Cell Diversity: Subsets of Memory Cells and Their Differentiation. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2017;1514:1-17.
- Henning AN, Roychoudhuri R, Restifo NP. Epigenetic control of CD8+ T cell differentiation. Nat Rev Immunol. mai 2018;18(5):340-56.
- Perret R, Ronchese F. Memory T cells in cancer immunotherapy: which CD8+ T-cell population provides the best protection against tumours? Tissue Antigens. 2008;72(3):187-94.
- Klebanoff CA, Gattinoni L, Torabi-Parizi P, Kerstann K, Cardones AR, Finkelstein SE, et al. Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. Proc Natl Acad Sci. 5 juill 2005;102(27):9571-6.
- 91. Berger C, Jensen MC, Lansdorp PM, Gough M, Elliott C, Riddell SR. Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. J Clin Invest. janv 2008;118(1):294-305.
- 92. Chapuis AG, Thompson JA, Margolin KA, Rodmyre R, Lai IP, Dowdy K, et al. Transferred melanoma-specific CD8+ T cells persist, mediate tumor regression, and acquire central memory phenotype. Proc Natl Acad Sci U S A. 20 mars 2012;109(12):4592-7.
- 93. Enamorado M, Iborra S, Priego E, Cueto FJ, Quintana JA, Martínez-Cano S, et al. Enhanced anti-tumour immunity requires the interplay between resident and circulating memory CD8+ T cells. Nat Commun [Internet]. 17 juill 2017 [cité 8 mars 2019];8. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5520051/
- Muruganandah V, Sathkumara HD, Navarro S, Kupz A. A Systematic Review: The Role of Resident Memory T Cells in Infectious Diseases and Their Relevance for Vaccine Development. Front Immunol. 2018;9:1574.
- 95. Beura LK, Mitchell JS, Thompson EA, Schenkel JM, Mohammed J, Wijeyesinghe S, et al. Intravital mucosal imaging of CD8+ resident memory T cells shows tissue-autonomous recall responses that amplify secondary memory. Nat Immunol. févr 2018;19(2):173-82.

- 96. Amsen D, van Gisbergen KPJM, Hombrink P, van Lier RAW. Tissue-resident memory T cells at the center of immunity to solid tumors. Nat Immunol. juin 2018;19(6):538-46.
- 97. Mackay LK, Rahimpour A, Ma JZ, Collins N, Stock AT, Hafon M-L, et al. The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. Nat Immunol. déc 2013;14(12):1294-301.
- 98. Nizard M, Roussel H, Diniz MO, Karaki S, Tran T, Voron T, et al. Induction of resident memory
 T cells enhances the efficacy of cancer vaccine. Nat Commun. 24 2017;8:15221.
- 99. Wakim LM, Smith J, Caminschi I, Lahoud MH, Villadangos JA. Antibody-targeted vaccination to lung dendritic cells generates tissue-resident memory CD8 T cells that are highly protective against influenza virus infection. Mucosal Immunol. sept 2015;8(5):1060-71.
- 100. Mackay LK, Wynne-Jones E, Freestone D, Pellicci DG, Mielke LA, Newman DM, et al. T-box Transcription Factors Combine with the Cytokines TGF-β and IL-15 to Control Tissue-Resident Memory T Cell Fate. Immunity. 15 déc 2015;43(6):1101-11.
- 101. Schenkel JM, Fraser KA, Casey KA, Beura LK, Pauken KE, Vezys V, et al. IL-15-Independent Maintenance of Tissue-Resident and Boosted Effector Memory CD8 T Cells. J Immunol Baltim Md 1950. 01 2016;196(9):3920-6.
- 102. Iborra S, Martínez-López M, Khouili SC, Enamorado M, Cueto FJ, Conde-Garrosa R, et al. Optimal Generation of Tissue-Resident but Not Circulating Memory T Cells during Viral Infection Requires Crosspriming by DNGR-1+ Dendritic Cells. Immunity. 18 2016;45(4):847-60.
- 103. Yu CI, Becker C, Wang Y, Marches F, Helft J, Leboeuf M, et al. Human CD1c+ dendritic cells drive the differentiation of CD103+ CD8+ mucosal effector T cells via the cytokine TGF-β. Immunity. 18 avr 2013;38(4):818-30.
- 104. Wu T-C, Xu K, Banchereau R, Marches F, Yu CI, Martinek J, et al. Reprogramming tumorinfiltrating dendritic cells for CD103+ CD8+ mucosal T-cell differentiation and breast cancer rejection. Cancer Immunol Res. mai 2014;2(5):487-500.
- 105. Hong H, Gu Y, Sheng SY, Lu CG, Zou JY, Wu CY. The Distribution of Human Stem Cell-like Memory T Cell in Lung Cancer. J Immunother Hagerstown Md 1997. août 2016;39(6):233-40.

- 106. Brummelman J, Mazza EMC, Alvisi G, Colombo FS, Grilli A, Mikulak J, et al. High-dimensional single cell analysis identifies stem-like cytotoxic CD8+ T cells infiltrating human tumors. J Exp Med. 1 oct 2018;215(10):2520-35.
- 107. Siddiqui I, Schaeuble K, Chennupati V, Fuertes Marraco SA, Calderon-Copete S, Pais Ferreira D, et al. Intratumoral Tcf1+PD-1+CD8+ T Cells with Stem-like Properties Promote Tumor Control in Response to Vaccination and Checkpoint Blockade Immunotherapy. Immunity. 15 janv 2019;50(1):195-211.e10.
- 108. Kratchmarov R, Magun AM, Reiner SL. TCF1 expression marks self-renewing human CD8+ T cells. Blood Adv. 18 juill 2018;2(14):1685-90.
- 109. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, et al. A human memory T-cell subset with stem cell-like properties. Nat Med. 18 sept 2011;17(10):1290-7.
- 110. Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. Nat Rev Immunol. sept 2017;17(9):559-72.
- 111. Tan KW, Evrard M, Tham M, Hong M, Huang C, Kato M, et al. Tumor stroma and chemokines control T-cell migration into melanoma following Temozolomide treatment. Oncoimmunology. févr 2015;4(2):e978709.
- 112. Hu J, Bernatchez C, Xia X, Xu Z, Hwu P, Li S. CXCL9, CXCL10 and IFNγ favor the accumulation of infused T cells in tumors following IL-12 plus doxorubicin treatment. J Immunol. 1 mai 2016;196(1 Supplement):212.1-212.1.
- Mullins IM, Slingluff CL, Lee JK, Garbee CF, Shu J, Anderson SG, et al. CXC chemokine receptor
 3 expression by activated CD8+ T cells is associated with survival in melanoma patients with
 stage III disease. Cancer Res. 1 nov 2004;64(21):7697-701.
- 114. Mikucki ME, Fisher DT, Matsuzaki J, Skitzki JJ, Gaulin NB, Muhitch JB, et al. Non-redundant requirement for CXCR3 signalling during tumoricidal T-cell trafficking across tumour vascular checkpoints. Nat Commun. 25 juin 2015;6:7458.
- 115. Mlecnik B, Tosolini M, Charoentong P, Kirilovsky A, Bindea G, Berger A, et al. Biomolecular network reconstruction identifies T-cell homing factors associated with survival in colorectal cancer. Gastroenterology. avr 2010;138(4):1429-40.

- 116. Bronger H, Singer J, Windmüller C, Reuning U, Zech D, Delbridge C, et al. CXCL9 and CXCL10 predict survival and are regulated by cyclooxygenase inhibition in advanced serous ovarian cancer. Br J Cancer. 23 août 2016;115(5):553-63.
- 117. Matsumura S, Wang B, Kawashima N, Braunstein S, Badura M, Cameron TO, et al. Radiationinduced CXCL16 release by breast cancer cells attracts effector T cells. J Immunol Baltim Md 1950. 1 sept 2008;181(5):3099-107.
- 118. Hojo S, Koizumi K, Tsuneyama K, Arita Y, Cui Z, Shinohara K, et al. High-level expression of chemokine CXCL16 by tumor cells correlates with a good prognosis and increased tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer. Cancer Res. 15 mai 2007;67(10):4725-31.
- Parsonage G, Machado LR, Hui JW-Y, McLarnon A, Schmaler T, Balasothy M, et al. CXCR6 and CCR5 localize T lymphocyte subsets in nasopharyngeal carcinoma. Am J Pathol. mars 2012;180(3):1215-22.
- 120. González-Martín A, Gómez L, Lustgarten J, Mira E, Mañes S. Maximal T cell-mediated antitumor responses rely upon CCR5 expression in both CD4(+) and CD8(+) T cells. Cancer Res. 15 août 2011;71(16):5455-66.
- 121. Slaney CY, Kershaw MH, Darcy PK. Trafficking of T cells into tumors. Cancer Res. 15 déc 2014;74(24):7168-74.
- 122. Messina JL, Fenstermacher DA, Eschrich S, Qu X, Berglund AE, Lloyd MC, et al. 12-Chemokine Gene Signature Identifies Lymph Node-like Structures in Melanoma: Potential for Patient Selection for Immunotherapy? Sci Rep [Internet]. 24 oct 2012 [cité 11 mars 2019];2. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3479449/
- 123. Coppola D, Nebozhyn M, Khalil F, Dai H, Yeatman T, Loboda A, et al. Unique ectopic lymph node-like structures present in human primary colorectal carcinoma are identified by immune gene array profiling. Am J Pathol. juill 2011;179(1):37-45.
- 124. de Chaisemartin L, Goc J, Damotte D, Validire P, Magdeleinat P, Alifano M, et al. Characterization of chemokines and adhesion molecules associated with T cell presence in tertiary lymphoid structures in human lung cancer. Cancer Res. 15 oct 2011;71(20):6391-9.
- 125. Nagarsheth N, Peng D, Kryczek I, Wu K, Li W, Zhao E, et al. PRC2 epigenetically silences Th1type chemokines to suppress effector T cell trafficking in colon cancer. Cancer Res. 15 janv 2016;76(2):275-82.
- 126. Peng D, Kryczek I, Nagarsheth N, Zhao L, Wei S, Wang W, et al. Epigenetic silencing of TH1type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy. Nature. 12 nov 2015;527(7577):249-53.
- 127. Molon B, Ugel S, Del Pozzo F, Soldani C, Zilio S, Avella D, et al. Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. J Exp Med. 26 sept 2011;208(10):1949-62.
- 128. van der Woude LL, Gorris MAJ, Halilovic A, Figdor CG, de Vries IJM. Migrating into the Tumor: a Roadmap for T Cells. Trends Cancer. 2017;3(11):797-808.
- 129. Pere H, Montier Y, Bayry J, Quintin-Colonna F, Merillon N, Dransart E, et al. A CCR4 antagonist combined with vaccines induces antigen-specific CD8+ T cells and tumor immunity against self antigens. Blood. 3 nov 2011;118(18):4853-62.
- 130. Fridlender ZG, Buchlis G, Kapoor V, Cheng G, Sun J, Singhal S, et al. CCL2 blockade augments cancer immunotherapy. Cancer Res. 1 janv 2010;70(1):109-18.
- 131. Chow MT, Luster AD. Chemokines in cancer. Cancer Immunol Res. déc 2014;2(12):1125-31.
- 132. Smith MCP, Luker KE, Garbow JR, Prior JL, Jackson E, Piwnica-Worms D, et al. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. Cancer Res. 1 déc 2004;64(23):8604-12.
- 133. Luker KE, Luker GD. Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. Cancer Lett. 8 juill 2006;238(1):30-41.
- 134. Kang H, Watkins G, Parr C, Douglas-Jones A, Mansel RE, Jiang WG. Stromal cell derived factor-1: its influence on invasiveness and migration of breast cancer cells in vitro, and its association with prognosis and survival in human breast cancer. Breast Cancer Res BCR. 2005;7(4):R402-410.
- 135. Chatterjee S, Azad BB, Nimmagadda S. The Intricate Role of CXCR4 in Cancer. Adv Cancer Res. 2014;124:31-82.

- 136. Deng L, Chen N, Li Y, Zheng H, Lei Q. CXCR6/CXCL16 functions as a regulator in metastasis and progression of cancer. Biochim Biophys Acta. août 2010;1806(1):42-9.
- 137. Ke C, Ren Y, Lv L, Hu W, Zhou W. Association between CXCL16/CXCR6 expression and the clinicopathological features of patients with non-small cell lung cancer. Oncol Lett. juin 2017;13(6):4661-8.
- Xiao G, Wang X, Wang J, Zu L, Cheng G, Hao M, et al. CXCL16/CXCR6 chemokine signaling mediates breast cancer progression by pERK1/2-dependent mechanisms. Oncotarget. 29 mars 2015;6(16):14165-78.
- 139. Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, Maehata Y, Suzuki A, Maeda T, et al. Acidic extracellular microenvironment and cancer. Cancer Cell Int. 3 sept 2013;13:89.
- 140. Mauge L, Terme M, Tartour E, Helley D. Control of the adaptive immune response by tumor vasculature. Front Oncol. 2014;4:61.
- 141. Lambrechts D, Wauters E, Boeckx B, Aibar S, Nittner D, Burton O, et al. Phenotype molding of stromal cells in the lung tumor microenvironment. Nat Med. août 2018;24(8):1277.
- 142. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy.Science. 7 janv 2005;307(5706):58-62.
- 143. Fukumura D, Kloepper J, Amoozgar Z, Duda DG, Jain RK. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges. Nat Rev Clin Oncol. mai 2018;15(5):325-40.
- 144. Rodig N, Ryan T, Allen JA, Pang H, Grabie N, Chernova T, et al. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytolysis. Eur J Immunol. nov 2003;33(11):3117-26.
- 145. Sata M, Walsh K. TNFalpha regulation of Fas ligand expression on the vascular endothelium modulates leukocyte extravasation. Nat Med. avr 1998;4(4):415-20.
- 146. Motz GT, Santoro SP, Wang L-P, Garrabrant T, Lastra RR, Hagemann IS, et al. Tumor Endothelium FasL Establishes a Selective Immune Barrier Promoting Tolerance in Tumors. Nat Med. juin 2014;20(6):607-15.

- 147. Spranger S, Bao R, Gajewski TF. Melanoma-intrinsic β-catenin signalling prevents antitumour immunity. Nature. 9 juill 2015;523(7559):231-5.
- 148. Peng W, Chen JQ, Liu C, Malu S, Creasy C, Tetzlaff MT, et al. Loss of PTEN Promotes Resistance to T Cell-Mediated Immunotherapy. Cancer Discov. févr 2016;6(2):202-16.
- 149. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer–immune set point. Nature. janv 2017;541(7637):321-30.
- 150. Salmon H, Franciszkiewicz K, Damotte D, Dieu-Nosjean M-C, Validire P, Trautmann A, et al. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. J Clin Invest. 1 mars 2012;122(3):899-910.
- 151. Bougherara H, Mansuet-Lupo A, Alifano M, Ngô C, Damotte D, Le Frère-Belda M-A, et al. Real-Time Imaging of Resident T Cells in Human Lung and Ovarian Carcinomas Reveals How Different Tumor Microenvironments Control T Lymphocyte Migration. Front Immunol [Internet]. 12 oct 2015 [cité 7 mars 2019];6. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4600956/
- 152. Workel HH, Komdeur FL, Wouters MCA, Plat A, Klip HG, Eggink FA, et al. CD103 defines intraepithelial CD8+ PD1+ tumour-infiltrating lymphocytes of prognostic significance in endometrial adenocarcinoma. Eur J Cancer Oxf Engl 1990. 2016;60:1-11.
- 153. Wang Z-Q, Milne K, Derocher H, Webb JR, Nelson BH, Watson PH. CD103 and Intratumoral Immune Response in Breast Cancer. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 15 déc 2016;22(24):6290-7.
- 154. Webb JR, Milne K, Watson P, Deleeuw RJ, Nelson BH. Tumor-infiltrating lymphocytes expressing the tissue resident memory marker CD103 are associated with increased survival in high-grade serous ovarian cancer. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 15 janv 2014;20(2):434-44.
- 155. Boutet M, Gauthier L, Leclerc M, Gros G, de Montpreville V, Théret N, et al. TGFβ Signaling Intersects with CD103 Integrin Signaling to Promote T-Lymphocyte Accumulation and Antitumor Activity in the Lung Tumor Microenvironment. Cancer Res. 01 2016;76(7):1757-69.

- 156. Zhang L, Romero P. Metabolic Control of CD8+ T Cell Fate Decisions and Antitumor Immunity. Trends Mol Med. 1 janv 2018;24(1):30-48.
- 157. Chang C-H, Qiu J, O'Sullivan D, Buck MD, Noguchi T, Curtis JD, et al. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. Cell. 10 sept 2015;162(6):1229-41.
- 158. Zhao E, Maj T, Kryczek I, Li W, Wu K, Zhao L, et al. Cancer mediates effector T cell dysfunction by targeting microRNAs and EZH2 via glycolysis restriction. Nat Immunol. janv 2016;17(1):95-103.
- 159. Brand A, Singer K, Koehl GE, Kolitzus M, Schoenhammer G, Thiel A, et al. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. Cell Metab. 8 nov 2016;24(5):657-71.
- 160. Tartour E, Pere H, Maillere B, Terme M, Merillon N, Taieb J, et al. Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. Cancer Metastasis Rev. mars 2011;30(1):83-95.
- 161. Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, et al. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1α, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. J Exp Med. 5 mai 2014;211(5):781-90.
- 162. Kjaergaard J, Hatfield S, Jones G, Ohta A, Sitkovsky M. A2A Adenosine Receptor Gene Deletion or Synthetic A2A Antagonist Liberate Tumor-Reactive CD8+ T Cells from Tumor-Induced Immunosuppression. J Immunol. 25 mai 2018;ji1700850.
- 163. Zhang Y, Kurupati R, Liu L, Zhou XY, Zhang G, Hudaihed A, et al. Enhancing CD8+ T cell fatty acid catabolism within a metabolically challenging tumor microenvironment increases the efficacy of melanoma immunotherapy. Cancer Cell. 11 sept 2017;32(3):377-391.e9.
- 164. Sukumar M, Liu J, Ji Y, Subramanian M, Crompton JG, Yu Z, et al. Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8+ T cell memory and antitumor function. J Clin Invest. 1 oct 2013;123(10):4479-88.

- 165. O'Sullivan D, van der Windt GJW, Huang SC-C, Curtis JD, Chang C-H, Buck MD, et al. Memory CD8(+) T cells use cell-intrinsic lipolysis to support the metabolic programming necessary for development. Immunity. 17 juill 2014;41(1):75-88.
- 166. Sukumar M, Liu J, Mehta GU, Patel SJ, Roychoudhuri R, Crompton JG, et al. Mitochondrial Membrane Potential Identifies Cells with Enhanced Stemness for Cellular Therapy. Cell Metab. 12 janv 2016;23(1):63-76.
- Kishton RJ, Sukumar M, Restifo NP. Metabolic Regulation of T Cell Longevity and Function in Tumor Immunotherapy. Cell Metab. 5 juill 2017;26(1):94-109.
- 168. Munn DH, Mellor AL. IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. Trends Immunol. mars 2016;37(3):193-207.
- 169. Eil R, Vodnala SK, Clever D, Klebanoff CA, Sukumar M, Pan JH, et al. Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function. Nature. 22 2016;537(7621):539-43.
- 170. Zhang Y, Huang S, Gong D, Qin Y, Shen Q. Programmed death-1 upregulation is correlated with dysfunction of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human non-small cell lung cancer. Cell Mol Immunol. sept 2010;7(5):389-95.
- 171. Pauken KE, Wherry EJ. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. Trends Immunol. avr 2015;36(4):265-76.
- 172. Ganesan A-P, Clarke J, Wood O, Garrido-Martin EM, Chee SJ, Mellows T, et al. Tissue-resident memory features are linked to the magnitude of cytotoxic T cell responses in human lung cancer. Nat Immunol. août 2017;18(8):940-50.
- 173. Thommen DS, Koelzer VH, Herzig P, Roller A, Trefny M, Dimeloe S, et al. A transcriptionally and functionally distinct PD-1+ CD8+ T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade. Nat Med. juill 2018;24(7):994-1004.
- 174. Clark RA. Resident memory T cells in human health and disease. Sci Transl Med. 7 janv 2015;7(269):269rv1.

- 175. Hogan RJ, Usherwood EJ, Zhong W, Roberts AA, Dutton RW, Harmsen AG, et al. Activated antigen-specific CD8+ T cells persist in the lungs following recovery from respiratory virus infections. J Immunol Baltim Md 1950. 1 févr 2001;166(3):1813-22.
- 176. Khanna KM, Bonneau RH, Kinchington PR, Hendricks RL. Herpes Simplex Virus-Specific Memory CD8+ T Cells Are Selectively Activated and Retained in Latently Infected Sensory Ganglia. Immunity. mai 2003;18(5):593-603.
- 177. Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrançois L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. Science. 23 mars 2001;291(5512):2413-7.
- 178. Zhu J, Koelle DM, Cao J, Vazquez J, Huang ML, Hladik F, et al. Virus-specific CD8+ T cells accumulate near sensory nerve endings in genital skin during subclinical HSV-2 reactivation. J Exp Med. 19 mars 2007;204(3):595-603.
- 179. Gebhardt T, Wakim LM, Eidsmo L, Reading PC, Heath WR, Carbone FR. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. Nat Immunol. mai 2009;10(5):524-30.
- 180. Masopust D, Choo D, Vezys V, Wherry EJ, Duraiswamy J, Akondy R, et al. Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. J Exp Med. 15 mars 2010;207(3):553-64.
- 181. Boyman O, Hefti HP, Conrad C, Nickoloff BJ, Suter M, Nestle FO. Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor-alpha. J Exp Med. 1 mars 2004;199(5):731-6.
- 182. Wakim LM, Woodward-Davis A, Bevan MJ. Memory T cells persisting within the brain after local infection show functional adaptations to their tissue of residence. Proc Natl Acad Sci U S A. 19 oct 2010;107(42):17872-9.
- 183. Wakim LM, Woodward-Davis A, Liu R, Hu Y, Villadangos J, Smyth G, et al. The molecular signature of tissue resident memory CD8 T cells isolated from the brain. J Immunol Baltim Md 1950. 1 oct 2012;189(7):3462-71.
- 184. Clark RA, Watanabe R, Teague JE, Schlapbach C, Tawa MC, Adams N, et al. Skin effector memory T cells do not recirculate and provide immune protection in alemtuzumab-treated CTCL patients. Sci Transl Med. 18 janv 2012;4(117):117ra7.

- 185. Watanabe R, Gehad A, Yang C, Campbell L, Teague JE, Schlapbach C, et al. Human skin is protected by four functionally and phenotypically discrete populations of resident and recirculating memory T cells. Sci Transl Med. 18 mars 2015;7(279):279ra39.
- 186. Clark RA, Chong B, Mirchandani N, Brinster NK, Yamanaka K-I, Dowgiert RK, et al. The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. J Immunol Baltim Md 1950. 1 avr 2006;176(7):4431-9.
- 187. Purwar R, Campbell J, Murphy G, Richards WG, Clark RA, Kupper TS. Resident memory T cells (T(RM)) are abundant in human lung: diversity, function, and antigen specificity. PloS One. 26 janv 2011;6(1):e16245.
- 188. Jarry A, Cerf-Bensussan N, Brousse N, Guy-Grand D, Muzeau F, Potet F. Same peculiar subset of HML1 + lymphocytes present within normal intestinal epithelium is associated with tumoral epithelium of gastrointestinal carcinomas. Gut. déc 1988;29(12):1632-8.
- Ademmer K, Ebert M, Müller-Ostermeyer F, Friess H, Büchler MW, Schubert W, et al. Effector
 T lymphocyte subsets in human pancreatic cancer: detection of CD8+CD18+ cells and
 CD8+CD103+ cells by multi-epitope imaging. Clin Exp Immunol. avr 1998;112(1):21-6.
- 190. Cresswell J, Robertson H, Neal DE, Griffiths TR, Kirby JA. Distribution of lymphocytes of the alpha(E)beta(7) phenotype and E-cadherin in normal human urothelium and bladder carcinomas. Clin Exp Immunol. déc 2001;126(3):397-402.
- 191. Quinn E, Hawkins N, Yip YL, Suter C, Ward R. CD103+ intraepithelial lymphocytes—a unique population in microsatellite unstable sporadic colorectal cancer. Eur J Cancer. 1 mars 2003;39(4):469-75.
- 192. Djenidi F, Adam J, Goubar A, Durgeau A, Meurice G, de Montpréville V, et al. CD8+CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival in lung cancer patients. J Immunol Baltim Md 1950. 1 avr 2015;194(7):3475-86.
- 193. Hartana CA, Ahlén Bergman E, Broomé A, Berglund S, Johansson M, Alamdari F, et al. Tissueresident memory T cells are epigenetically cytotoxic with signs of exhaustion in human urinary bladder cancer. Clin Exp Immunol. 15 juill 2018;

- 194. Murray T, Fuertes Marraco SA, Baumgaertner P, Bordry N, Cagnon L, Donda A, et al. Very Late Antigen-1 Marks Functional Tumor-Resident CD8 T Cells and Correlates with Survival of Melanoma Patients. Front Immunol. 2016;7:573.
- 195. Komdeur FL, Prins TM, van de Wall S, Plat A, Wisman GBA, Hollema H, et al. CD103+ tumorinfiltrating lymphocytes are tumor-reactive intraepithelial CD8+ T cells associated with prognostic benefit and therapy response in cervical cancer. Oncoimmunology. 2017;6(9):e1338230.
- 196. Wang B, Wu S, Zeng H, Liu Z, Dong W, He W, et al. CD103+ Tumor Infiltrating Lymphocytes Predict a Favorable Prognosis in Urothelial Cell Carcinoma of the Bladder. J Urol. août 2015;194(2):556-62.
- 197. Oja AE, Piet B, van der Zwan D, Blaauwgeers H, Mensink M, de Kivit S, et al. Functional Heterogeneity of CD4+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes With a Resident Memory Phenotype in NSCLC. Front Immunol [Internet]. 16 nov 2018 [cité 19 mars 2019];9. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6250821/
- 198. Edwards J, Tasker A, Pires da Silva I, Quek C, Batten M, Ferguson A, et al. Prevalence and Cellular Distribution of Novel Immune Checkpoint Targets Across Longitudinal Specimens in Treatment-naïve Melanoma Patients: Implications for Clinical Trials. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 18 févr 2019;
- 199. Kumar BV, Ma W, Miron M, Granot T, Guyer RS, Carpenter DJ, et al. Human tissue-resident memory T cells are defined by core transcriptional and functional signatures in lymphoid and mucosal sites. Cell Rep. 19 sept 2017;20(12):2921-34.
- 200. Guo X, Zhang Y, Zheng L, Zheng C, Song J, Zhang Q, et al. Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing. Nat Med. juill 2018;24(7):978-85.
- Duhen T, Duhen R, Montler R, Moses J, Moudgil T, de Miranda NF, et al. Co-expression of CD39 and CD103 identifies tumor-reactive CD8 T cells in human solid tumors. Nat Commun [Internet]. 13 juill 2018 [cité 15 mars 2019];9. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6045647/
- 202. Milner JJ, Toma C, Yu B, Zhang K, Omilusik K, Phan AT, et al. Runx3 programs CD8+ T cell residency in non-lymphoid tissues and tumours. Nature. 14 2017;552(7684):253-7.

- 203. Edwards J, Wilmott JS, Madore J, Gide TN, Quek C, Tasker A, et al. CD103+ Tumor-Resident CD8+ T Cells Are Associated with Improved Survival in Immunotherapy-Naïve Melanoma Patients and Expand Significantly During Anti-PD-1 Treatment. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 1 juill 2018;24(13):3036-45.
- 204. Savas P, Virassamy B, Ye C, Salim A, Mintoff CP, Caramia F, et al. Single-cell profiling of breast cancer T cells reveals a tissue-resident memory subset associated with improved prognosis. Nat Med. juill 2018;24(7):986-93.
- 205. Webb JR, Milne K, Nelson BH. PD-1 and CD103 Are Widely Coexpressed on Prognostically Favorable Intraepithelial CD8 T Cells in Human Ovarian Cancer. Cancer Immunol Res. août 2015;3(8):926-35.
- 206. Workel HH, Lubbers JM, Arnold R, Prins TM, van der Vlies P, de Lange K, et al. A transcriptionally distinct CXCL13+CD103+CD8+ T-cell population is associated with B-cell recruitment and neoantigen load in human cancer. Cancer Immunol Res. 14 mars 2019;
- 207. Zheng C, Zheng L, Yoo J-K, Guo H, Zhang Y, Guo X, et al. Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing. Cell. 15 juin 2017;169(7):1342-1356.e16.
- Mueller SN, Mackay LK. Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence.
 Nat Rev Immunol. févr 2016;16(2):79-89.
- 209. Shane HL, Klonowski KD. Every breath you take: the impact of environment on resident memory CD8 T cells in the lung. Front Immunol. 2014;5:320.
- 210. Melssen MM, Olson W, Wages NA, Capaldo BJ, Mauldin IS, Mahmutovic A, et al. Formation and phenotypic characterization of CD49a, CD49b and CD103 expressing CD8 T cell populations in human metastatic melanoma. Oncoimmunology. 2018;7(10):e1490855.
- 211. Huang A, Huang P, Luo Y, Wang B, Luo X, Zheng Z, et al. CD 103 expression in normal epithelium is associated with poor prognosis of colorectal cancer patients within defined subgroups. In 2017.
- 212. Koh J, Kim S, Kim M-Y, Go H, Jeon YK, Chung DH. Prognostic implications of intratumoral CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes in pulmonary squamous cell carcinoma. Oncotarget.
 21 févr 2017;8(8):13762-9.

- 213. Mann JE, Smith JD, Birkeland AC, Bellile E, Swiecicki P, Mierzwa M, et al. Analysis of tumorinfiltrating CD103 resident memory T-cell content in recurrent laryngeal squamous cell carcinoma. Cancer Immunol Immunother. févr 2019;68(2):213-20.
- 214. Hu X, Li Y-Q, Li Q-G, Ma Y-L, Peng J-J, Cai S-J. ITGAE Defines CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes Predicting a better Prognostic Survival in Colorectal Cancer. EBioMedicine. 1 sept 2018;35:178-88.
- 215. Komdeur FL, Wouters MCA, Workel HH, Tijans AM, Terwindt ALJ, Brunekreeft KL, et al. CD103+ intraepithelial T cells in high-grade serous ovarian cancer are phenotypically diverse TCRαβ+ CD8αβ+ T cells that can be targeted for cancer immunotherapy. Oncotarget. 15 nov 2016;7(46):75130-44.
- 216. Zhou J, Liu L, Yang T, Lu B. Prognostic and therapeutic value of CD103+ cells in renal cell carcinoma. Exp Ther Med. juin 2018;15(6):4979-86.
- 217. Sandoval F, Terme M, Nizard M, Badoual C, Bureau M-F, Freyburger L, et al. Mucosal imprinting of vaccine-induced CD8⁺ T cells is crucial to inhibit the growth of mucosal tumors. Sci Transl Med. 13 févr 2013;5(172):172ra20.
- 218. Sun Y-Y, Peng S, Han L, Qiu J, Song L, Tsai Y, et al. Local HPV Recombinant Vaccinia Boost Following Priming with an HPV DNA Vaccine Enhances Local HPV-Specific CD8+ T-cell-Mediated Tumor Control in the Genital Tract. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 1 févr 2016;22(3):657-69.
- 219. Malik BT, Byrne KT, Vella JL, Zhang P, Shabaneh TB, Steinberg SM, et al. Resident memory T cells in the skin mediate durable immunity to melanoma. Sci Immunol. 14 avr 2017;2(10).
- 220. Webb JR, Wick DA, Nielsen JS, Tran E, Milne K, McMurtrie E, et al. Profound elevation of CD8+ T cells expressing the intraepithelial lymphocyte marker CD103 (alphaE/beta7 Integrin) in high-grade serous ovarian cancer. Gynecol Oncol. sept 2010;118(3):228-36.
- 221. Simoni Y, Becht E, Fehlings M, Loh CY, Koo S-L, Teng KWW, et al. Bystander CD8+ T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates. Nature. 2018;557(7706):575-9.

- 222. Le Floc'h A, Jalil A, Vergnon I, Le Maux Chansac B, Lazar V, Bismuth G, et al. Alpha E beta 7 integrin interaction with E-cadherin promotes antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis. J Exp Med. 19 mars 2007;204(3):559-70.
- 223. Franciszkiewicz K, Le Floc'h A, Boutet M, Vergnon I, Schmitt A, Mami-Chouaib F. CD103 or LFA-1 engagement at the immune synapse between cytotoxic T cells and tumor cells promotes maturation and regulates T-cell effector functions. Cancer Res. 15 janv 2013;73(2):617-28.
- Park SL, Buzzai A, Rautela J, Hor JL, Hochheiser K, Effern M, et al. Tissue-resident memory
 CD8 + T cells promote melanoma–immune equilibrium in skin. Nature. janv
 2019;565(7739):366.
- 225. Le Floc'h A, Jalil A, Franciszkiewicz K, Validire P, Vergnon I, Mami-Chouaib F. Minimal engagement of CD103 on cytotoxic T lymphocytes with an E-cadherin-Fc molecule triggers lytic granule polarization via a phospholipase Cgamma-dependent pathway. Cancer Res. 15 janv 2011;71(2):328-38.
- Mami-Chouaib F, Blanc C, Corgnac S, Hans S, Malenica I, Granier C, et al. Resident memory T cells, critical components in tumor immunology. J Immunother Cancer. 4 sept 2018;6(1):87.
- 227. Gauthier L, Corgnac S, Boutet M, Gros G, Validire P, Bismuth G, et al. Paxillin Binding to the Cytoplasmic Domain of CD103 Promotes Cell Adhesion and Effector Functions for CD8+ Resident Memory T Cells in Tumors. Cancer Res. 15 2017;77(24):7072-82.
- 228. Park SL, Zaid A, Hor JL, Christo SN, Prier JE, Davies B, et al. Local proliferation maintains a stable pool of tissue-resident memory T cells after antiviral recall responses. Nat Immunol. févr 2018;19(2):183-91.
- 229. Pan Y, Tian T, Park CO, Lofftus SY, Mei S, Liu X, et al. Survival of tissue-resident memory T cells requires exogenous lipid uptake and metabolism. Nature. 09 2017;543(7644):252-6.
- 230. Kamphorst AO, Wieland A, Nasti T, Yang S, Zhang R, Barber DL, et al. Rescue of exhausted
 CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. Science. 31
 2017;355(6332):1423-7.

- 231. Ribas A, Shin DS, Zaretsky J, Frederiksen J, Cornish A, Avramis E, et al. PD-1 blockade expands intratumoral T memory cells. Cancer Immunol Res. mars 2016;4(3):194-203.
- 232. Subrahmanyam PB, Dong Z, Gusenleitner D, Giobbie-Hurder A, Severgnini M, Zhou J, et al. Distinct predictive biomarker candidates for response to anti-CTLA-4 and anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. J Immunother Cancer. 6 mars 2018;6(1):18.
- 233. Wei SC, Levine JH, Cogdill AP, Zhao Y, Anang N-AAS, Andrews MC, et al. Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade. Cell. 7 sept 2017;170(6):1120-1133.e17.
- Shields BD, Koss B, Taylor EM, Storey AJ, West KL, Byrum SD, et al. Loss of E-Cadherin Inhibits CD103 Antitumor Activity and Reduces Checkpoint Blockade Responsiveness in Melanoma. Cancer Res. 15 mars 2019;79(6):1113-23.
- 235. Yoshizawa A, Bi K, Keskin DB, Zhang G, Reinhold B, Reinherz EL. TCR-pMHC encounter differentially regulates transcriptomes of tissue-resident CD8 T cells. Eur J Immunol. 1 janv 2018;48(1):128-50.
- 236. Xiao Z, Mescher MF, Jameson SC. Detuning CD8 T cells: down-regulation of CD8 expression, tetramer binding, and response during CTL activation. J Exp Med. 29 oct 2007;204(11):2667-77.
- 237. Cheuk S, Schlums H, Gallais Sérézal I, Martini E, Chiang SC, Marquardt N, et al. CD49a Expression Defines Tissue-Resident CD8+ T Cells Poised for Cytotoxic Function in Human Skin. Immunity. 21 févr 2017;46(2):287-300.
- 238. Melssen MM, Olson W, Wages NA, Capaldo BJ, Mauldin IS, Mahmutovic A, et al. Formation and phenotypic characterization of CD49a, CD49b and CD103 expressing CD8 T cell populations in human metastatic melanoma. Oncoimmunology. 2018;7(10):e1490855.
- 239. Salerno EP, Olson WC, McSkimming C, Shea S, Slingluff CL. T cells in the human metastatic melanoma microenvironment express site-specific homing receptors and retention integrins. Int J Cancer J Int Cancer. 1 févr 2014;134(3):563-74.
- 240. Lee LN, Ronan EO, de Lara C, Franken KLMC, Ottenhoff THM, Tchilian EZ, et al. CXCR6 Is a Marker for Protective Antigen-Specific Cells in the Lungs after Intranasal Immunization against Mycobacterium tuberculosis [▼]. Infect Immun. août 2011;79(8):3328-37.

- 241. Day C, Patel R, Guillen C, Wardlaw AJ. The chemokine CXCL16 is highly and constitutively expressed by human bronchial epithelial cells. Exp Lung Res. mai 2009;35(4):272-83.
- 242. Morgan AJ, Guillen C, Symon FA, Huynh TT, Berry MA, Entwisle JJ, et al. Expression of CXCR6 and its ligand CXCL16 in the lung in health and disease. Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol. déc 2005;35(12):1572-80.
- 243. Matsumura S, Demaria S. Up-regulation of the pro-inflammatory chemokine CXCL16 is a common response of tumor cells to ionizing radiation. Radiat Res. avr 2010;173(4):418-25.
- 244. Butcher MJ, Wu C-I, Waseem T, Galkina EV. CXCR6 regulates the recruitment of proinflammatory IL-17A-producing T cells into atherosclerotic aortas. Int Immunol. 2016;28(5):255-61.
- 245. Chea S, Possot C, Perchet T, Petit M, Cumano A, Golub R. CXCR6 Expression Is Important for Retention and Circulation of ILC Precursors. Mediators Inflamm [Internet]. 2015 [cité 19 avr 2019];2015. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4606447/
- 246. Godefroy E, Alameddine J, Montassier E, Mathé J, Desfrançois-Noël J, Marec N, et al. Expression of CCR6 and CXCR6 by Gut-Derived CD4+/CD8α+ T-Regulatory Cells, Which Are Decreased in Blood Samples From Patients With Inflammatory Bowel Diseases. Gastroenterology. 2018;155(4):1205-17.
- 247. Paust S, Gill HS, Wang B-Z, Flynn MP, Moseman EA, Senman B, et al. Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell–mediated antigen-specific memory of haptens and viruses. Nat Immunol. déc 2010;11(12):1127-35.
- 248. Agostini C, Cabrelle A, Calabrese F, Bortoli M, Scquizzato E, Carraro S, et al. Role for CXCR6 and its ligand CXCL16 in the pathogenesis of T-cell alveolitis in sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med. 15 nov 2005;172(10):1290-8.
- 249. Jeyanathan M, Afkhami S, Khera A, Mandur T, Damjanovic D, Yao Y, et al. CXCR3 Signaling Is Required for Restricted Homing of Parenteral Tuberculosis Vaccine-Induced T Cells to Both the Lung Parenchyma and Airway. J Immunol Baltim Md 1950. 01 2017;199(7):2555-69.
- 250. Kohlmeier JE, Miller SC, Smith J, Lu B, Gerard C, Cookenham T, et al. The chemokine receptor CCR5 plays a key role in the early memory CD8+ T cell response to respiratory virus infections. Immunity. 18 juill 2008;29(1):101-13.

- 251. Kohlmeier JE, Reiley WW, Perona-Wright G, Freeman ML, Yager EJ, Connor LM, et al. Inflammatory chemokine receptors regulate CD8(+) T cell contraction and memory generation following infection. J Exp Med. 1 août 2011;208(8):1621-34.
- 252. Hombrink P, Helbig C, Backer RA, Piet B, Oja AE, Stark R, et al. Programs for the persistence, vigilance and control of human CD8+ lung-resident memory T cells. Nat Immunol. déc 2016;17(12):1467-78.
- 253. Petrova YI, Schecterson L, Gumbiner BM. Roles for E-cadherin cell surface regulation in cancer. Mol Biol Cell. 01 2016;27(21):3233-44.
- 254. Shargh SA, Sakizli M, Khalaj V, Movafagh A, Yazdi H, Hagigatjou E, et al. Downregulation of E-cadherin expression in breast cancer by promoter hypermethylation and its relation with progression and prognosis of tumor. Med Oncol Northwood Lond Engl. nov 2014;31(11):250.
- 255. Wakim LM, Smith J, Caminschi I, Lahoud MH, Villadangos JA. Antibody-targeted vaccination to lung dendritic cells generates tissue-resident memory CD8 T cells that are highly protective against influenza virus infection. Mucosal Immunol. sept 2015;8(5):1060-71.
- 256. Hydes T, Noll A, Salinas-Riester G, Abuhilal M, Armstrong T, Hamady Z, et al. IL-12 and IL-15 induce the expression of CXCR6 and CD49a on peripheral natural killer cells. Immun Inflamm Dis. 1 mars 2018;6(1):34-46.
- 257. Günther C, Carballido-Perrig N, Kaesler S, Carballido JM, Biedermann T. CXCL16 and CXCR6 are upregulated in psoriasis and mediate cutaneous recruitment of human CD8+ T cells. J Invest Dermatol. mars 2012;132(3 Pt 1):626-34.
- 258. Sato T, Thorlacius H, Johnston B, Staton TL, Xiang W, Littman DR, et al. Role for CXCR6 in recruitment of activated CD8+ lymphocytes to inflamed liver. J Immunol Baltim Md 1950. 1 janv 2005;174(1):277-83.
- 259. Zaid A, Hor JL, Christo SN, Groom JR, Heath WR, Mackay LK, et al. Chemokine Receptor-Dependent Control of Skin Tissue-Resident Memory T Cell Formation. J Immunol Baltim Md 1950. 01 2017;199(7):2451-9.
- 260. Idorn M, thor Straten P. Chemokine Receptors and Exercise to Tackle the Inadequacy of T Cell Homing to the Tumor Site. Cells [Internet]. 17 août 2018 [cité 19 avr 2019];7(8). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6115859/

Annexe

Annexe-Liste des publications au cours de la thèse

Articles originaux:

- Granier C, Vinatier E, Colin E, Mandavit M, Dariane C, Verkarre V, Biard L, El Zein R, Lesaffre C, Galy-Fauroux I, Roussel H, De Guillebon E, Blanc C, Saldmann A, Badoual C, Gey A, Tartour É. Multiplexed Immunofluorescence Analysis and Quantification of Intratumoral PD-1+ Tim-3+ CD8+ T Cells. <u>J Vis Exp</u>. 2018 Feb 8;(132).
- Nizard M, Roussel H, Diniz MO, Karaki S, Tran T, Voron T, Dransart E, Sandoval F, Riquet M, Rance B, Marcheteau E, Fabre E, Mandavit M, Terme M, Blanc C, Escudie JB, Gibault L, Barthes FLP, Granier C, Ferreira LCS, Badoual C, Johannes L, Tartour E. Induction of resident memory T cells enhances the efficacy of cancer vaccine. <u>Nat Commun</u>. 2017 May 24;8:15221.

Revues:

- Mami-Chouaib F, Blanc C, Corgnac S, Hans S, Malenica I, Granier C, Tihy I, Tartour E. Resident memory T cells, critical components in tumor immunology. <u>J Immunother Cancer</u>. 2018 Sep 4;6(1):87.
- Blanc C, Hans S, Tran T, Granier C, Saldman A, Anson M, Oudard S, Tartour E. Targeting Resident Memory T Cells for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2018 Jul 27;9:1722.
- Tran T*, Blanc C*, Granier C, Saldmann A, Tanchot C, Tartour E. Therapeutic cancer vaccine:
 building the future from lessons of the past. <u>Semin Immunopathol.</u> 2018 Jul 5.
- Granier C, Gey A, Dariane C, Mejean A, Timsit MO, Blanc C, Verkarre V, Radulescu C, Fabre E, Vano Y, Oudard S, Badoual C, Tartour É. [Tim-3: a novel biomarker and therapeutic target in oncology]. *Med Sci* (Paris). 2018 Mar;34(3):231-237.
- Blanc C, Granier C, Tartour É. Vaccination antitumorale. *Innov Ther Oncol*, 2017; 3 : 149-157
- Granier C, De Guillebon E*, Blanc C*, Roussel H, Badoual C, Colin E, Saldmann A, Gey A, Oudard S, Tartour E. Mechanisms of action and rationale for the use of checkpoint inhibitors in cancer.
 <u>ESMO Open.</u> 2017 Jul 3;2(2):e000213.
- Karaki S, Anson M, Tran T, Giusti D, Blanc C, Oudard S, Tartour E. Is There Still Room for Cancer
 Vaccines at the Era of Checkpoint Inhibitors. <u>Vaccines (Basel)</u>. 2016 Nov 3;4(4).

Titre : Lymphocytes T résidents mémoires dans les tumeurs du poumon et ORL : sous-populations et mécanismes de migration.

Résumé :

De grands bouleversements sont apparus au début du 21^{ème} siècle dans la compréhension de la physiopathologie du cancer avec l'énoncé de la théorie de l'immunoédition complétant le concept de l'immunosurveillance. La communauté scientifique s'accorde désormais sur le fait que le système immunitaire et particulièrement les lymphocytes T (LT) CD8+ tiennent une place essentielle dans le contrôle de la croissance tumorale. Toutefois, par pression de sélection, la cellule tumorale développe des mécanismes de résistance aux attaques du système immunitaire, neutralisant ainsi l'effet cytotoxique des LT. Restaurer leurs fonctions antitumorales est une stratégie thérapeutique qui a fait ses preuves avec l'immunothérapie. Cependant, ces traitements ne sont pas toujours efficaces et peuvent être optimisés par une meilleure compréhension de l'immunité antitumorale. Dans ce but, nous nous sommes intéressés au déroulement de la réponse antitumorale des LT CD8+ en nous attardant sur les LT résidents mémoires (Trm) particulièrement efficaces contre la tumeur et au fort impact pronostique, qui pourraient être une cible thérapeutique pertinente.

L'induction d'une réponse antitumorale efficace requiert une présentation antigénique optimale conduisant à l'activation du LT CD8+ et à sa migration dans la tumeur via le réseau chimiokine/récepteur. Dans le premier travail, le récepteur de chimiokine CXCR6 a été identifié comme molécule de *homing* fortement exprimée par les LT CD8+ Trm du poumon. Sa chimiokine CXCL16 peut être sécrétée par les cellules présentatrices d'antigènes, les cellules épithéliales et tumorales mais le rôle de l'axe CXCR6/CXCL16 dans l'immunosurveillance des cancers n'est pas connu à ce jour. Pour en comprendre les mécanismes, des expériences de vaccinations antitumorales par voie intranasale (i.n.) réalisées dans des modèles de souris déficientes en CXCR6 ont permis de mettre en évidence l'impact de CXCR6 dans l'établissement d'une infiltration optimale en LT CD8+ spécifiques et Trm dans le lavage broncho-alvéolaire et au sein des tumeurs des voies aérodigestives supérieures. L'axe CXCR6/CXCL16 pourrait représenter un outil thérapeutique intéressant pour les vaccins anticancéreux ou pour les thérapies de transferts adoptifs de LT modifiés dont l'infiltration intra-tumorale est limitée.

Les Trm ont la particularité d'exprimer des intégrines (CD103, CD49a) impliquées dans leur interaction avec le microenvironnement tumoral. Ils présentent un phénotype original microenvironnement-dépendant qui leur confère des avantages en termes d'activités cytotoxiques dans les tumeurs et expliquant leur impact pronostique favorable. Une meilleure connaissance de leur phénotype et de leurs mécanismes d'induction permettrait d'optimiser la réponse antitumorale.

Le second travail s'est concentré sur l'étude de deux intégrines principales CD103 et CD49a dans les cancers pulmonaires par des techniques multiparamétriques d'immunofluorescence *in situ* et de cytométrie en flux. Les résultats montrent que leur expression explique l'infiltration des LT CD8+ et leur contact avec la cellule tumorale, en lien avec leur forte implication dans la survie des malades. Nos données suggérèrent également la possibilité d'un *priming* local pulmonaire nécessaire à l'induction du phénotype Trm par des modèles de vaccinations i.n. et d'un lien entre les structures lymphoïdes tertiaires et les Trm.

Ces travaux ont montré l'importance de l'analyse de l'immunité locale avec les LT CD8+ Trm pour la compréhension de cette réponse antitumorale. Etudier le phénotype Trm a permis de mettre en lumière leur rôle crucial et leur potentiel comme cible thérapeutique. Une meilleure connaissance des mécanismes sous-jacents à l'induction des Trm permettra à terme de les cibler pharmacologiquement pour optimiser les thérapies et donc la survie des malades.

Mots clés : cancer, Trm, CXCR6, vaccin, sous-populations.